

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 127**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005** **E 11176270 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2392335**

54 Título: **Uso de 24-norUDCA**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2015

73 Titular/es:

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ (100.0%)
Auenbruggerplatz 2
8036 Graz, AT

72 Inventor/es:

TRAUNER, MICHAEL;
HOFMANN, ALAN y
FICKERT, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 547 127 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

Uso de 24-norUDCA

- El ácido ursodesoxicólico (UDCA), el ácido biliar que se da de forma natural, que puede encontrarse en pequeñas cantidades en la bilis y en la sangre de seres humanos, es un fármaco usado ampliamente para tratar enfermedades hepáticas, en donde una de las áreas de indicación más importantes de UDCA es la disolución de cálculos biliares y el tratamiento de cirrosis biliar primaria (PBC) y colangitis esclerosante primaria (PSC). UDCA es un ácido biliar que se da de forma natural con efectos citoprotector, estabilizante de la membrana y anti-apoptótico. Además, UDCA disminuye los niveles en suero de bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina como marcador de colestasis (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).
- Estudios de UDCA en pacientes que sufren de enfermedades hepáticas, especialmente pacientes de PBC, han mostrado que la administración de UDCA aumenta la tasa de flujo biliar desde los hepatocitos, combatiendo así la colestasis y diluyendo e inhibiendo los ácidos biliares tóxicos, que son principalmente responsables de la lesión de los hepatocitos. Además, UDCA también es capaz de inhibir la respuesta inmune en el hígado reduciendo la lesión inmunológica a los conductos biliares y el hígado. UDCA – como se afirma anteriormente – se usa de forma regular para tratar PSC y PBC.
- PSC, que afecta principalmente a machos, es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, que puede llevar a colestasis (bloqueo del transporte de bilis al intestino). El bloqueo de los conductos biliares lleva a la acumulación de ácido biliar en el hígado y en la bilis, daños en el hígado y eventualmente provoca fallo hepático. La mayoría de los pacientes que sufren de PSC muestran también una inflamación crónica del colon (por ejemplo, colitis ulcerosa). La inflamación del conducto biliar puede afectar también al tejido hepático circundantes y llevar a una cicatrización de los conductos biliares pequeño y grande, que provocará la constricción del tracto biliar. Consecuentemente, dicha constricción lleva a una secreción desordenada de líquido biliar que daña además el hígado. En el curso de la enfermedad puede desarrollarse cirrosis hepática y colangiocarcinoma. Además PBC es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, que afecta inicialmente a los conductos biliares menores y finalmente dará por resultado la cirrosis hepática. En contraste a PSC, PBC afecta principalmente a individuos hembra y no está correlacionado con las enfermedades inflamatorias del colon.
- El método más eficiente para tratar PBC y PSC es el trasplante del hígado. Hasta ahora el único tratamiento farmacológico prometedor de ambas enfermedades implica el uso de UDCA. Actualmente, UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestáticas (Paumgartner & Beuers 2002). UDCA se usa en PBC a una dosis de 12-15 mg/kg/día (generalmente 1000-1500 mg) administrado oralmente una vez o dos al día. Este uso está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. La colchicina se ha añadido al tratamiento de UDCA. La colchicina se prescribe a una dosis de 0,6 mg dos veces al día por sus efectos anti-inflamatorio y anti-fibrótico potenciales. Varios estudios han demostrado mejoras suaves en los ensayos hepáticos usando colchicina. Sin embargo, ninguno encontró un beneficio para la histología hepática o supervivencia de pacientes de PBC. El metotrexato, un agente inmunosupresor, es otro fármaco que se ha ensayado en PBC. Se administra a una dosis de 15 mg por semana. En pequeños estudios, el metotrexato ha mejorado los síntomas, los ensayos en sangre hepática y progresión de la histología cuando se usa durante varios años. Sin embargo, el metotrexato provoca efectos secundarios severos que incluyen supresión de médula ósea, empeoramiento de la enfermedad hepática y fibrosis pulmonar potencialmente fatal.
- UDCA es de eficacia limitada en PSC y no se ha mostrado que prolongue la supervivencia (salvo por trasplante de hígado Trauner & Graziadei 1999, Paumgartner & Beuers 2002). Estudios en curso ensayan si una dosis alta de UDCA puede ser más efectiva. Notablemente, UDCA reduce el riesgo de cáncer de colon en pacientes con PSC y colitis ulcerosa. En base de la hipótesis de que PSC tiene una causa inmunológica, se han ensayado corticosteroides y otros inmunosupresores. Los corticosteroides orales dieron una mejora inicial en el perfil bioquímico. Sin embargo, la falta de evidencia para el beneficio a largo plazo además de la desmineralización ósea, es un argumento contra el uso de este régimen. Otras medicaciones tales como azatioprina, ciclosporina, ensayadas en asociación con corticosteroides y UDCA, nunca se han evaluado solas en la terapia de PSC. El metotrexato y D-penicilamina se mostraron también que son ineficaces. Por lo tanto, la terapia farmacéutica para PSC aún necesita optimizarse (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).
- El tratamiento endoscópico en pacientes de PSC con estenosis dominantes sintomáticas, cálculos biliares o restos se considera que es una opción valiosa además del tratamiento médico. Los pacientes con PSC que experimentan tratamiento endoscópico tenían una supervivencia mayor, que fue mucho mayor que la predicha a partir de modelos de supervivencia.
- El trasplante hepático ortotópico es una terapia efectiva para PSC y hasta ahora la única opción que salva la vida para la enfermedad terminal. Después del trasplante, sin embargo, PSC tiende a repetirse en el 15-30% de los pacientes, y hay también una alta tasa de reaparición de estenosis biliar, rechazo crónico y colangitis por reflujo. Desafortunadamente, el uso de inmunosupresores no mejora la supervivencia y la reaparición de la enfermedad. Así, existe una necesidad urgente para un tratamiento farmacológico efectivo que prevenga la progresión de la

enfermedad de PSC además de la reaparición después del trasplante de hígado (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).

5 Aunque UDCA, que se tolera bien con la excepción de raros episodios de diarrea y prurigo (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002), se usa predominantemente para tratar enfermedades hepáticas colestáticas, la eficacia de UDCA en PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas como colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3 es muy limitada (Trauner & Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et al. 1999).

10 En el documento EP 0 652 773 B1 se describe el uso de derivados de ácidos nor y homo-biliares, opcionalmente conjugados con taurina, glicina o alanina, como potenciadores de la absorción para medicamentos por las rutas enterales u otras rutas no parenterales. Estos derivados muestran propiedades lipófilas y detergentes y no se metabolizan por la flora bacteriana intestinal.

El documento EP 0 624 595 B1 describe nor-derivados diméricos de ácidos biliares para el uso en un medicamento, especialmente adaptados para el tratamiento de hiperlipidemia. Las sustancias descritas en él consisten en dos derivados de ácido biliar sencillos, que se unen de forma covalente el uno al otro.

