

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 185**

51 Int. Cl.:

A61K 31/426 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2017** **E 20194458 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022** **EP 3777855**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de enfermedades fibróticas**

30 Prioridad:

11.04.2016 EP 16305425

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.03.2023

73 Titular/es:

**GENFIT (100.0%)
885 avenue Eugène Avinée
59120 Loos, FR**

72 Inventor/es:

**DARTEIL, RAPHAËL;
WALCZAK, ROBERT;
BELANGER, CAROLE;
NEGRO, EMILIE;
DAUBERSIES, PIERRE y
DELATAILLE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 935 185 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para el tratamiento de enfermedades fibróticas

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular al tratamiento de enfermedades fibróticas.

5 Antecedentes

El depósito anormal y exagerado de matriz extracelular es la característica distintiva de todas las enfermedades fibróticas, incluyendo la fibrosis hepática, pulmonar, renal o cardíaca. El espectro de órganos afectados, la naturaleza progresiva del proceso fibrótico, el gran número de personas afectadas y la ausencia de un tratamiento eficaz plantean un enorme desafío cuando se tratan las enfermedades fibróticas.

10 En un intento de proponer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades fibróticas, los autores de la invención encontraron que el compuesto etanoato de 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenilo] (nitazoxanida o NTZ), un agente antiprotozoario sintético, también muestra potentes propiedades antifibróticas. Además, la evaluación de NTZ en un modelo de lesión hepática puso de manifiesto su capacidad para reducir la concentración de ácidos biliares en la circulación, reflejando así su potencial para tratar tanto enfermedades colestásicas (tales como PBC y

15 PSC) como fibróticas.

Se ha mostrado que la NTZ, descrita por primera vez en 1975 (Rossignol y Cavier, 1975), es muy eficaz contra protozoos anaerobios, helmintos y un amplio espectro de microbios que incluyen bacterias tanto anaerobias como aerobias (Rossignol 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 Estados Unidos (Alinia®, laboratorios Romark) para el tratamiento de la diarrea causada por los parásitos protozoarios *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*. La NTZ también se ha comercializado ampliamente en América Latina y en la India, donde está indicada para el tratamiento de un amplio espectro de infecciones parasitarias intestinales (Hemphill, Mueller *et al.*, 2006). El mecanismo de acción propuesto por el cual la NTZ ejerce su actividad antiparasitaria es a través de la inhibición de reacciones de transferencia de electrones dependientes de la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) que son esenciales para el metabolismo anaerobio (Hoffman, Sisson *et al.*, 2007). La NTZ también presenta actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, que no posee un homólogo de PFOR, lo que sugiere un mecanismo de acción alternativo. De hecho, se demostró que la NTZ también puede actuar como un desacoplador que altera el potencial de membrana y la homeostasis del pH intraorganismos (de Carvalho, Darby *et al.*, 2011).

20

25

30

Los efectos farmacológicos de la NTZ no se limitan a sus actividades antiparasitarias y en los últimos años varios estudios pusieron de manifiesto que la NTZ también puede conferir actividad antiviral (Di Santo y Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). La NTZ interfiere con la replicación viral de diversas formas que incluyen un bloqueo en la maduración de las proteínas hemaglutinina (influenza) o VP7 (rotavirus), o la activación de la proteína PKR implicada en la respuesta inmunitaria innata (para una revisión, véase (Rossignol, 2014)). También se mostró que la NTZ tiene amplias propiedades antineoplásicas al interferir con rutas de señalización metabólicas y promueve cruciales (Di Santo y Ehrisman, 2014)

35

En esta invención, usando un ensayo de cribado fenotípico para identificar potenciales agentes antifibróticos, se descubrió que la NTZ o su metabolito activo tizoxanida (o TZ) interfieren con la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC), que tienen una función clave en el desarrollo de la fibrosis hepática. Este efecto era totalmente inesperado en vista de las propiedades previamente descritas para estas moléculas. Además, se mostró que la NTZ y TZ interfieren con la activación de fibroblastos estimulados derivados de otros órganos tales como corazón, pulmón e intestinos. Las propiedades antifibróticas de la NTZ se confirmaron además en un modelo preclínico de enfermedad hepática (NASH inducida por dieta CDAAc) al mostrar niveles significativamente reducidos de colágeno hepático y fibrosis. Además de su actividad antifibrótica, también se mostró que la NTZ reduce la concentración de ácidos biliares en la circulación en un modelo de lesión hepática inducida por CCl₄. Por lo tanto, la NTZ y TZ aparecen como compuestos de interés para el tratamiento de enfermedades colestásicas y diversos tipos de enfermedades fibróticas.

40

45

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al compuesto etanoato de [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenilo] (nitazoxanida) o sus metabolitos activos 2-hidroxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida (tizoxanida), o glucurónido de tizoxanida (TZG), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad fibrótica.

50

En una realización particular, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, intestinal, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, de tendón, cartilago, cardíaca, pancreática, pulmonar, de útero, sistema nervioso, testicular, de pene, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestinal (p. ej. intestino delgado), vía biliar, tejido blando (p. ej. mediastino o retroperitoneo), médula ósea, articular, ocular y estomacal. En una realización particular adicional, el trastorno fibrótico se selecciona en el grupo que consiste en fibrosis hepática,

55

intestinal, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, de tendón, cartílago, cardíaca, pancreática, pulmonar, de útero, sistema nervioso, testicular, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestinal (p. ej. intestino delgado), vía biliar, tejido blando (p. ej. mediastino o retroperitoneo), médula ósea, articular y estomacal. En una realización particular adicional, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, intestinal, pulmonar, cardíaca, renal, muscular, cutánea, de tejido blando, médula ósea, intestinal y articular. En otra realización más, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cutánea, fibrosis ocular (tal como fibrosis capsular), fibrosis endomiocárdica, fibrosis de mediastino, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva (una complicación de la neumoconiosis de los trabajadores del carbón), fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias (EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador, tuberculosis), fibrosis hepática inducida por alcohol o fármacos, 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 antiguo, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, algunas formas de capsulitis adhesiva, colangiopatías fibrosantes crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (PSC), colangitis biliar primaria (PBC), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar tipo 3 (PFIC3), fibrosis periimplantacional y asbestosis.

Según una realización particular de la descripción, la enfermedad colestásica se selecciona del grupo que consiste en colangitis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), 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 fármacos y colestasis asociada a nutrición parenteral total. En una realización particular, la enfermedad colestásica es PBC.

Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico, en donde dicho(s) compuesto(s) es(son) el/los único(s) principio(s) activo(s) en la composición.

Según otro aspecto, la invención se refiere al compuesto o la composición farmacéutica como se ha definido antes, para su uso en el tratamiento de un trastorno fibrótico en combinación con al menos un agente terapéuticamente activo con actividad antifibrótica conocida seleccionado de pirfenidona o inhibidores de tirosina quinasa receptor (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 TGFβ y BMP, incluyendo los activadores del complejo latente de TGFβ tales como MMP2, MMP9, THBS1 o integrinas de superficie celular, receptores de TGFβ tipo I (TGFβRI) o tipo II (TGFβRII) y sus ligandos tales como TGFβ, activina, inhibina, nodal, hormona antimülleriana, 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 inhibitoras, o miembros de la ruta independiente de SMAD o no canónica que incluyen varias ramas de señalización de MAPK, TAK1, rutas de señalización de GTPasa tipo Rho, rutas de fosfatidilinositol-3 quinasa/AKT, proceso de EMT inducido por TGFβ o rutas de señalización de Hedgehog canónicas y no canónicas que incluyen ligandos de Hh o genes diana, o cualquier miembro de las rutas WNT o Notch que son susceptibles de influir en la señalización de TGFβ.

La invención se refiere además al compuesto o composición farmacéutica como se ha definido antes, para su uso en combinación con al menos un agente terapéuticamente activo seleccionado de inhibidores de JAK/STAT, otros agentes antiinflamatorios y/o agentes inmunosupresores.

Según una realización particular, el agente terapéuticamente activo se selecciona de glucocorticoides, AINE, ciclofosfamida, nitrosoureas, análogos de ácido fólico, análogos de purina, análogos de pirimidina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina, miriocina, tacrolimus, sirolimus, derivados de ácido fenólico, fingolimod, y otros moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato, anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra dianas tales como citoquinas proinflamatorias y receptores de citoquinas proinflamatorias, receptor de células T, integrinas.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende

- NTZ o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ; y
- TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de TZ(G).

La invención también se refiere a un kit de partes que comprende:

- NTZ o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ; y
- TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de TZ(G).

Según una realización particular, en cada aspecto y realización descritos en el presente documento, se usa NTZ o TZ, o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ.