15 El documento US 4.892.868 describe ácido 22-metil-nor-ursodesoxicólico y ácido 23-metil-ursodesoxicólico para usarse para tratar trastornos de la función hepatobiliar, con referencia particular al metabolismo del colesterol y la producción de bilis (por ejemplo, para el tratamiento de colestasis).

20 Se describe en esta memoria compuestos farmacéuticos alternativos para el tratamiento de enfermedades hepáticas, preferiblemente enfermedades hepáticas crónicas, que son más efectivos que los fármacos conocidos como ácido ursodesoxicólico y muestran menos efectos secundarios que el metotrexato.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para usarse para el tratamiento y/o la prevención de esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica.

25 Sorprendentemente resulta que un medicamento o composición farmacéutica que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico, un análogo C₂₃ acortado en la cadena lateral del ácido ursodesoxicólico (UDCA) de ácido biliar C₂₄ que se da de forma natural, y/o sales farmacéuticas aceptables de los mismos puede emplearse con éxito para el tratamiento de varias enfermedades hepáticas, porque esos análogos influyen en las propiedades fisiológicas de los ácidos biliares (Hofmann 1999, Schmassmann, Hofmann, et al. 1990, Yoon, Hagey, et al. 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). Aunque ambas sustancias son estructuralmente muy similares, ambas sustancias muestran diferentes características cuando se administran a mamíferos (véase por ejemplo, Yoon YB, Hagey LR, et al., 1986).

30 El ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales del mismo llevan a la inducción de secreción de bicarbonato biliar, que diluye el contenido biliar tóxico y protege las células epiteliales del conducto biliar frente al estrés oxidativo ya que el bicarbonato es un barrador potente para las especies de oxígeno reactivo. Esto lleva a la reconstitución de la función de barrera de colangiocitos y parará la pericolangitis en curso y la posterior fibrosis periductal minimizando la lesión de células epiteliales del conducto biliar desde el lumen del conducto biliar. Además, resultó que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales de los mismos tienen también efectos anti-inflamatorio y anti-fibrótico.

35 En contraste al ácido 24-nor-desoxicólico y sales del mismo, el ácido ursodesoxicólico mejora solo la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares y aumenta los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero e induce los infartos biliares. Sin embargo, el ácido ursodesoxicólico no mejora la enfermedad del conducto pequeño. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares respecto a la lesión hepática puede relacionarse con las diferencias en el nivel de secreción biliar, es decir, que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y las sales del mismo estimulan principalmente la secreción ductular mientras que el ácido ursodesoxicólico estimula la secreción biliar canalicular corriente arriba de los conductos afectados.

40 La administración de ácido 24-nor-desoxicólico y sales del mismo induce la destoxicación del ácido biliar por medio de hidroxilación, sulfatación y glucuronidación dando por resultado metabolitos de ácido biliar mejor solubles en agua y por lo tanto menos tóxicos, que diluyen los ácidos biliares tóxicos en bilis ductular e inducen una coleresis rica en bicarbonato ductular que reduce el estrés oxidativo.

45 La generación de una coleresis rica en bicarbonato por ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales del mismo tiene también implicaciones terapéuticas en colangiopatías humanas (por ejemplo, PSC, PBC, rechazo al injerto hepático crónico, colangitis destructiva no supurativa), como derivación colehepática que da por resultado un flujo continuo de moléculas a través del epitelio ductular biliar que ayuda a los conductos biliares alterados a manejar mejor el estrés tóxico/oxidativo. Por ejemplo, sulindac, un NSAID que también experimenta derivación colehepática en seres humanos, se ha mostrado que mejora las enzimas hepáticas en pacientes de PBC con respuesta incompleta al tratamiento de UDCA.

50 Métodos para la preparación de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales del mismo se conocen por el experto en la técnica y pueden prepararse preferiblemente mediante un método como se describe en Schteingart CD y Hofmann AF (J. Lip. Res. 29(1988):1387-1395).

Por supuesto, el fármaco según la presente invención puede usarse en seres humanos además de en mamíferos (por ejemplo, cerdo, caballo, primates, ganado, gato, perro).

La enfermedad hepática a tratar por un fármaco según la presente invención es esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica.

- 5 Especialmente enfermedades que son un resultado o dan por resultado una lesión del conducto biliar puede tratarse mediante un fármaco que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales del mismo.

10 El fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID) como ibuprofeno reduce la inflamación portal y lobular en el hígado (que llevará a la fibrosis periductal y proliferación ductular) y la formación de carcinoma hepatocelular (HCC) (Pikarsky, Porat, et al. 2004). Como el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y las sales del mismo muestran también propiedades anti-inflamatorias, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede usarse solo o en combinación con otros fármacos anti-inflamatorios, como NSAID (por ejemplo, ibuprofeno, sulindac (Bolder, Trang, et al. 1999)).

Según una realización preferida de la presente invención el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y las sales del mismo pueden formularse para la administración oral o intravenosa, en donde estas formulaciones comprenden además transportes, adyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Las formas de dosificación sólida para la administración oral pueden incluir comprimidos, preferiblemente comprimidos efervescentes o masticables, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólida, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede mezclarse con sustancias usadas de forma regular como sacarosa, manitol, sorbitol, almidón y derivados de almidón, lactosa, agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio),
20 agentes disgregantes y tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden prepararse también con recubrimientos entéricos para evitar que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico esté afectado por los ácidos y enzimas estomacales. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden comprender además celulosa microcristalina y/o fosfato dicálcico.

25 Las formas de dosificación líquida para la administración oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones y jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados normalmente en la técnica, tal como agua. Estas formas de dosificación pueden contener celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido algínico o alginato sódico como un agente de suspensión, metilcelulosa como un potenciador de la viscosidad, y agentes edulcorantes/aromatizantes. Cuando se administra mediante aerosol nasal o inhalación, las composiciones según la presente invención pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u
30 otros agentes de solubilización o dispersión.

Los supositorios para la administración rectal de ácido 24-nor-ursodesoxicólico pueden prepararse mezclando los compuestos o composiciones con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a temperatura ambiente aunque líquidos a temperatura rectal, de manera que se fundirán en el recto y liberarán el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y opcionalmente otros compuestos activos presentes en dichos
35 supositorios.

Preparados inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida usando agentes de dispersión, agentes humectantes y/o agentes de suspensión. El preparado inyectable estéril puede ser también una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden usarse
40 están agua y disolución isotónica de cloruro sódico. Los aceites fijos estériles se usan también de forma convencional como un medio disolvente o de suspensión.

Según la presente invención las formas de dosificación que comprenden ácido 24-nor-ursodesoxicólico pueden incluir además excipientes convencionales, preferiblemente sustancias de transporte orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables que no reaccionan con el compuesto activo. Vehículos farmacéuticamente
45 aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, aceites, preferiblemente aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, tensioactivos, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petrotrales, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los preparados farmacéuticos pueden esterilizarse y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, sales para influir la
50 presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas que no reaccionan de forma dañina con los compuestos activos. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, además de suspensiones, emulsiones o implantes.

Diversos sistemas de reparto se conocen y pueden usarse para administrar ácido 24-nor-ursodesoxicólico, que incluyen, por ejemplo, encapsulación en liposomas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y microgránulos (por
55 ejemplo, documento EP 1 317 925). La dosificación necesaria puede administrarse como una única unidad o en una forma de liberación sostenida.

La biodisponibilidad de ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede mejorarse por micronización de las formulaciones usando técnicas convencionales tales como triturando, moliendo y secando por pulverización en presencia de excipientes o agentes adecuados tales como fosfolípidos o tensioactivos.

5 Según la invención el ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede formularse en una forma de sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de ácido 24-nor-ursodesoxicólico incluyen preferiblemente sales metálicas, en particular sales de metal alcalino u otras sales farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos, como ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico, o ácidos orgánicos, como clases alifáticas, cicloalifáticas, aromáticas, heterocíclicas, carboxílicas y sulfónicas de ácidos orgánicos, tales como, ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, etanosulfónico, antranílico, mandélico, mesílico, salicílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, metanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluensulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, algénico, sulfanílico, esteárico, p-hidroxibutírico, ciclohexilaminosulfónico, galactárico y galacturónico. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales metálicas hechas a partir de litio, aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas hechas a partir de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas cíclicas. Todas las sales de ácido 24-nor-ursodesoxicólico pueden prepararse por métodos conocidos en el estado de la técnica.

Los métodos para la fabricación de un fármaco según la presente invención que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico y formulado por la administración como se esboza en esta memoria puede encontrarse, por ejemplo, en el "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations" (Sarfaraz K Niazi, CRC Press LLC, 2004).

El fármaco comprende preferiblemente una cantidad efectiva de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según una realización preferida de la presente invención el medicamento comprende 10 a 8000 mg, preferiblemente 25 a 5000 mg, más preferiblemente 50 a 1500 mg, en particular 250-500 mg, de ácido 24-nor-ursodesoxicólico.

25 En promedio el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden administrarse preferiblemente a un paciente en una cantidad de 25 mg a 5 g, preferiblemente 100 mg a 2,5 g, en particular 800 mg a 1,5 g por día. Sin embargo, 1 g de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo se administran lo más preferiblemente a un paciente. Se nota además que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo puede administrarse a un individuo en 1-100 mg/kg/d, preferiblemente 5-50 mg/kg/d, más preferiblemente 10-25 mg/kg/d, en particular 12-15 mg/kg/d. Dichas cantidades se administran en una o preferiblemente en más de una dosis (al menos 2, 3, 4, 5 o 10 dosis) por día. El fármaco o la composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse durante más de una semana, preferiblemente más de cuatro semanas, más preferiblemente más de seis meses, lo más preferiblemente más de un año, en particular para toda la vida.

35 Puede administrarse ácido 24-nor-ursodesoxicólico no solo en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptable y en formas de dosificación como se describe en esta memoria, pero, por supuesto, también en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico, NSAID, como sulindac e ibuprofeno) que se conocen también por ser efectivos frente a la misma enfermedad o una similar a tratar (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico) o frente a otra enfermedad, que puede ser preferiblemente un resultado de una enfermedad hepática.

La presente invención se ilustra adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplo.

45 Fig. 1. *norUDCA* cura la colangitis esclerosante en ratones *Mdr2^{-/-}*. (A) Histología hepática (tintado H&E) en ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con dieta de control (KO), ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con UDCA (KO+UDCA), y ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con *norUDCA* (KO+*norUDCA*) (Ampliación x 10). Enfermedad del conducto biliar grande pronunciada en KO (cabezas de flecha) que se reduce significativamente en KO+UDCA (cabezas de flecha) y está ausente en KO+*norUDCA*. (B) Colangitis esclerosante en KO con fibrosis periductal, células epiteliales del conducto biliar alteradas e infiltrado inflamatorio mixto. Estas características se mejoran en KO+UDCA y están ausentes en KO+*norUDCA* (Ampliación x 40). (C) Tintado rojo sirio que muestra fibrosis significativa con fibras de colágeno periductal (rojo) en KO. Reducción moderada de fibrosis en KO+UDCA e incluso reducción más pronunciada en KO+*norUDCA* (Ampliación para b, c x 40); bd, conducto biliar.

55 Fig. 2. *norUDCA* reduce significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en *Mdr2^{-/-}*. Contenido de hidroxiprolina hepática en tipo salvaje (WT), ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con dieta de control (KO), ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con UDCA (KO+UDCA), y ratones *Mdr2^{-/-}* alimentados con *norUDCA* (KO+*norUDCA*). El contenido de hidroxiprolina hepática está aumentado significativamente en KO comparado con WT y reducido a niveles base en KO+*norUDCA*. Los valores son media \pm ESM a partir de n=5 por grupo. p<0,05, WT frente a KO; KO frente a KO+*norUDCA*.

Fig. 3. *norUDCA* reduce significativamente la infiltración/extravasado de neutrófilos portales en *Mdr2^{-/-}*. Inmunohistoquímica para CD11b (neutrófilos tintados, rojos) en ratón *Mdr2^{-/-}* alimentado con dieta de control (KO),

ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con UDCA (KO+UDCA), y ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con *norUDCA* (KO+*norUDCA*) de conductos biliares (A) interlobulares y (B) lobulares. (C) Cuantificación de células CD11b positivas por 20 campos portales. *norUDCA* reduce significativamente el número de células CD11b positivas en *Mdr2*^{-/-}. Los valores son media \pm ESM a partir de n=3 por grupo. p< 0,05.

5 Fig. 4. *norUDCA* inhibe la expresión de la molécula de adhesión de célula vascular portal (VCAM) en ratones *Mdr2*^{-/-}. Inmunohistoquímica para VCAM (rojo) en conductos biliares interlobulares (A) y lobulares (B) de ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta de control (KO), ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con UDCA (KO+UDCA), y ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con *norUDCA* (KO+*norUDCA*). (A) Sin diferencia obvia en la expresión de VCAM portal entre KO y KO+UDCA mientras que KO+*norUDCA* muestra expresión significativamente menor en proliferados de conducto biliar. (B) Al nivel de los conductos biliares lobulares tanto UDCA como *norUDCA* reducen la expresión de VCAM colangiocelular.