Descripción de las figuras y tablas

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

- α-SMA: alfa Actina de músculo liso
- BMP: Proteína morfogenética ósea
- 5 ADNc: Ácido desoxirribonucleótido complementario
- COL1A1: Colágeno, tipo 1, Alfa 1
- CDA: Dieta deficiente en colina y definida en L-aminoácidos
- CDAc: Dieta deficiente en colina y definida en L-aminoácidos complementada con colesterol
- CHOL: Colesterol
- 10 CSAA: Dieta definida en L-aminoácidos complementada con colina
- CYPA: Ciclofilina A
- DDC: 3,5-Dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- 15 EMT: Transición epitelio-mesenquémica
- DTT: Ditioneitol
- FBS: Suero bovino fetal
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
- GDF: Factores de diferenciación de crecimiento
- 20 Hh: Hedhehog
- hHSC: Células estrelladas hepáticas humanas
- HSC: Células estrelladas hepáticas
- CI₅₀: Concentración inhibitoria semimáxima
- InMyoFib: Miofibroblastos intestinales
- 25 MMP2: Metalopeptidasa de matriz 2
- MMP9: Metalopeptidasa de matriz 9
- μl: microlitro
- NHLF: Fibroblastos normales de pulmón humano
- NTZ: Nitazoxanida
- 30 PBC: Colangitis biliar primaria
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- PSC: Colangitis esclerosante primaria
- qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- pMol: picomoles
- 35 rhFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante
- ARN: Ácido ribonucleico
- RT: Transcriptasa inversa

SmBM: Medio basal de células de músculo liso

SteCGS: Suplemento de crecimiento de células estrelladas

STeCM: Medio de células estrelladas

TBA: Ácidos biliares totales

5 TGFβ1: Factor de crecimiento tumoral beta 1

TGFBRI: Receptor de TGFβ tipo I

TGFBRII: Receptor de TGFβ tipo II

THBS1: Trombospondina 1

TMB: Tetrametilbencidina

10 TZ: Tizoxanida

TZG: Glucurónido de tizoxanida

TZ(G): TZ o TZG

Figura 1. La nitazoxanida y su metabolito tizoxanida inhiben la expresión inducida por TGFβ1 de la proteína α-SMA en HSC humanas

15 HSC privadas de suero se preincubaron durante 1 hora con NTZ (A) o TZ (B) antes de la activación con la citoquina profibrogénica TGFβ1 (1 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, se midió la expresión de α-SMA por ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición frente al control de TGFβ1. Los datos se presentan como media (triplicados) ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: p <0,05; **: p <0,01; ***: p <0,001 (comparación frente al grupo de TGFβ1 de 1 ng/ml)]. El ajuste de la curva y el cálculo de la concentración inhibitoria semimáxima (CI₅₀) se realizaron con el software XLFit 5.3.1.3.

Figura 2. La nitazoxanida y su metabolito tizoxanida reducen los transcritos de COL1A1 en las HSC humanas inducidas por TGFβ1

25 HSC privadas de suero se preincubaron durante 1 hora con NTZ (A) o TZ (B) antes de la activación con TGFβ1 (1 ng/ml). Después de 24 horas de incubación, se midió la expresión de COL1A1 mediante RT-qPCR. Los valores de expresión se transformaron en número de veces de inducción frente al control de TGFβ1. Los datos se presentan como media (triplicados) ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: p <0,05; **: p <0,01; ***: p <0,001 (comparación frente al grupo de TGFβ1 de 1 ng/ml)].

30 *Figura 3: La NTZ (A) o TZ (B) inhiben la expresión inducida por TGFβ1 de la proteína α-SMA en HSC de rata.*

35 Se añadieron NTZ (A) o TZ (B) a HSC de rata (rHSC) privadas de suero 1 hora antes de la activación con TGFβ1 (3 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, se midió la expresión de α-SMA por ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición frente al control de TGFβ1. Los datos se presentan como media (triplicados) ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: p <0,05; **: p <0,01; ***: p <0,001 (comparación frente al grupo de TGFβ1 de 3 ng/ml)].

Figura 4: La NTZ (A) o TZ (B) inhiben la expresión inducida por TGFβ1 de la proteína α-SMA en fibroblastos de pulmón humano.

40 Se añadió NTZ (A) o TZ (B) a fibroblastos de pulmón (NHLF) privados de suero 1 hora antes de la activación con TGFβ1 (1 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, se midió la expresión de α-SMA por ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición frente al control de TGFβ1. Los datos se presentan como media (triplicados) ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: p <0,05; **: p <0,01; ***: p <0,001 (comparación frente al grupo de TGFβ1 de 1 ng/ml)].

45 *Figura 5: La NTZ (A) o TZ (B) inhiben la expresión inducida por TGFβ1 de la proteína α-SMA en fibroblastos cardiacos humanos.*

Se añadieron NTZ (A) o TZ (B) a fibroblastos cardiacos (NHCF) privados de suero 1 hora antes de la activación con TGFβ1 (3 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, se midió la expresión de α-SMA por ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición frente al control de TGFβ1. Los datos se presentan como media

(triplicados) \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (comparación frente al grupo de TGF β 1 de 3 ng/ml)].

5 *Figura 6: La NTZ (A) o TZ (B) inhiben la expresión inducida por TGF β 1 de la proteína α -SMA en fibroblastos intestinales humanos.*

10 Se añadieron NTZ (A) o TZ (B) a fibroblastos intestinales (InMyoFib) privados de suero 1 hora antes de la activación con TGF β 1 (3 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, se midió la expresión de α -SMA por ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición frente al control de TGF β 1. Los datos se presentan como media (triplicados) \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de pruebas a posteriori de Bonferroni, usando el software Sigma Plot 11.0. [*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (comparación frente al grupo de TGF β 1 de 3 ng/ml)].

Figura 7: La administración oral crónica de nitazoxanida (10 mg/kg/día) evita el almacenamiento de colágeno inducido por CDAA en el hígado de ratones C57Bl/6J.

15 Ratones C57Bl/6 de 6 semanas de edad se alimentaron con una dieta de control (CSAA), dieta CDAA + dieta de CHOL al 1% (CDAAc) o dieta CDAAc complementada con NTZ 10 mg/kg/día durante 12 semanas. Después del sacrificio, se determinó el contenido de colágeno hepático. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t de Student usando el software Sigma Plot 11.0: CSAA frente a CDAAc (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) y CDAAc frente a NTZ 10 mg/kg/día (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

20 *Figura 8: La administración oral crónica de nitazoxanida (10 mg/kg/día) previene la fibrosis inducida por la dieta CDAAc en el hígado de ratones C57Bl/6J.*

25 Se alimentó a ratones C57Bl/6 de 6 semanas de edad con una dieta de control (CSAA), dieta CDAAc o dieta CDAAc complementada con NTZ 10 mg/kg/día durante 12 semanas. Después del sacrificio, se determinó el área de fibrosis hepática. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t de Student usando el software Sigma Plot 11.0: CSAA frente a CDAAc (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) y CDAAc frente a NTZ 10 mg/kg/día (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Figura 9: La administración oral crónica de nitazoxanida previene los niveles de concentración de TBA en la circulación inducidos por CCl4.

30 Se inyectó por vía intraperitoneal a ratas de 250-275 g, aceite de oliva (grupo ctrl) o CCl4 emulsionado en aceite de oliva (CCl4:aceite de oliva 1:2 v/v, concentración final de CCl4: 2 ml/kg) dos veces por semana durante 3 semanas. Simultáneamente, el grupo al que se inyectó aceite de oliva se sometió a una dieta de control mientras que los grupos a los que se inyectó CCl4 se sometieron a una dieta de control o una dieta complementada con NTZ 10 mg/kg/día o 30 mg/kg/día. Después del sacrificio, se determinó la concentración de TBA en la circulación. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t de Student usando el software Sigma Plot 11.0: Aceite de oliva frente a CCl4 (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) y CCl4 frente a NTZ (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Descripción detallada de la invención

40 En la parte experimental de la presente solicitud, se muestra que los compuestos etanoato de [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenilo] (nitazoxanida) y 2-hidroxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida (tizoxanida) tienen propiedades antifibróticas en varios modelos de fibrosis.

Además, se demuestra que la NTZ, o su metabolito activo TZ, tienen la capacidad de prevenir la aparición de niveles alterados de ácidos biliares en la circulación en un modelo de lesión hepática, mostrando la capacidad de NTZ y TZ para tratar enfermedades colestásicas. Por consiguiente, la presente invención se refiere a nuevos usos terapéuticos del compuesto NTZ o de un metabolito activo del mismo, tal como TZ o TZG.

45 En particular, la presente invención se refiere al compuesto NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico. La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico. Además, la invención se refiere al uso de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de un trastorno fibrótico. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La composición farmacéutica según la invención es útil para tratar un trastorno fibrótico.