10 Fig. 5. *norUDCA* inhibe la proliferación de hepatocitos y colangiocitos en ratones *Mdr2*^{-/-}. Inmunohistoquímica para Ki-67 (rojo) en hepatocitos (A) y colangiocitos (B) en ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta de control (KO), ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con UDCA (KO+UDCA) y ratón *Mdr2*^{-/-} alimentado con *norUDCA* (KO+*norUDCA*). (A) Numerosos hepatocitos Ki-67 positivos en KO y KO+UDCA y núcleos positivos dispersos en KO+*norUDCA*. (B) Numerosos colangiocitos Ki-67 positivos en KO, pocos colangiocitos positivos (cabezas de flecha) en KO+UDCA y KO+*norUDCA*, respectivamente. (C) Número de hepatocitos Ki-67 positivos por 30 HPF y (D) Número de colangiocitos Ki-67 positivos por 20 campos portales. Solo *norUDCA* reduce significativamente el número de hepatocitos y colangiocitos proliferativos. Los valores son media \pm ESM a partir de n=3 por grupo. p<0,05, *WT frente a KO; † WT frente a KO+UDCA; ‡ KO frente a *norUDCA*.

20 Fig. 6. Correlación positiva entre salida de bicarbonato biliar y flujo de bilis en *Mdr2*^{-/-}. La salida de bicarbonato biliar se representó frente al flujo de bilis en ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con dieta de control (control, círculos abiertos), ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con UDCA (UDCA, triángulos abiertos) y ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con *norUDCA* (*norUDCA*, círculos cerrados). Notar la correlación positiva entre salida de bicarbonato y flujo de bilis además del agrupamiento de animales tratados con *norUDCA* que muestra la mayor salida de bicarbonato en la parte derecha superior.

25 Fig. 7. Mecanismos terapéuticos sugeridos de *norUDCA* en ratones *Mdr2*^{-/-}. El *norUDCA* se absorbe por los hepatocitos y se secreta en canalículos y conductos biliares donde se absorbe por colangiocitos que llevan a la secreción de bicarbonato ductular. *norUDCA* se secreta de vuelta en el plexo peribiliar y se deriva de vuelta a los hepatocitos (derivación colehepática). *norUDCA* induce la expresión de *Sult2a1*, etc. y *Mrp3* y *Mrp4*, que detoxifica las sales biliares y las convierte en susceptibles para la eliminación renal.

30 Fig. 8. Estructura química de *norUDCA* (ácido 3-alfa,7-alfa-di-hidroxi-24-nor-5-beta-colan-23-oico).

Ejemplo 1:

35 Los ratones con alteración dirigida del gen *Mdr2* (*Abcb4*) que codifica una fosfolípido flipasa canalicular desarrollan colangitis esclerosante con características macroscópicas y microscópicas que se parecen mucho a las vistas en la colangitis esclerosante humana (por ejemplo, colangitis esclerosante primaria, PSC) (Fickert, Zollner, et al. 2002, Fickert, Fuchsichler, et al. 2004). La lesión del conducto biliar en estos ratones está unida a la secreción defectuosa de fosfolípidos biliares que da por resultado una concentración aumentada de ácidos biliares no micelares libres que posteriormente provocan lesión de las células epiteliales del conducto biliar (colangiocito), pericolangitis, fibrosis periductal con proliferación ductular y finalmente colangitis esclerosante (Fickert, Fuchsichler, et al. 2004, Lammert, Wang, et al. 2004). Además de la oportunidad de estudiar nuevas estrategias de tratamiento para la PSC este modelo puede ser relevante para ensayar terapias para el amplio espectro de enfermedades hepáticas humanas que dan por resultado mutaciones *MDR3* (el ortólogo humano de *Mdr2*) que oscilan desde colestasis neonatal a enfermedad hepática adulta (Jansen & Sturm 2003).

45 Actualmente, UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestáticas (Paumgartner & Beuers 2002). Sin embargo la eficacia de UDCA en PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas debido a mutaciones de *MDR3* (por ejemplo, colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3) es limitada (Trauner & Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et al. 1999). El acortamiento de la cadena lateral de UDCA podría aumentar su eficacia terapéutica ya que esta modificación influye significativamente las propiedades fisiológicas de los ácidos biliares (Hofmann 1999, Schmassmann, Hofmann, et al. 1990, Yoon, Hagey, et al. 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). *norUDCA*, un análogo C₂₃ acortado en la cadena lateral de UDCA, es un potente agente colerético en diferentes roedores (por ejemplo, hámster, rata, cobaya) que experimenta derivación colehepática extensiva y que induce la secreción de bicarbonato biliar al nivel de conducto biliar (Yoon, Hagey, et al. 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). En contraste con UDCA, los efectos de *norUDCA* no se han estudiado nunca en la colestasis. Para ensayar la hipótesis de que la derivación colehepática de un ácido biliar no tóxico puede ser beneficiosa en el tratamiento de colangiopatías se investigó los efectos de *norUDCA* en ratones *Mdr2*^{-/-} como un modelo de colangitis esclerosante (Fickert, Fuchsichler, et al. 2004). En este ejemplo se examinan los efectos positivos de *norUDCA* en el tratamiento de enfermedades hepáticas humanas provocadas por mutaciones *MDR3* y colangiopatías humanas tal como colangitis esclerosante (por ejemplo, PSC).

1.1. Materiales y métodos

1.1.1. Experimentos animales.

Los ratones *Mdr2*^{-/-} (fondo FVB/N) se obtuvieron de Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Los ratones se alojaron con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y se permitió el consumo ad libitum de agua y una dieta de ratón estándar (Sniff, Soest, Alemania).

1.1.2. Alimentación de ácido biliar en ratones *Mdr2*^{-/-}.

Mdr2^{-/-} de dos meses de edad (un punto temporal cuando la colangitis esclerosante está ya totalmente establecida en estos animales (Fickert, Zollner, et. al. 2002)) se alimentaron con una dieta suplementada con *nor*UDCA (0,5%, p/p) o con UDCA como un comparador clínico (0,5%, p/p) durante 4 semanas y se compararon con ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con dieta estándar y controles tipo salvaje.

1.1.3. Histología hepática.

Por microscopía con luz convencional, los hígados se fijaron en disolución de formaldehído tamponada neutra al 4% y se incrustaron en parafina. Las secciones (4 µm de espesor) se tizaron con H&E y tinte rojo Sirius, respectivamente. Las secciones se codificaron y examinaron por un patólogo (H.D.) que no conoce el tratamiento de los animales.

1.1.4. Bioquímica de suero rutinaria.

Se almacenaron muestras de suero a -70°C hasta el análisis de alanina transaminasa (ALT) y fosfatasa alcalina (AP) por química clínica rutinaria realizado en un analizador Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Para la determinación de los niveles de ácido biliar en suero total, se usó un ensayo comercial de 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Ecoline S+; Diasys, Holzheim, Alemania).