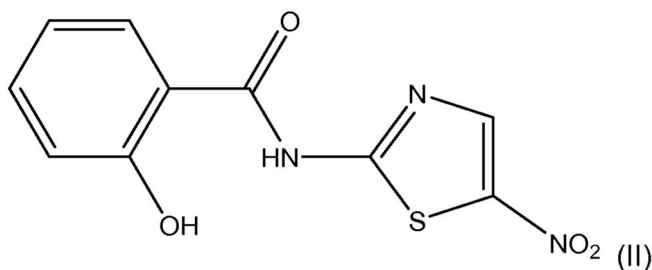
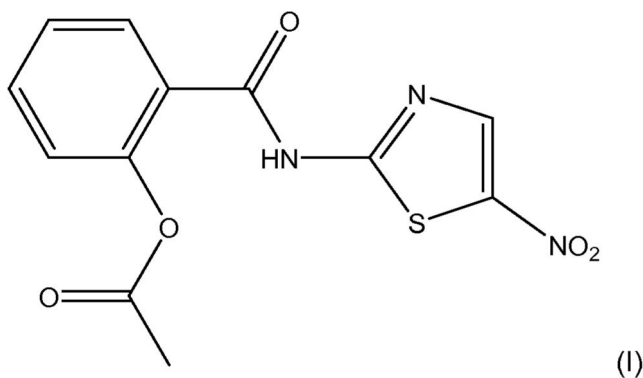
55 Aunque los agentes causantes o sucesos que inician trastornos fibróticos son bastante diversos y su patogénesis es variable, una característica común en los tejidos afectados es la presencia de una gran cantidad de fibroblastos activados llamados miofibroblastos ((Rosenbloom, Mendoza *et al.*, 2013)). El estímulo fibrótico tal como TGF β 1 puede

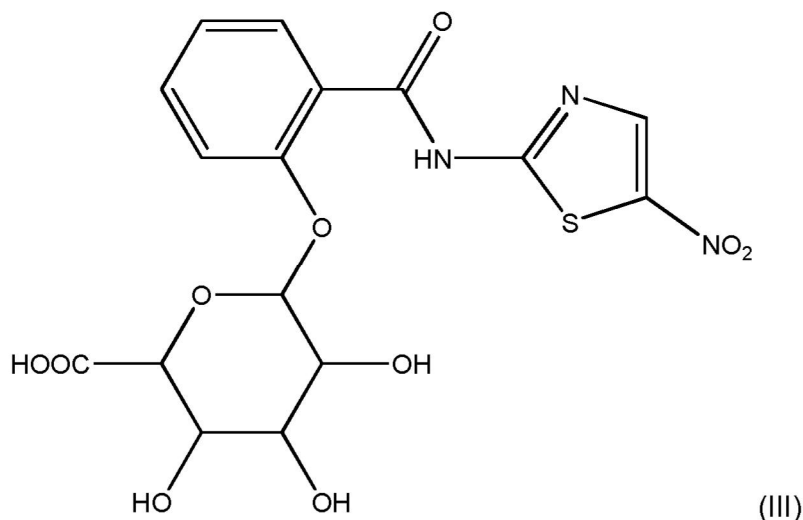
inducir la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos (Leask y Abraham, 2004; Leask, 2007). Los miofibroblastos son fibroblastos metabólica y morfológicamente distintivos cuya activación y proliferación juegan un papel clave en el desarrollo de la respuesta fibrótica. Además, estos miofibroblastos presentan funciones biológicas únicas que incluyen la expresión de proteínas implicadas en la formación de la matriz extracelular, tal como diferentes formas de colágeno, fibronectina y otras proteínas de la ECM. La inducción de la expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA) es una característica distintiva reconocida de fibroblastos quiescentes para la diferenciación a miofibroblastos activados y se puede usar como una lectura fisiológica para evaluar la potencia de los fármacos que interfieren con el proceso fibrótico. Los factores de crecimiento tumoral β , y en especial el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF β 1), son señales fisiológicas reconocidas que inducen la transformación fenotípica de fibroblastos en miofibroblastos profibróticos que expresan niveles altos de α -SMA y niveles altos de proteínas de la matriz extracelular, que luego son secretadas y forman el tejido cicatricial fibrótico.

Además, se sabe que la proliferación y activación de los fibroblastos es responsable de la producción de varios componentes del tejido conjuntivo (por ejemplo, colágenos, elastina, proteoglicanos y hialuronano) que constituyen la matriz extracelular (Kendall y Feghali-Bostwick, 2014).

Inesperadamente, la NTZ, pero también su metabolito activo TZ, ponen de manifiesto propiedades antifibróticas ya que estos compuestos reducen de manera dependiente de la dosis el nivel de α -SMA en células estrelladas hepáticas inducidas por TGF β y en fibroblastos primarios de otros órganos. Además, el tratamiento con NTZ o TZ también reprimía la expresión de colágeno (Col1a1) en HSC de rata activadas con TGF β , lo que confirma las propiedades antifibróticas de ambas moléculas. La actividad antifibrótica de la NTZ, o su metabolito TZ, también se demostró in vivo usando un modelo de fibrosis hepática inducida por CDAAc, en el que se ilustraban el menor contenido de colágeno hepático y la menor área de fibrosis. Además, en el modelo de lesión hepática inducida por CCl₄, se mostró que la NTZ, o su metabolito activo TZ, podría prevenir la inducción de niveles de ácidos biliares en la circulación, que representan un marcador de enfermedades colestásicas.

La NTZ, TZ y TZG para su uso según la invención tienen la siguiente fórmula (I), (II) y (III) respectivamente:





La NTZ y TZ eran conocidos por sus actividades antiparasitarias y antivirales, pero la técnica anterior no enseña que la NTZ, TZ y TZG tengan efectos anticoléstaticos y antifibróticos.

5 Los autores de la invención han demostrado de una manera nueva y original que estos compuestos tienen un efecto terapéutico en el tratamiento de la colestasis o la fibrosis.

Por consiguiente, la invención se refiere al compuesto NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ (G), para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a la NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), para su uso en la inhibición de la proliferación y/o activación de fibroblastos. Como se conoce en la técnica, los fibroblastos son responsables de la producción de fibras de colágeno u otros componentes del tejido conjuntivo de la matriz extracelular.

15 Según la presente invención, los términos "fibrosis", "enfermedad fibrótica", "trastorno fibrótico" y derivados de los mismos, indican una afección patológica de depósito excesivo de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido. Más específicamente, la fibrosis es un proceso patológico, que incluye una formación de cicatrices fibróticas persistentes y una sobreproducción de matriz extracelular por el tejido conjuntivo, como respuesta al daño tisular. Fisiológicamente, el depósito de tejido conjuntivo puede destruir la arquitectura y función del órgano o tejido subyacente.

20 Según la presente invención, la fibrosis o trastorno fibrótico puede estar asociado con cualquier fibrosis de órganos o tejidos. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de fibrosis de órganos particulares incluyen fibrosis hepática, intestinal, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, de tendón, cartílago, cardíaca, pancreática, pulmonar, útero, sistema nervioso, testicular, pene, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestinal (p. ej., intestino delgado), vía biliar, tejido blando (p. ej., mediastino o retroperitoneo), médula ósea, articular o estomacal, en particular fibrosis hepática, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, de tendón, cartílago, cardíaca, pancreática, pulmonar, útero, sistema nervioso, testicular, ovario, glándula suprarrenal, arteria, vena, colon, intestinal (p. ej., intestino delgado), vía biliar, tejido blando (p. ej., mediastino o retroperitoneo), médula ósea, articular o estomacal.

25 Según la presente descripción, los términos "colestasis" o "enfermedad colestásica" o "trastorno colestásico" y derivados de los mismos indican una afección patológica definida por una disminución en el flujo biliar debido a la secreción deteriorada por hepatocitos o a la obstrucción del flujo biliar a través de vías biliares intra o extrahepáticos. Por tanto, la definición clínica de colestasis es cualquier afección en la que son retenidas sustancias que normalmente se excretan en la bilis.

30 En una realización particular, el trastorno fibrótico se selecciona en el grupo que consiste en fibrosis hepática, intestinal, pulmonar, cardíaca, renal, muscular, cutánea, de tejido blando (p. ej., mediastino o retroperitoneo), médula ósea, intestinal y articular (p. ej., rodilla, hombro u otras articulaciones).

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

35 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 (NASH), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cutánea, fibrosis ocular, fibrosis endomiocárdica, fibrosis de mediastino, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva (una complicación de la neumoconiosis de los trabajadores del carbón), fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedad

5 inflamatoria crónica de las vías respiratorias (EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador, tuberculosis), fibrosis hepática inducida por alcohol o fármacos, 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 antiguo, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, algunas formas de capsulitis adhesiva, colangiopatías fibrosantes crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (PSC), colangitis biliar primaria (PBC), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar tipo 3 (PFIC3), fibrosis periimplantacional y asbestosis.

10 Según una realización particular de la descripción, la enfermedad colestásica se selecciona del grupo que consiste en colangitis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), 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 fármacos y colestasis asociada a nutrición parenteral total. En una realización particular, la enfermedad colestásica es PBC o PSC, en particular PBC

15 El término "tratamiento" o "tratar" se refiere al tratamiento curativo o preventivo de un trastorno fibrótico en un sujeto que lo necesite. El tratamiento implica la administración del compuesto, en particular comprendido en una composición farmacéutica, a un sujeto que tiene un trastorno declarado, es decir, a un paciente, para curar, retrasar, invertir o ralentizar la progresión del trastorno, mejorando así la afección del sujeto. También se puede administrar un tratamiento a un sujeto que esté sano o que tenga riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico para prevenir o retrasar el trastorno.

20 Por lo tanto, según la invención, el tratamiento de un trastorno fibrótico implica la administración de NTZ o TZ(G), o de una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o de una composición farmacéutica que los contiene, a un sujeto que tiene un trastorno declarado, para curar, retrasar, invertir o ralentizar la progresión del trastorno, mejorando así la afección del paciente, o a un sujeto sano, en particular un sujeto que está en riesgo de desarrollar un trastorno colestásico o fibrótico.