1.1.5. Inmunohistoquímica para alfa-SMA.

La inmunohistoquímica para alfa-SMA se realizó en secciones de parafina (4 µm de espesor) tratadas en microondas (0,01 mmoles/L de tampón citrato a pH 6,0) usando el anti alfa-SMA de ratón monoclonal (dilución 1:500, Sigma, San Luis, MO). La unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako, Glostrup, Dinamarca) que usa β-amino-9-etil-carbazol (AEC; Dako) como sustrato.

1.1.6. Inmunohistoquímica para el marcador de proliferación Ki-67.

La inmunohistoquímica para Ki-67 se realizó en secciones de parafina (4 µm de espesor) tratadas con microondas (0,01 mmoles/L de tampón citrato a pH 6,0) usando un anticuerpo anti-Ki-67 de conejo policlonal (dilución 1:750, Novocastra, Newcastle upon Tyne, RU). La unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako) usando AEC (Dako) como sustrato. El número de hepatocitos de proliferación se calculó contando núcleos positivos en 30 campos de alta potencia en secciones de 3 animales en cada grupo. El número de células epiteliales de conducto biliar proliferativas se calculó contando núcleos positivos en 20 campos portales en secciones de 3 animales en cada grupo.

1.1.7. Inmunohistoquímica para marcador de neutrófilos CD-11b.

Para cuantificar neutrófilos se detectaron células CD 11b positivas como se describe anteriormente (Fickert, Fuchsbichler, et al., 2004) con la modificación de que la unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako) usando AEC (Dako) como sustrato. El número de neutrófilos se calculó contando células positivas en 20 campos portales en secciones de 3 animales en cada grupo.

1.1.8. Inmunohistoquímica para molécula de adhesión de célula vascular (VCAM).

La inmunohistoquímica para VCAM se realizó en criosecciones fijas con acetona usando el anti CD106 de rata monoclonal (VCAM-1, dilución 1:30, PharMingen, San Diego, CA, USA) y la unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako) usando AEC (Dako) como sustrato.

1.1.9. Inmunohistoquímica para aductos de 4-hidroxinonenal-proteína. Las secciones de hígado se desparafinizaron y después se incubaron con supresor de peroxidasa Immunopure (Pierce, Rockford, IL) durante 30 min y después bloque de proteína (DAKO, Carpintería, CA) durante 2 h. Esto se siguió por incubación toda la noche con el anticuerpo primario anti-4-hidroxinonenal (Calbiochem, San Diego, CA) a temperatura ambiente y la unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako) con AEC (Dako) como sustrato.

1.1.10. Determinación del contenido de hidroxiprolina hepática.

Para cuantificar la fibrosis hepática en nuestro modelo se determinó el contenido de hidroxiprolina hepática. El lóbulo hepático derecho se homogeneizó en HCl 6 normal (200 mg de tejido hepático/4 ml de HCl) y se hidrolizó a 110°C

durante 16 h. Después de la filtración se añadieron 50 µl a 450 µl de NaOH al 2,2% disuelto en tampón de citrato-acetato (50 g de ácido cítrico x H₂O, 12 ml de ácido acético, 120 g de acetato sódico x 3 H₂O, 34 g de NaOH a 1 litro de agua destilada; pH 6,0). Después de añadir 250 µl de ácido perclórico y 12 min de incubación a temperatura ambiente se añadieron 250 µl de disolución de p-dimetilaminobenzaldehído y se incubó a 60°C durante 20 min. El contenido de hidroxiprolina se midió a 565 nm usando una curva estándar de hidroxiprolina.

1.1.11. Análisis de ARNm y PCR de genes de fibrosis clave.

Se realizó el aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y PCR a tiempo real Taqman® como se describe anteriormente (Wagner, Fickert, et al. 2003). Se usaron los siguientes cebadores y sondas marcadas con 5' FAM, 3' TAMRA: Col1a1 hacia delante: caatgcaatgaagaactggactgt (Seq. ID núm. 1), Col1a1 inverso: tcctacatcttctgagtttggtga (Seq. ID núm. 2) y sonda Col1a1: cagaaagcacagcactgcctcc (Seq. ID núm. 3); TIMP-1 hacia delante: catggaagcctctgtggatg (Seq. ID núm. 4), TIMP-1 inverso: aagctgcaggcattgatgtg (Seq. ID núm. 5) y sonda TIMP-1: ctcatcacggggccgctaaggaac (Seq. ID núm. 6); MMP-2 hacia delante: ctttgagaaggatggcaagatgg (Seq. ID núm. 7), MMP-2 inversa: ttgtaggaggtgcctggaa (Seq. ID núm. 8) y sonda MMP-2: cagatggacagcctgcaagtccc (Seq. ID núm. 9).

1.1.12. Medida de flujo de bilis.

El flujo de bilis se determinó gravimétricamente y se normalizó al peso de hígado como se describe anteriormente (Fickert, Zollner, et al. 2001). La concentración de fosfolípidos biliares se determinó usando un kit disponible comercialmente (Phospholipid B; Wako, Neuss, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración de colesterol biliar se determinó usando un kit comercial disponible (Cholesterol Liquicolor; Human, Wiesbaden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración de glutatión biliar (GSH) se determinó después de la precipitación de proteína en ácido metafosfórico al 5% usando el Kit de ensayo de glutatión (Calbiochem, San Diego, US) según las instrucciones del fabricante. La concentración biliar de ácido biliar se analizó usando un ensayo 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Ecoline St, DiaSys) según las instrucciones del fabricante.

1.1.13. Análisis estadístico.

Se presentan datos como medias aritméticas +/- DE. Se estudiaron 4 a 6 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó usando el ensayo t de Student cuando sea apropiado o ANOVA con el ensayo posterior de Bonferroni cuando se comparan tres o más grupos. Un valor $p < 0,05$ se consideró significativo.

1.2. Resultados

1.2.1. *norUDCA* mejora significativamente la lesión hepática, reduce la fibrosis y cura la colangitis esclerosante en ratones *Mdr2*^{-/-}.

Los niveles de ALT y AP en suero (como marcadores bioquímicos para la lesión hepática y colestasis) estaban significativamente elevados en *Mdr2*^{-/-} alimentados con dieta estándar en comparación con controles tipo salvaje (Tabla 1).

Tabla 1. Bioquímica de suero y niveles de ácido biliar bajo diversas condiciones experimentales.