25 El sujeto que se va a tratar es un mamífero, preferiblemente un ser humano. El sujeto que se va a tratar de acuerdo con la invención se puede seleccionar basándose en varios criterios asociados a enfermedades colestásicas o fibróticas tales como tratamientos farmacológicos previos, patologías asociadas, genotipo, exposición a factores de riesgo, infección viral, así como basándose en la detección de cualquier biomarcador relevante que se pueda evaluar por métodos de generación de imágenes y métodos inmunológicos, bioquímicos, enzimáticos, químicos o de detección de ácidos nucleicos.

30 La síntesis de NTZ o TZ se puede llevar a cabo, por ejemplo, como describen Rossignol y Cavier, 1975, o por cualquier otra forma de síntesis conocida por un experto en la técnica. La TZG se puede sintetizar, por ejemplo, de acuerdo con un método de síntesis conocido en la técnica, tal como en 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.

35 En una realización particular, el tratamiento de un trastorno fibrótico puede comprender la administración de una combinación tanto de NTZ como TZ(G), o de una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ y TZ(G). Según una variante de esta realización, tanto NTZ como TZ(G) están comprendidos juntos en una única composición.

40 En otra variante de esta realización, NTZ y TZ(G) son para administración simultánea, secuencial o separada en terapia, por lo que posiblemente se incluyan en diferentes composiciones. En caso de administración secuencial, la NTZ se puede administrar antes de la administración de TZ(G), o TZ(G) se puede administrar antes de la administración de NTZ. Como tal, la invención también se refiere a un kit de partes que comprende (i) NTZ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende NTZ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (ii) TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para administración simultánea, secuencial o separada.

45 NTZ o TZ(G) se pueden formular como sales farmacéuticamente aceptables, en particular sales de ácido o base compatibles con el uso farmacéutico. Las sales de NTZ y TZ(G) incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Estas sales se pueden obtener durante la etapa de purificación final del compuesto o incorporando la sal al compuesto previamente purificado.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad fibrótica.

55 La composición farmacéutica que comprende NTZ o TZ(G), en particular para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico, también puede comprender uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (p. ej., soluciones salinas, soluciones fisiológicas, soluciones isotónicas, etc., compatibles con el uso farmacéutico y bien conocido por un experto en la técnica).

Estas composiciones también pueden comprender además uno o varios agentes o vehículos elegidos entre dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o vehículos útiles para estas formulaciones

(líquidos y/o inyectables y/o sólidos) son en particular metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, goma arábiga, liposomas, etc.

5 Estas composiciones se pueden formular en forma de suspensiones inyectables, jarabes, geles, aceites, pomadas, píldoras, comprimidos, supositorios, polvos, cápsulas de gel, cápsulas, aerosoles, etc., finalmente mediante formas galénicas o dispositivos que aseguren una liberación prolongada y/o lenta. Para este tipo de formulaciones se pueden usar ventajosamente agentes tales como celulosa, carbonatos o almidones.

10 La NTZ o TZ(G) se pueden administrar por diferentes vías y en diferentes formas. Por ejemplo, el/los compuesto(s) se pueden administrar por un modo sistémico, vía oral, 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 la NTZ o TZ(G) de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización particular, el compuesto se formula en forma de un comprimido. En otra realización particular, el compuesto se administra por vía oral.

15 La NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En el contexto de la invención, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto suficiente para producir el efecto terapéutico deseado.

20 La frecuencia y/o la dosis respecto a la administración puede ser adaptada por un experto en la técnica, en función del paciente, la patología, la forma de administración, etc. Típicamente, la NTZ o TZ(G) se pueden administrar para el tratamiento de una enfermedad colestásica o fibrótica en una dosis comprendida entre 0,01 mg/día y 4000 mg/día, tal como de 50 mg/día a 2000 mg/día, tal como de 100 mg/día a 2000 mg/día; y en particular de 100 mg/día a 1000 mg/día. En una realización particular, la NTZ, TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administra en una dosis de aproximadamente 1000 mg/día (es decir, en una dosis de 900 a 1100 mg/día), en particular 1000 mg/día. En una realización particular, la NTZ, TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administra por vía oral en una dosis de aproximadamente 1000 mg/día, en particular de 1000 mg/día, en particular como un comprimido. La administración se puede realizar diariamente o incluso varias veces al día, si es necesario. En una realización, el compuesto se administra al menos una vez al día, tal como una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En una realización particular, el compuesto se administra una o dos veces al día. En particular, la administración oral se puede realizar una vez al día, durante una comida, por ejemplo durante el desayuno, almuerzo o cena, tomando un comprimido que comprende el compuesto en una dosis de aproximadamente 1000 mg, en particular en una dosis de 1000 mg. En otra realización, se administra un comprimido por vía oral dos veces al día, tal como administrando un primer comprimido que comprende el compuesto en una dosis de aproximadamente 500 mg (es decir, en una dosis de 450 a 550 mg), en particular en una dosis de 500 mg, durante una comida, y se administra un segundo comprimido que comprende el compuesto en una dosis de aproximadamente 500 mg, en particular en una dosis de 500 mg, durante otra comida el mismo día.

De manera adecuada, el curso del tratamiento con NTZ, TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos es durante al menos 1 semana, en particular durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 24 semanas o más. En particular, el curso del tratamiento con NTZ, TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos es durante al menos 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o al menos 5 años.

40 En una realización particular, la invención se refiere al tratamiento de una enfermedad fibrótica, en particular fibrosis hepática, más particularmente fibrosis hepática consecutiva a NASH, en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de NTZ o TZ(G) o de una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), en particular administrar NTZ en una dosis de 1000 mg/día, en particular administrar un comprimido que contiene 500 mg de NTZ dos veces al día, en particular durante dos comidas diferentes.

45 En una realización particular, la invención se refiere al uso de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G) para el tratamiento de una enfermedad fibrótica, en combinación con al menos otro agente terapéuticamente activo con actividad antifibrótica conocida. Según una variante de esta realización, la NTZ o TZ(G) se pueden combinar con cualquier compuesto antifibrótico tal como pirfenidona o inhibidores de tirosina quinasa receptor (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 TGFβ y BMP, incluyendo activadores del complejo TGFβ latente tales como MMP2, MMP9, THBS1 o integrinas de la superficie celular, receptores de TGFβ tipo I (TGFBR1) o tipo II (TGFBR2) y sus ligandos tales como TGFβ, activina, inhibina, nodal, hormona antimülleriana, 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 independientes de SMAD o no canónicas que incluyen varias ramas de señalización de MAPK, TAK1, rutas de señalización de GTPasa tipo Rho, rutas de fosfatidilinositol-3 quinasa/AKT, proceso de EMT inducido por TGFβ o rutas de señalización de Hedgehog canónicas y no canónicas que incluyen ligandos de Hh o genes diana, o cualquier miembro de las rutas WNT o Notch que son susceptibles de influir en la señalización de TGFβ.

Por lo tanto, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o de TZ(G), en combinación con al menos un agente terapéuticamente activo con actividad antifibrótica conocida seleccionado de pirfenidona o inhibidores de tirosina quinasa receptor (RTK) tales como nintedanib, sorafenib y otros RTK, o bloqueadores del receptor de angiotensina II (AT1), o inhibidor de CTGF, o cualquier compuesto antifibrótico susceptible de interferir con las rutas activadas por TGFβ y BMP, incluyendo activadores del complejo TGFβ latente tales como MMP2, MMP9, THBS1 o integrinas de la superficie celular, receptores de TGFβ tipo I (TGFBR1) o tipo II (TGFBR2) y sus ligandos tales como TGFβ, activina, inhibina, nodal, hormona antimülleriana, 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 independientes de SMAD o no canónicas que incluyen varias ramas de señalización de MAPK, TAK1, rutas de señalización de GTPasa tipo Rho, rutas de fosfatidilinositol-3 quinasa/AKT, proceso de EMT inducido por TGFβ o rutas de señalización de Hedgehog canónicas y no canónicas que incluyen ligandos de Hh o genes diana, o cualquier miembro de las rutas WNT o Notch que son susceptibles de influir en la señalización de TGFβ, para su uso en un método para tratar un trastorno fibrótico.

En otra realización particular, otras clases de moléculas que también se podrían combinar con NTZ o TZ(G) incluyen inhibidores de JAK/STAT u otros agentes antiinflamatorios y/o inmunosupresores. Una lista no exhaustiva de estos agentes incluye, pero no se limita a glucocorticoides, AINE, ciclofosfamida, nitrosoureas, análogos del ácido fólico, análogos de purina, análogos de pirimidina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina, miriocina, tacrolimus, sirolimus, derivados del ácido fólico, fingolimod y otros moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato, anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra objetivos tales como citoquinas proinflamatorias y receptores de citoquinas proinflamatorias, receptor de células T, integrinas. Otras clases de moléculas que también se podrían combinar con NTZ o TZ(G) incluyen moléculas que podrían mejorar potencialmente la exposición o el efecto de NTZ o TZ(G).