	ALT (U/L)	AP (U/L)	Bilis
WT	71±19	92±13	0,09±0,03
KO	405±187	235±55	0,32±0,11
KO+UDCA	576±175*	399±73*	0,55±0,19
KO+ <i>nor</i> -UDCA	165±23*#	162±25*#	0,23±0,2#

Nota. Los valores se expresan como media ± DE a partir de n = 5 por grupo. ALT, alanina transaminasa; AP, fosfatasa alcalina; SBA, ácidos biliares en suero, WT, ratones tipo salvaje; KO ratones genéticamente deficientes en *Mdr2*, KO+UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con UDCA; KO+*nor*UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con *nor*UDCA.

* $p < 0,05$, KO frente a KO+UDCA y KO frente a KO+*nor*UDCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

$p < 0,05$, KO+UDCA frente a KO+*nor*UCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

*nor*UDCA mejoró significativamente los niveles de ALT y AP en suero en comparación a *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta estándar (Tabla 1). En paralelo *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta estándar presentó colangitis esclerosante pronunciada (Fig. 1) con proliferación ductular y fibrosis hepática reflejada por contenido de hidroxiprolina hepática

significativamente elevada (Fig. 2). *Mdr2*^{-/-} alimentado con *norUDCA* mostró conductos biliares de tamaño grande y medio regulares con ninguna o solo modesta fibrosis periductal (Fig. 1); la proliferación ductular estuvo virtualmente ausente (no se muestra). En línea con estos cambios histológicos, *norUDCA* redujo significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en *Mdr2*^{-/-} (Fig. 2) que fue parejo a una reducción significativa en la expresión de ARNm de colágeno hepático 1 y 3 (Tabla 2).

5

Tabla 2. Secuencias de cebador en PCR a tiempo real (5'-3')

	Hacia delante	Inverso
Cyp2b10	CAATGGGAACGTTGGAAGA	TGATGCACTGGAAGAGGAAC
Cyp3a11	CCACCAGTAGCACACTTTCC	TTCCATCTCCATCACAGTATCA
IL-1 β	CTGGTGTGTGACGTTCCCATTA	CCGACAGCACGAGGCTTT
IL-1R	GCCAGGACCGCTCAGAGA	TGCCTCGACTGTTAGTCAAGCA
IL-6	GCCACCAAGAACGATAGTCA	GAAGGCAACTGGATGGAAGTCT
MMP3	CCCACCAAGTCTAACTCTCTGGAA	GGGTGCTGACTGCATCAAAGA
MIP-2	CCTCAACGGAAGAACCAAAGAG	CTCAGACAGCGAGGCACATC
Mrp3	GGCAGGGCCCACTGAGT	AGTCCTCAGATGTCAGCCTAGTGA
Mrp4	TTAGATGGGCCTCTGGTTCT	GCCACAATTCCAATTCCAACCTT
i-NOS	ACATCAGGTCGGCCATCACT	CGTACCGGATGAGCTGTGAATT
Procolágeno 1	GCAGGGTTCCAACGATGTTG	GCAGCCATCGACTAGGACAGA
Procolágeno 3	GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG	CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC
TGF-beta	TCGACATGGAGCTGGTGAAA	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGA
TNF-alfa	GACCTCACACTCAGATCATCTTCT	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
TNF-R1	TGCACTAAACAGCAGAACCGAG	TTGCTCAGCCTCATGCACTG
Sult2a1	GGAAGGACCACGACTCATAAC	GATTCTTACAAGGTTTGTGTTACC
Ugt1a1	TCTGAGCCCTGCATCTATCTG	CCCCAGAGGCGTTGACATA

El tratamiento de UDCA en *Mdr2*^{-/-} como un comparador clínico y tratamiento estándar habitual de enfermedades hepáticas colestáticas (que incluyen PSC) se estudiaron simultáneamente. En contraste con *norUDCA*, UDCA aumentó de forma significativa la actividad de ALT y AP en *Mdr2*^{-/-} (Tabla 1) y 2 fuera de 5 animales mostraron infartos biliares en línea con observaciones previas (Fickert, Zollner, et al. 2002). UDCA pareció reducir la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares e interlobulares (Fig. 1) aunque mostró solo una tendencia para disminuir el contenido de hidroxiprolina hepática sin alcanzar importancia estadística (Fig. 2). Estos descubrimientos indican claramente que *norUDCA* (aunque no UDCA) reduce de forma significativa la lesión hepática, pericolangitis y fibrosis periductal en *Mdr2*^{-/-} llevando finalmente a la curación de colangitis esclerosante.

10

15

1.2.2. *norUDCA* reduce la inflamación, el estrés oxidativo y la proliferación celular en ratones *Mdr2*^{-/-}.

Como la inflamación portal puede representar el desencadenante principal para la fibrosis periductal en *Mdr2*^{-/-} (Pikarsky, Porat, et al. 2004) se analizó la reducción de inflamación portal con *norUDCA*. El *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta de control tenía un número significativamente elevado de neutrófilos portales comparado con los controles tipo salvaje (Fig. 3). *norUDCA* también mejoró la pericolangitis en *Mdr2*^{-/-} como se refleja por un número significativamente reducido de neutrófilos portales en comparación con *Mdr2*^{-/-} alimentando con dieta estándar (Fig. 3). Estos efectos anti-inflamatorios aparentes de *norUDCA* fueron parejos a la expresión VCAM significativamente menor en las células epiteliales del conducto biliar de conductos biliares interlobulares y lobulares de *Mdr2*^{-/-} alimentado por *norUDCA* (Fig. 4). Como se mostró anteriormente que la inflamación desencadena además la proliferación en hígados de *Mdr2*^{-/-} (Pikarsky, Porat, et al. 2004) se ensayó si esto estaba afectado por *norUDCA*. El *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta estándar mostró un número significativamente elevado de hepatocitos y colangiocitos Ki-67 positivos en comparación con controles tipo salvaje (Fig. 5). *norUDCA* redujo de forma significativa el grado de proliferación de hepatocito y de célula epitelial del conducto biliar casi a niveles de control tipo salvaje (Fig. 5). UDCA

20

25

no tuvo efectos significativos en la inflamación portal (Fig. 3), la expresión VCAM (Fig. 4) y la proliferación de hepatocitos (Fig. 5). Sin embargo, UDCA redujo la proliferación de células epiteliales del conducto biliar en los conductos biliares grandes (Fig. 5). De nuevo, estos datos indican que los efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos de *nor*UDCA son superiores a los de UDCA.

- 5 1.2.3. *nor*UDCA induce la secreción de bicarbonato biliar en ratones *Mdr2*^{-/-}. Para determinar si la coleresis rica en bicarbonato que resulta de la derivación colehepática de *nor*UDCA podría ser responsable de los efectos terapéuticos observados, se determinaron el flujo y la composición de la bilis (Tabla 3).

Tabla 3. Flujo de bilis y excreción biliar de ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y glutatión bajo varias condiciones experimentales.