En otra realización particular, la invención se refiere a una combinación de NTZ, TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con al menos otro agente terapéuticamente activo con actividad antifibrótica conocida, o con inhibidores de JAK/STAT, u otros agentes antiinflamatorios y/o inmunosupresores. La combinación puede ser en forma de una única composición farmacéutica que comprende los diferentes ingredientes activos, incluyendo NTZ, TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una variante, la combinación es un kit de partes que comprende NTZ, TZ(G) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y otro principio activo tal como otro agente antifibrótico, un inhibidor de JAK/STAT u otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Dicho kit de partes puede ser para la administración simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un trastorno colestásico o fibrótico.

En otra realización, el compuesto NTZ o TZ(G), o una combinación de NTZ y TZ(G), se administra como el único principio activo. Por consiguiente, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o de TZ(G), o una mezcla de los mismos, para su uso en un método para tratar un trastorno fibrótico, en donde dicho(s) compuesto(s) es(son) el único principio activo en la composición.

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de enfermedades colestáticas o fibróticas que comprende la administración de NTZ o TZ(G), o una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ(G), en particular en forma de una composición farmacéutica que contiene NTZ o TZ.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit de piezas que comprende:

- Nitazoxanida o una sal farmacéuticamente aceptable de nitazoxanida; y
- Tizoxanida o una sal farmacéuticamente aceptable de tizoxanida.

Los compuestos del kit de partes de la invención se administran de forma simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un trastorno fibrótico.

En otra realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de enfermedades fibróticas que comprende administrar dos veces al día a un paciente que lo necesite, que tiene una enfermedad colestásica o fibrótica (en particular a un paciente con NASH o a un paciente que tiene una fibrosis hepática) un comprimido que contiene 500 mg de NTZ, en particular durante una comida (tal como durante el desayuno, el almuerzo o la cena).

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

50 Materiales y métodos

Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Fluka n.º cat. 41640). La nitazoxanida (INTERCHIM n.º cat. RQ550U) y tizoxanida (INTERCHIM n.º cat. RP253) se obtuvieron comercialmente.

Cultivo de hHSC

Las células estrelladas hepáticas primarias humanas (hHSC) (Innoprot) se cultivaron en medio STeCM (ScienCell n.º

cat. 5301) que se complementó con 2% de suero bovino fetal (FBS, ScienCell n.º cat. 0010), 1% de penicilina/estreptomicina (ScienCell n.º cat. 0503) y suplemento de crecimiento de células estrelladas (SteCGS; ScienCell n.º cat. 5352). Los matraces de cultivo celular se recubrieron con poli-L-lisina (Sigma n.º cat. P4707) para una mejor adherencia.

5 Activación de hHSC con TGF-β1

Las células estrelladas hepáticas primarias humanas (hHSC) (Innoprot) se cultivaron en condiciones estándar, como se ha descrito antes. Posteriormente, las células se sembraron en placas con una densidad de 7×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos para estudios de expresión génica, y con una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos para la medición de α-SMA por ELISA. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron con PBS (Invitrogen n.º cat. 14190). Las hHSC se privaron durante 24 horas en medio sin suero y sin SteCGS. Para los tratamientos con NTZ o TZ, las hHSC privadas de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguido de la adición de los estímulos profibrogénicos TGFβ1 (PeproTech n.º cat. 100-21, 1 ng/ml) en medio sin suero y sin SteCGS durante un período adicional de 24 o 48 horas (el punto de tiempo se indica en las leyendas de las figuras). Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen, n.º de cat. 14190) antes de la adición de 50 μl de tampón de lisis (reactivo CelLytic™ MT; Sigma n.º C3228). Después, las placas se incubaron durante 30 min en hielo usando un agitador de placa, antes de almacenamiento a -20°C.

Activación de HSC de rata con TGFβ1:

Las células estrelladas hepáticas primarias de rata (rHSC) (Innoprot) se cultivaron en medio STeCM (ScienCell n.º cat. 5301) que se complementó con suero bovino fetal al 2% (FBS, ScienCell n.º cat. 0010), 1% de penicilina/estreptomicina (ScienCell n.º cat. 0503) y suplemento de crecimiento de células estrelladas (SteCGS; ScienCell n.º cat. 5352). Para los experimentos de activación con TGFβ1, las rHSC se sembraron en placa con una densidad de 10×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron con PBS (Invitrogen n.º cat. 14190). Las rHSC se privaron durante 24 horas en medio sin suero y sin SteCGS. Para los tratamientos con NTZ o TZ, las rHSC privadas de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguido de la adición de los estímulos profibrogénicos TGFβ1 (PeproTech n.º cat. 100-21, 3 ng/ml) en medio sin suero y sin SteCGS durante un período adicional de 48 horas. Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen, n.º de cat. 14190) antes de la adición de 50 μl de tampón de lisis (reactivo CelLytic™ MT; Sigma n.º C3228). A continuación, las placas se incubaron durante 30 min en hielo usando un agitador de placa, antes de almacenamiento a -20°C.

Activación de NHLF con TGFβ1

Los fibroblastos de pulmón humanos normales (NHLF) (Lonza) se cultivaron en medio basal de fibroblastos (FBM) (Lonza n.º cat. CC-3131) que se complementó con el kit FGM-2 SingleQuots™ (Lonza n.º cat. CC-3132). El medio completo contiene suero bovino fetal al 2%. Para los experimentos de activación con TGFβ1, los NHLF se sembraron en placa con una densidad de 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron con PBS (Invitrogen n.º cat. 14190). Los NHLF se privaron durante 24 horas en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B. Para los tratamientos con NTZ o TZ, los NHLF privados de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguido de la adición de los estímulos profibrogénicos TGFβ1 (PeproTech n.º cat. 100-21, 1 ng/ml) en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B durante un período adicional de 48 horas. Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen, n.º de cat. 14190) antes de la adición de 50 μl de tampón de lisis (reactivo CelLytic™ MT; Sigma n.º C3228). Después, las placas se incubaron durante 30 min en hielo usando un agitador de placa, antes de almacenamiento a -20°C.

Activación de NHCF-V con TGFβ1:

Los fibroblastos cardíacos humanos normales (ventrículo) (NHCF-V) (Lonza) se aislaron de tejido cardíaco adulto normal. Las células se cultivaron en medio basal de fibroblastos (FBM) (Lonza n.º cat. CC-3131) que se complementó con el kit FGM™-3 BulletKit™ (Lonza n.º cat. CC-4525). El medio completo contiene suero bovino fetal al 10%. Para los experimentos de activación con TGFβ1, el NHCF-V se sembró en placas con una densidad de 6×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron con PBS (Invitrogen n.º cat. 14190). Los NHCF se privaron durante 24 horas en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B. Para los tratamientos con NTZ o TZ, los NHCF privados de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguido de la adición del estímulo profibrogénico TGFβ1 (PeproTech n.º cat. 100-21, 3 ng/ml) en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B durante un período adicional de 48 horas. Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen, n.º de cat. 14190) antes de la adición de 50 μl de tampón de lisis (reactivo CelLytic™ MT; Sigma n.º C3228). Después, las placas se incubaron durante 30 min en hielo usando un agitador de placa, antes de almacenamiento a -20°C.

Activación de InMyoFib con TGFβ1:

Los miofibroblastos intestinales humanos (InMyoFib) (Lonza) se cultivaron en medio basal de células de músculo liso (SmBM-2™) (Lonza n.º cat. CC-3181) que se complementó con SmGMTM-2 BulletKit™ (Lonza n.º cat. CC-4149). El medio completo contiene suero bovino fetal al 5%. Para los experimentos de activación con TGFβ1, los InMyoFib se sembraron en placa con una densidad de 10×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se

retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron con PBS (Invitrogen n.º cat. 14190). Los InMyoFib se privaron durante 24 horas en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B. Para los tratamientos con NTZ o TZ, los InMyoFib privados de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguido de la adición de los estímulos profibrogénicos TGFβ1 (PeproTech n.º cat. 100-21, 3 ng/ml) en medio sin suero, sin insulina y sin rhFGF-B durante un período adicional de 48 horas. Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen, n.º de cat. 14190) antes de la adición de 50 µl de tampón de lisis (reactivo CellLytic™ MT; Sigma n.º C3228). Después, las placas se incubaron durante 30 min en hielo usando un agitador de placa, antes de almacenamiento a -20°C.

ELISA de α-SMA

El nivel de α-SMA se midió usando un ELISA tipo sándwich. Brevemente, los pocillos de una placa ELISA se recubrieron primero con el anticuerpo de captura (monoclonal de ratón anti-ACTA2, Abnova) a 4°C durante la noche. Después de 3 lavados en PBS + Tween 20 al 0,2%, se añadió una solución de bloqueo que consistía en PBS + BSA al 0,2% durante una hora seguido de otro ciclo de lavado. Los lisados de células se transfirieron a los pocillos para la unión al anticuerpo de captura durante un periodo de 2 h a temperatura ambiente. Después del procedimiento de lavado, se añadió el anticuerpo de detección (monoclonal de ratón anti-ACTA2 biotinilado, Abnova) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de 3 lavados. Para la detección, se aplicó primero una estreptavidina conjugada con HRP (R&D Systems n.º cat. DY998) durante 30 min a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió el sustrato HRP TMB (BD, n.º 555214) y se incubó durante 7 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras la oxidación, la TMB forma un producto de reacción azul soluble en agua que se vuelve amarillo con la adición de ácido sulfúrico (solución de parada), lo que permite 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.

Expresión de genes

El ARN total se aisló usando Nucleospin® 96 RNA (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARN totales (500 ng para muestras in vitro) se transcribieron de forma inversa en ADNc usando M-MLV RT (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney) (Invitrogen n.º cat. 28025) en tampón 1X RT (Invitrogen), DTT 1 mM (Invitrogen), dNTP 0,18 mM (Promega), 200 ng de pdN6 (Amersham) y 30 U de inhibidor de RNasa (Promega).

Después se llevó a cabo la PCR cuantitativa usando el sistema de detección de PCR en tiempo real de un solo color MyiQ (Biorad). Brevemente, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en formato de placa de 96 pocillos en 25 µl de volumen total que contiene 1 µl de reacción de transcripción inversa, 0,5 µl de cebadores inversos y directos (10 pmol cada uno) y 12,5 µl de 2X supermezcla de iQ SYBR Green (BioRad, 1725006CUST). Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Cebadores humanos

Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')
36B4 directo	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC (SEQ ID NO: 1)
36B4 inverso	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG (SEQ ID NO: 2)
COL1A1 directo	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO: 3)
COL1A1 inverso	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO: 4)

Los niveles de expresión se normalizaron usando la expresión del gen 36B4 como referencia en muestras humanas.

Para cada gen, las curvas de referencia se dibujaron seleccionando los mejores puntos (al menos tres puntos) con el fin de tener una eficiencia de la reacción de PCR cercana a 100% y un coeficiente de correlación cercano a 1. Los niveles de expresión se determinaron usando la ecuación de la curva de referencia tanto para el gen de mantenimiento como para el gen objetivo (teniendo en cuenta la eficiencia de la PCR específica de cada gen objetivo).

Evaluación de la NTZ en un modelo de fibrosis hepática crónica inducida por dieta CDAAc

El efecto antifibrótico de la NTZ se evaluó en un modelo murino de fibrosis hepática experimental inducida por dieta CDAAc. Se alimentaron ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad durante 12 semanas con una dieta de control (CSAA), dieta CDAAc o dieta CDAAc complementada con NTZ 10 mg/kg/día durante 12 semanas. El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron dos veces por semana. El último día de tratamiento, los ratones se sacrificaron después de un período de ayuno de 6 h. El hígado se extirpó rápidamente para estudios bioquímicos e histológicos.

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

Evaluación de la NTZ en modelo de daño hepático inducido por CCl4

El efecto antifibrótico de la NTZ se evaluó en un modelo de rata de lesión hepática inducida por CCl4.

- 5 Las ratas OFA S;Dawley (peso corporal inicial 250-275 g) se asignaron aleatoriamente según su peso corporal a 4 grupos y se trataron durante 3 semanas. Se inyectó a las ratas por vía intraperitoneal aceite de oliva (grupo ctrl) o CCl4 emulsionado en aceite de oliva (CCl4:aceite de oliva 1:2 v/v, concentración final de CCl4: 2 ml/kg) dos veces por semana. Simultáneamente, los grupos a los que se inyectó aceite de oliva se sometieron a una dieta de control mientras que los grupos a los que se inyectó CCl4 se sometieron a una dieta de control o una dieta complementada con NTZ. Se prepararon 2 regímenes que contenían NTZ que correspondían, respectivamente, a una exposición de 10 o 30 mg/kg/día. El último día de tratamiento, las ratas se sacrificaron después de un período de ayuno de 6 h. Se recogieron muestras de sangre y se aisló el suero para análisis bioquímicos.

Evaluación de la NTZ en el modelo DDC de colestasis:

- 15 Los ratones C57BL/6 se alimentarán durante 8 semanas con una dieta complementada con DDC al 0,1% o con una dieta complementada con DDC al 0,1% que contenga NTZ 100 mg/kg/día, o una dieta estándar para ratones (Ssniff). El último día de tratamiento, los ratones se sacrificarán después de un período de ayuno de 6 h. Se tomarán muestras de sangre para análisis bioquímicos y el hígado se extirpará rápidamente para estudios bioquímicos e histológicos.

Evaluación de la NTZ en un modelo de fibrosis hepática crónica inducida por CCl4

- 20 Ratones C57BL/6 de 9 semanas de edad se someterán a una dieta de control o una dieta complementada con NTZ durante 6 semanas. Se prepararán 2 regímenes que contengan NTZ que correspondan, respectivamente, a una exposición de NTZ de 30 o 100 mg/kg/día. Simultáneamente, y durante un total de 6 semanas, los ratones se tratarán 3 veces por semana con CCl4 disuelto en aceite de oliva o vehículo mediante alimentación con sonda oral. La cantidad de CCl4 se aumentará progresivamente de 0,875 ml/kg a 2,5 ml/kg. El último día de tratamiento, los ratones se sacrificarán después de un período de ayuno de 6 h. Se recogerán muestras de sangre para análisis bioquímicos de suero. El hígado se extirpará rápidamente para estudios bioquímicos, histológicos y de expresión.

Histología

Inclusión y seccionamiento de tejidos:

- 30 Las láminas de hígado se fijaron primero durante 12 horas en una solución de formalina al 4%. Después, los trozos de hígado se lavaron durante 30 minutos en PBS y se deshidrataron en soluciones de etanol (baños sucesivos al 70, 80, 95 y 100% de etanol). Los trozos de hígado se incubaron en tres baños diferentes de xileno (Sigma-Aldrich n.º cat. 534056), seguidos de dos baños en parafina líquida (56°C). Después, los trozos de hígado se pusieron en rejillas que se llenaron suavemente con Histowax® para cubrir completamente el tejido.

Los bloques de parafina que contenían los trozos de tejido se sacaron de las rejillas y se almacenaron a temperatura ambiente. Los bloques de hígado se cortaron en láminas de 3 µm.

- 35 Tinción con rojo picrosirius

- Las secciones de hígado se desparafinaron, se rehidrataron y se incubaron durante 15 minutos en una solución de Fast Green FCF al 0,1% (Sigma-Aldrich, n.º cat. F7258) antes de enjuagar en un baño de ácido acético al 0,5% (Panreac, n.º cat. 131008.1611). Las secciones de hígado se enjuagaron en agua y se incubaron durante 30 minutos en una solución de rojo sirius al 0,1% (Direct Red 80, Fluka n.º cat. 43665) en ácido pícrico acuoso saturado (Sigma-Aldrich n.º cat. P6744). Las secciones de hígado finalmente se deshidrataron y se montaron usando el medio CV Mount (Leica, n.º cat. 14046430011).

Exámenes histológicos

- 45 La identidad de la muestra de hígado estaba oculta para el examinador. Se generaron láminas virtuales usando el escáner Panoramic 250 de 3D Histech. Usando el software Quant Center (3D Histech, que incluye los módulos Pattern Quant e Histo Quant), se cuantificaron las áreas teñidas con colágeno. Brevemente, se usó Pattern Quant para detectar la estructura de tejido relevante y medir la superficie. Después, se usó Histo Quant para detectar el contenido de colágeno teñido y para la medición del área total y los porcentajes, basado en un método de umbral de color. El área de fibrosis se expresó como el porcentaje de superficie de colágeno sobre el tejido entero.

Medición del contenido de colágeno hepático

- 50 El contenido de colágeno hepático se determinó usando el kit QuickZyme adecuado (ensayo de colágeno total, n.º cat. QZB-totcol2). El ensayo se basa en la detección de hidroxiprolina, que es un aminoácido no proteinogénico que se encuentra principalmente en la triple hélice del colágeno. Por lo tanto, la hidroxiprolina en los hidrolizados tisulares se

puede usar 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).

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

Evaluación de la NTZ en el modelo de BDL

Se llevará a cabo ligadura quirúrgica de las vías biliares en ratas con el fin de inducir una colestasis extrahepática y posteriormente fibrosis hepática. Después de un periodo de recuperación de 2 semanas, los animales se tratarán con 30 o 100 mg/kg/día de NTZ durante una o dos semanas. El último día de tratamiento, los ratones se sacrificarán después de un período de ayuno de 6 h. Se recogerán muestras de sangre para análisis bioquímicos de suero. El hígado se extirpará rápidamente para estudios bioquímicos, histológicos y de expresión.

Medición de la concentración plasmática de ácidos biliares totales

La concentración plasmática de ácidos biliares totales (TBA) se determinó usando el kit Randox adecuado para el analizador automático Daytona (Randox, n.º cat. BI 3863). En presencia de tío-NAD, la enzima 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- α HSD) convierte los ácidos biliares en 3-cetoesteroides y tío-NADH. La reacción es reversible y la 3- α HSD puede convertir 3-cetoesteroides y tío-NADFH en ácidos biliares y tío-NAD. En presencia de un exceso de NADH, el ciclo de la enzima se produce de forma eficaz y la velocidad de formación de tío-NADH se determina midiendo el cambio específico de absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresan en μ mol/l.