		KO	KO+UDCA	KO+ <i>nor</i> UDCA
		n = 4	n=6	n=5
Flujo de bilis	μL/g/min	2,3±0,3	2,4±0,3	3,5±0,3
Ácidos biliares	nmoles/g/min	23,0±5,9	37,2±7,6*	29,5±2,3
Colesterol	nmoles/g/min	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,04
Fosfolípidos	nmoles/g/min	0,4±0,1	0,3±0,03	0,3±0,1
Glutatión	nmoles/g/min	4,6±2,0	5,6±1,1	5,8±1,2
Bicarbonato	nmoles/g/min	60,9±8,0	67,1±10,0	98,8±14,6#

10

Nota. Los valores se expresan como media ± DE. KO, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2*, KO+UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con UDCA; KO+*nor*UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con *nor*UDCA.

- *p<0,05, KO frente a KO+UDCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

- 15 • #p<0,05, KO frente KO+*nor*UDCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

Comparado con *Mdr2*^{-/-} alimentado con dieta de control y alimentado con UDCA, *nor*UDCA indujo de forma significativa la secreción de bicarbonato biliar consistente con el concepto de que *nor*UDCA experimenta derivación colehepática relevante en *Mdr2*^{-/-} (Bolder, Trang, et al. 1999). UDCA pero no *nor*UDCA estimuló la excreción biliar de ácido biliar. No se observaron efectos significativos de producción biliar de ácido biliar, colesterol, fosfolípidos y glutatión. Estos descubrimientos muestran que *nor*UDCA lleva a la purga de los conductos biliares lesionados con una bilis menos tóxica enriquecida con bicarbonato en *Mdr2*^{-/-}.

20

1.2.4. *nor*UDCA induce rutas de detoxificación en fase II y rutas excretoras alternativas para ácidos biliares en ratones *Mdr2*^{-/-}.

Para ensayar la hipótesis de que la inducción de rutas de biotransformación de fase I/II y rutas de eflujo alternativo para ácidos biliares potencialmente tóxicos puede contribuir también a los efectos beneficiosos observados de *nor*UDCA en *Mdr2*^{-/-} se estudió la expresión de enzimas metabólicas clave (Tabla 4) y composición de ácidos biliares en suero, hepática y biliar en *Mdr2*^{-/-} alimentados con *nor*UDCA.

25

Tabla 4. PCR a tiempo real para la cuantificación de niveles de expresión relativos de enzimas metabólicas clave y proteínas de transporte bajo diversas condiciones experimentales.

	KO	KO+UDCA	KO+ <i>nor</i> UDCA
Cyp2b10	100±103	751±245*	1294±418*#
Cyp3a11	100±46	246±72*	241±45*
Sult2a1	n.d.	100±46	24157±14948*#
Ugt1a1	100±54	137±55	304±81*#
Cyp7a1	100±78	9±4*	60±30#
Mrp3	100±33	194±55	207±73*
Mrp4	100±30	357±95	590±193*

Nota. Los valores se expresan como media \pm DE; n=5 en cada grupo. n.d., no detectable, KO, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2*, KO+UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con UDCA; KO+*nor*UDCA, ratones genéticamente deficientes en *Mdr2* alimentados con *nor*UDCA.

- *p<0,05, KO frente a KO+UDCA y KO frente a KO+*nor*UDCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

5 • #p<0,05, KO+UDCA frente a KO+*nor*UDCA (ANOVA con ensayo posterior de Bonferroni)

Se pone atención específica a *Sult2a1* y *Mrp4*, ya que el sulfatado y transporte de compuestos sulfatados están interrelacionados para formar una ruta regulada de forma coordinada para la excreción de esteroides y ácidos biliares sulfatados (Schuetz, Strom, et al. 2001). *nor*UDCA no tuvo efectos significativos en la expresión de ARNm de sistemas de absorción hepatocelular (*Ntcp*, *Oatp1*) y eflujo canalicular (*Bsep*, *Mrp2*) para ácidos biliares y aniones orgánicos (los datos no se muestran). Sin embargo, *nor*UDCA dio por resultado una fuerte inducción de enzimas de detoxificación de fase I y II (Tabla 4) con la mayoría de efectos pronunciados en la expresión de *Sult2a1*. Además, *nor*UDCA aumentó profundamente la expresión de los sistemas de eflujo basolateral alternativos tal como *Mrp4* y – a un menor grado – *Mrp3* (Tabla 4, Fig. 7). Los efectos de UDCA fueron menos pronunciados (Tabla 4, Fig. 7). Esta inducción coordinada de rutas de biotransformación y sistemas de eflujo por *nor*UDCA se acompañó por la aparición de glucurónidos de ácido biliar y también sulfatos que reflejaban las implicaciones funcionales de los cambios de expresión observados.

1.3. Discusión

Podría mostrarse que *nor*UDCA cura la colangitis esclerosante en ratones *Mdr2*^{-/-}, un sistema de modelo bien caracterizado para PSC, en 4 semanas. Además, podría demostrarse que *nor*UDCA es significativamente más efectivo que UDCA.

El desarrollo de colangitis esclerosante en *Mdr2*^{-/-} está directamente relacionada con la secreción defectuosa de fosfolípido biliar y niveles biliares aumentados de forma concomitante de ácidos biliares tóxicos unidos de forma no micelar que provocan la lesión del conducto biliar y pericolangitis (Fickert, Zollner, et al. 2002, Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004). La inducción de secreción de bicarbonato biliar en *Mdr2*^{-/-} alimentados con *nor*UDCA presentada por este ejemplo es fuertemente consistente con derivación colehepática de *nor*UDCA (Hofmann 1977, Yoon, Hagey, et al. 1986). La secreción de bicarbonato biliar aumentado (i) diluye el contenido biliar tóxico en *Mdr2*^{-/-} y (ii) protege las células epiteliales del conducto biliar frente al estrés oxidativo ya que el bicarbonato es un potente barredor para especies de oxígeno reactivo. *nor*UDCA para por lo tanto la pericolangitis en curso y posterior fibrosis periductal en *Mdr2*^{-/-} minimizando la lesión de células epiteliales del conducto biliar a partir del lumen del conducto biliar. Esto lleva a la reconstrucción de la función de la barrera de colangiocitos que significaría que los efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos observados de *nor*UDCA en *Mdr2*^{-/-} son secundarios. Sin embargo, es evidente que *nor*UDCA tiene también efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos directos.

Los descubrimientos de este ejemplo demuestran que la inhibición de la fibrosis periductal, cuando se acompaña con la modulación del contenido biliar (es decir, que aumenta el contenido de ácidos biliares hidrófilos junto con la concentración de bicarbonato aumentada en el conducto), mejora significativamente la lesión hepática en *Mdr2*^{-/-}.