Resultados y conclusiones:

La persistencia anormal de miofibroblastos diferenciados es una característica de muchas enfermedades fibróticas. Después de una lesión hepática, las HSC quiescentes experimentan un proceso de activación que se caracteriza por una diferenciación en miofibroblastos positivos para (α -SMA). En un intento por encontrar nuevas moléculas antifibróticas, se realizó el cribado fenotípico de una biblioteca de fármacos aprobados por la FDA en un modelo de HSC humanas activadas con la citoquina profibrogénica TGF β 1. Los niveles de α -SMA, una característica distintiva de las lesiones fibróticas, se usaron para evaluar la potencia de los fármacos para interferir con el proceso fibrótico. La campaña de cribado condujo a la identificación de nitazoxanida (NTZ), que redujo de manera dependiente de la dosis el nivel de α -SMA en las HSC inducidas por TGF β . En general, la NTZ presentaba una CI₅₀ comprendida entre 0,1 y 3 μ M (Fig. 1A). Puesto que se sabe que la NTZ se hidroliza rápidamente en un metabolito activo tizoxanida (TZ) (Broekhuysen, Stockis *et al.*, 2000), también se evaluó la actividad antifibrótica de este metabolito en HSC. La TZ mostró un perfil similar al fármaco original con una CI₅₀ comprendida entre 0,1 y 3 μ M (Fig. 1B). Otros marcadores de estimulación de TGF β eran reducidos por ambos compuestos, incluyendo el colágeno de matriz extracelular 1A1 (COL1A1) (Fig. 2). Los ensayos de toxicidad confirmaron que los niveles reducidos de α -SMA no se debían a la toxicidad o apoptosis de HSC (datos no mostrados).

La NTZ y TZ también reducían los niveles de α -SMA en las HSC activadas por TGF β derivadas de ratas (Fig. 3). Además, el potencial antifibrótico de la NTZ y TZ se extendía a fibroblastos derivados de otros tejidos, incluyendo los fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF) (Fig. 4), fibroblastos cardiacos humanos normales (Fig. 5) y miofibroblastos intestinales humanos (InMyoFib) (Fig. 6). En todos estos modelos de fibrosis, la NTZ y TZ mostraron efectos antifibróticos significativos en una concentración de 1 μ M. La eficacia in vivo de la NTZ se evaluó en un modelo de fibrosis hepática experimental inducida por dieta CDAA con colesterol. La administración oral crónica de nitazoxanida 10 mg/kg/día demostró propiedades antifibróticas reflejadas por un contenido de colágeno hepático significativamente menor (Fig. 7) y un área de fibrosis hepática reducida por examen histológico (Fig. 8). En el modelo in vivo de lesión hepática inducida por CCl₄, la NTZ evitó el aumento patológico de la concentración de TBA en la circulación (Fig. 09), que es un marcador asociado con la colestasis (Chang 2013)

En conclusión, los autores de la solicitud han descubierto actividades antifibróticas y anticolestáticas inesperadas para el agente antiparasitario NTZ. Estos resultados demuestran que NTZ y/o su metabolito activo TZ pueden proporcionar beneficios terapéuticos en enfermedades colestásicas y 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.

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.
- 5 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." *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 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.
- 15 Kendall, R. T. y C. A. Feghali-Bostwick (2014). "Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators." *Front Pharmacol* 5: 123.
- Leask, A. (2007). "TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response." *Cardiovasc Res* 74(2): 207-212.
- Leask, A. y D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." *FASEB J* 18(7): 816-827.
- Megraudd, F., A. Occhialini, *et al.* (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). Todos los derechos reservados): 2836-2840.
- 20 Pankuch, G. A. y 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). Todos los derechos reservados): 1112-1117.
- Rosenbloom, J., F. A. Mendoza, *et al.* (2013). "Strategies for anti-fibrotic therapies." *Biochim Biophys Acta* 1832(7): 1088-1103.
- 25 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.
- 30 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.

Listado de secuencias

- <110> GENFIT
- 35 <120> MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES COLESTÁSICAS Y FIBRÓTICAS
- <130> B2223EPPC02
- <160> 4
- 40 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 25
- <212> ADN
- 45 <213> artificial
- <220>
- <223> cebador
- 50 <400> 1
- catgctcaac atctcccct tctcc 25
- <210> 2

ES 2 935 185 T3

<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 2

10 ggaaggtgt aatccgtctc cacag 25

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
15 <213> artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 3

aggcgaaca ggtgacagag 20

<210> 4
25 <211> 19
<212> ADN
<213> artificial

<220>
30 <223> cebador

<400> 4

35 gccaggagaa ccagcagag 19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en nitazoxanida (NTZ), tizoxanida (TZ) y glucurónido de tizoxanida (TZG), y una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ, TZ o TZG, para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno fibrótico en un mamífero.
- 5 2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero a tratar, preferiblemente un ser humano, se selecciona en base a criterios asociados con enfermedades fibróticas.
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde los criterios son tratamientos farmacológicos previos, patologías asociadas, genotipo, exposición a factores de riesgo e infección viral, así como en base a la detección de cualquier biomarcador relevante que se pueda evaluar por métodos de generación de imágenes y
10 métodos inmunológicos, bioquímicos, enzimáticos, químicos o de detección de ácidos nucleicos.
4. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se selecciona del grupo que consiste en NTZ y TZ, y una sal farmacéuticamente aceptable de NTZ o TZ.
5. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trastorno fibrótico es un trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, intestinal, pulmonar, cardíaca, renal,
15 muscular, cutánea, de tejido blando, médula ósea, intestinal y articular.
6. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, fibrosis inducida por radiación o quimioterapia y asbestosis.
- 20 7. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendido en una composición farmacéutica.
8. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto se administra una o dos veces al día, a una dosis comprendida entre 100 mg/día y 1000 mg/día.
9. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en combinación con al menos
25 glucocorticoides, AINE, ciclofosfamida, nitrosoureas, análogos de ácido fólico, análogos de purina, análogos de pirimidina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina, miriocina, tacrolimus, sirolimus, derivados de ácido micofenólico, fingolimod, y otros moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato, anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra dianas tales como citoquinas proinflamatorias y receptores de citoquinas proinflamatorias, receptor de células T, integrinas.

30

FIGURA 1

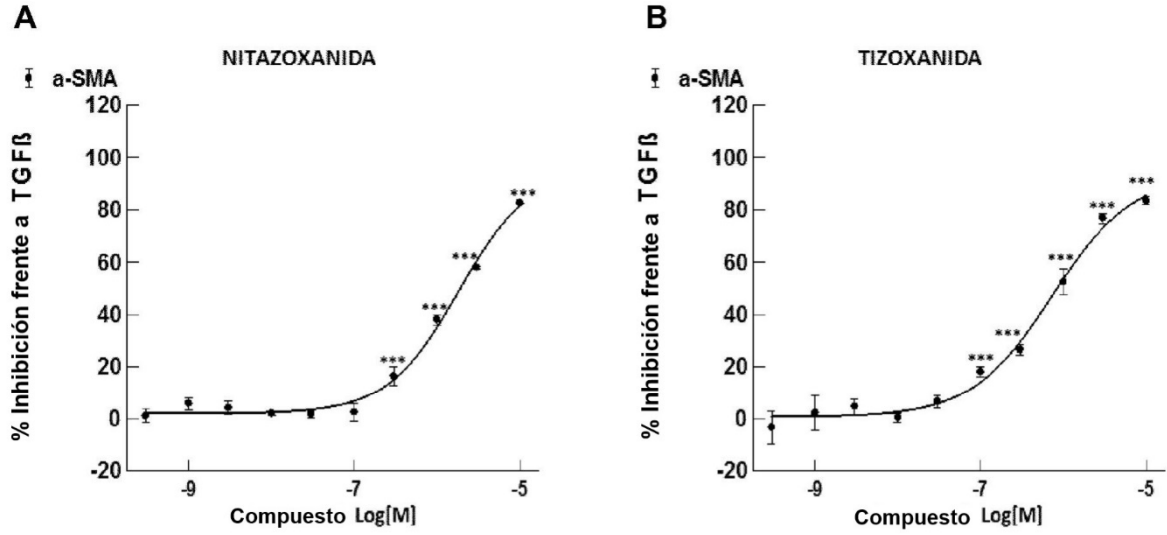
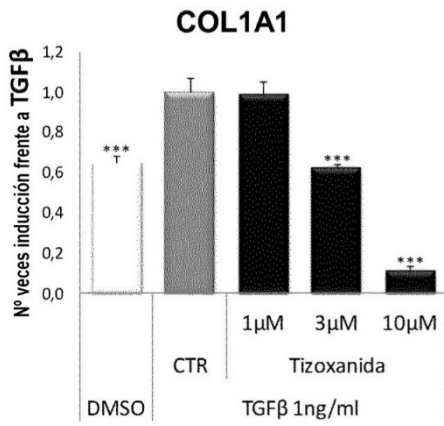


FIGURA 2



		% Inhibición frente a TGFβ	
TGFβ 1ng/ml	CTR	-	0%
	TZ (μM)	1	1%
		3	38%
		10	89%

FIGURA 3

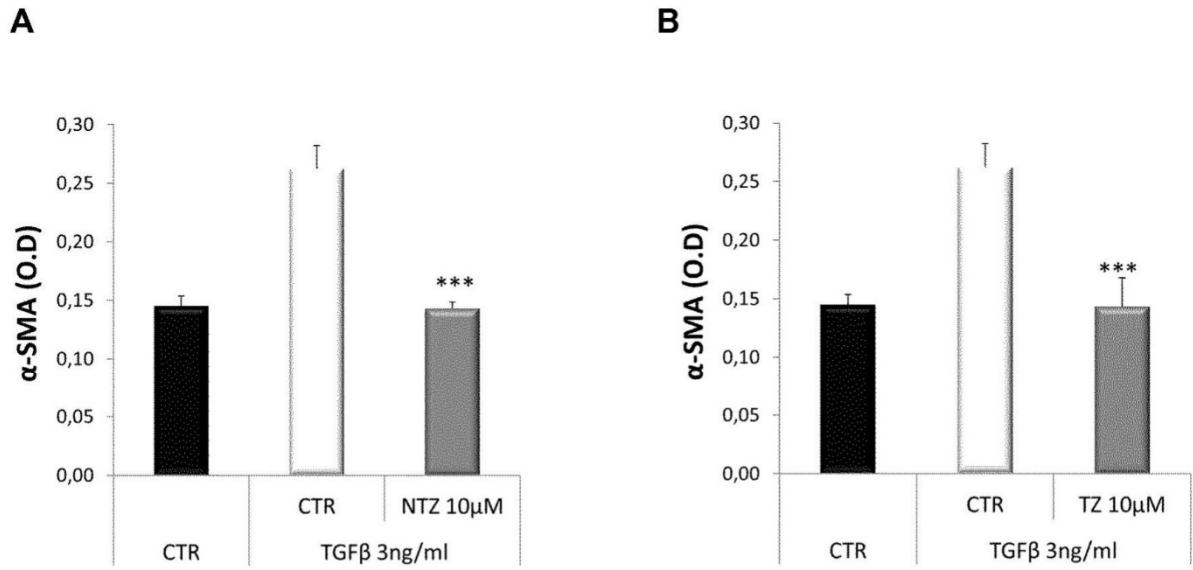


FIGURA 4

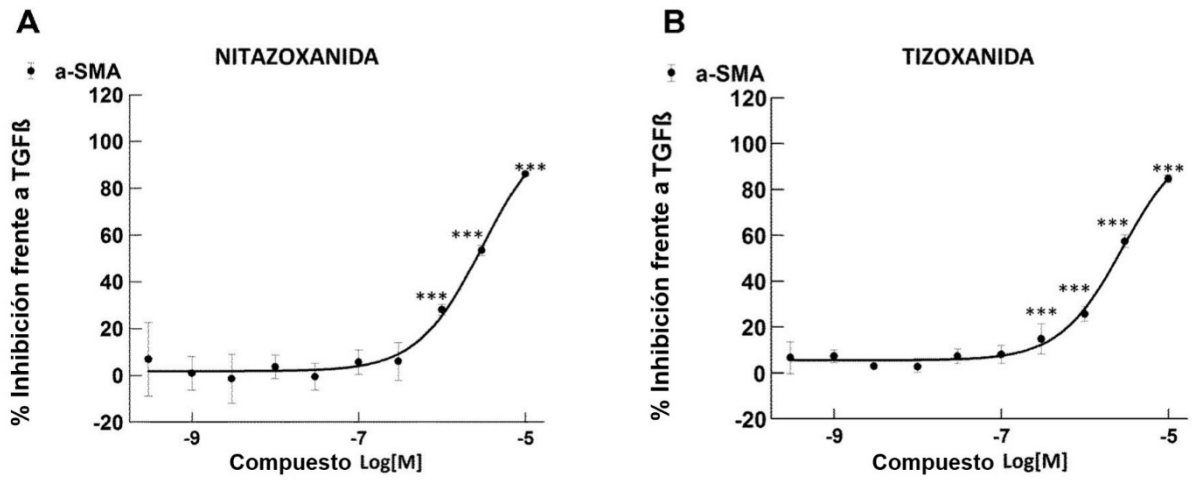


FIGURA 5

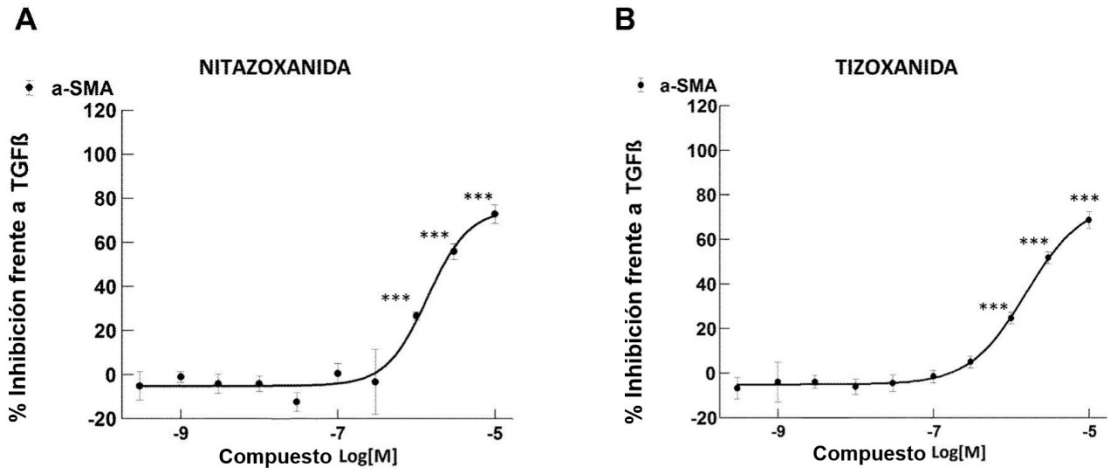


FIGURA 6

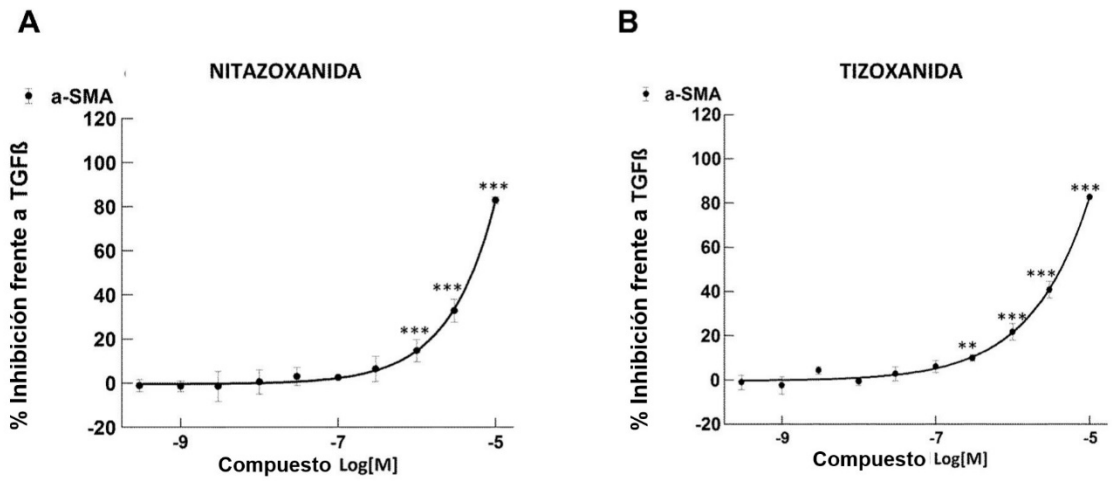


FIGURA 7

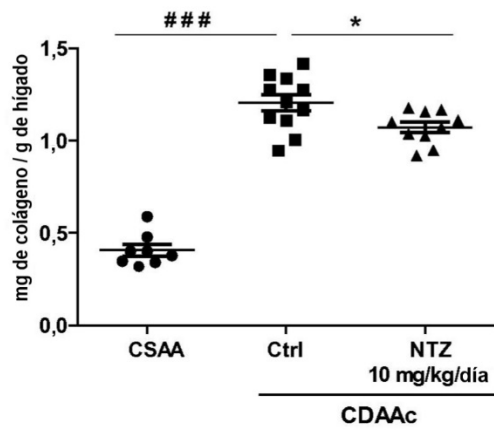


FIGURA 8

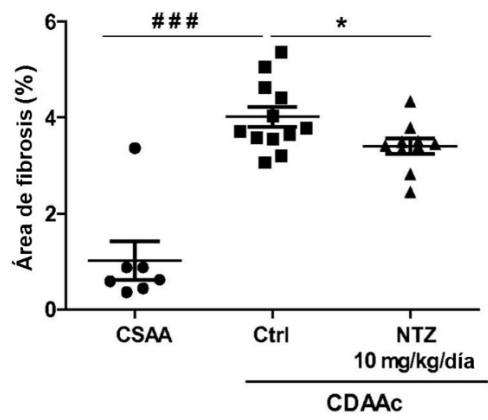


FIGURA 9