En contraste con *nor*UDCA, UDCA mejoró solo la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares aunque aumentó los niveles de ALT en suero e indujo los infartos biliares en *Mdr2*^{-/-}. En un estudio previo con un periodo de tratamiento más corto se concluyó que esto puede estar relacionado principalmente con los efectos coleréticos de UDCA en la presencia de obstrucción biliar no resuelta comparable a los descubrimientos en ratones alimentados con UDCA CBDL (Fickert, Zollner, et al. 2002). En contraste con esta asunción anterior, se encontró solo una tendencia para el flujo de bilis aumentado en *Mdr2*^{-/-} alimentado con UDCA e incluso más con *nor*UDCA en el estudio actual usando dosis menores. Sin embargo, como UDCA no mejoró la enfermedad del conducto pequeño en *Mdr2*^{-/-} esto no excluye la posibilidad de presión biliar aumentada al nivel de los canales de Herring en *Mdr2*^{-/-} alimentados con UDCA que podría haber llevado a los infartos biliares observados. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares con respecto a la lesión hepática se refieren a las diferencias en el nivel de secreción biliar, es decir, que *nor*UDCA estimula principalmente la secreción ductular mientras UDCA estimula la secreción biliar canalicular corriente arriba de los conductos afectados.

Una relación causal entre la inflamación portal y lobular que lleva a la fibrosis periductal y proliferación ductular además de la formación de carcinoma hepatocelular (HCC) en *Mdr2*^{-/-} se ha demostrado recientemente (Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004, Pikarsky, Porat, et al. 2004). En el estudio actual *nor*UDCA normalizó la proliferación de hepatocitos y células epiteliales del conducto biliar. Pikarsky et al. han demostrado una reducción de la inflamación y formación de HCC relacionada usando el fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID) ibuprofeno en este modelo (Pikarsky, Porat, et al. 2004). Los efectos terapéuticos de NSAID y *nor*UDCA pueden combinarse e incluso amplificarse por sulindac, un NSAID, que experimenta derivación colehepática en ratas (Bolder, Trang, et al. 1999).

Los ácidos biliares naturales están N-acil amidados (conjugados) de forma eficiente en una unión amida con glicina o taurina y después secretados en el canalículo biliar. En contraste, los ácidos biliares *nor* (C₂₃) tienen marcadas diferencias en su biotransformación y propiedades fisiológicas cuando se compara con sus homólogos (C₂₄) naturales. Se mostró que *nor*UDCA da por resultado una inducción coordinada y fuerte de *Sult2a1* (una transferasa

- que sulfata preferentemente esteroides y ácidos biliares) y Mrp4 (un transportador de esteroides y ácidos biliares sulfatados) (Schuetz, Strom, et al. 2001, Zelcer, Reid, et al. 2003). Las implicaciones funcionales de estos descubrimientos se soportan por la aparición de sulfatos de ácido biliar y glucurónidos en la orina de *Mdr2*^{-/-} alimentados con *norUDCA*. La inducción adaptable de detoxificación de ácido biliar por *norUDCA* por medio de metabolismo de fase I (hidroxilación) y II (sulfatación, glucuronación) puede dar por resultado metabolitos de ácido biliar mejor solubles en agua y por lo tanto menos tóxicos que se eliminan por bombas de eflujo hepatocelular alternativo (por ejemplo, Mrp4) seguido por su excreción renal como se demuestra en este ejemplo. La inducción de dichos mecanismos por *norUDCA* fue mucho más pronunciado que la de UDCA (en este ejemplo) o ligandos agonistas de CAR presentado anteriormente (Assem et al. 2004). Esto muestra que *norUDCA* induce profundamente la detoxificación de ácidos biliares mediada por Sult2a1 y exportación por sobreexpresión adaptable de Mrp4 mientras *norUDCA* en si mismo experimenta derivación colehepática continuada. Esto tiene un efecto beneficioso dual (i) desplazando y diluyendo los ácidos biliares tóxicos en bilis ductular e (ii) induciendo una coleresis rica en bicarbonato ductular que reduce el estrés oxidativo.
- La generación de una coleresis rica en bicarbonato por *norUDCA* tiene también implicaciones terapéuticas en colangiopatías humanas (por ejemplo, PSC, PBC, rechazo de injerto hepático crónico, colangitis destructiva no supurativa), ya que la derivación colehepática da por resultado un flujo continuo de moléculas a través del epitelio ductular biliar que ayuda a los conductos biliares alterados a manejar mejor el estrés tóxico/oxidativo. Por ejemplo, sulindac, un NSAID que también experimenta derivación colehepática en seres humanos, se ha mostrado que mejora las enzimas hepáticas en pacientes de PBC con respuesta incompleta al tratamiento de UDCA.
- De interés existen dos paralelismos en el metabolismo de *norUDCA* entre los ratones y los seres humanos que contrastan con las observaciones anteriores en otros roedores y animales experimentales (por ejemplo, ratas fistulares biliares, hámster, cobaya). Primero ambos, ratones y también hombres, muestran considerable excreción renal de *norUDCA*. Además, se encontró también que el metabolito principal de *norUDCA* en ratones era un glucurónido que está también en línea con los descubrimientos en seres humanos.
- Segundo, en contraste con ratas (Yoon, Hagey, et al. 1986) la potencia colerética estimada de *norUDCA* en ratones y seres humanos cubre aproximadamente tres veces por encima de la del flujo de bilis normal en ambas especies. Sin embargo, *norUDCA* indujo el flujo de bilis a un grado mucho mayor en ratas (160 ml/min-kg). Sin embargo tomados juntos estos descubrimientos podría mostrarse que los efectos de *norUDCA* en *Mdr2*^{-/-} puede extrapolarse directamente a las enfermedades hepáticas colestáticas humanas.
- En resumen, podría mostrarse que *norUDCA* cura la colangitis esclerosante en *Mdr2*^{-/-}. *norUDCA* es un compuesto efectivo para las enfermedades hepáticas colestáticas particularmente para PSC humana y enfermedades hepáticas relacionadas con mutaciones *MDR3*.

Referencias

- Bolder et al. Gastroenterology 1999; 117(4):962-971.
- Cohen et al. Gastroenterology 1986; 91(1):189-197.
- Fickert et al. Gastroenterology 2001; 121(1):170-183.
- Fickert et al. Gastroenterology 2002; 123(4):1238-1251.
- Fickert et al. Gastroenterology 2004; 127(1):261-274.
- Hofmann et al. Pediatr Transplant 1999; 3(3):219-224.
- Jacquemin et al. Hepatology 1997; 25(3):519-523.
- Jacquemin E. Clin Liver Dis 2000; 4(4):753-763.
- Jansen et al. Liver Int 2003; 23(5):315-322.
- Lammert et al. Hepatology 2004; 39(1):117-128.
- Paumgartner et al. Hepatology 2002; 36(3):525-531.
- Pikarsky et al. Nature 2004; 431(7007):461-466.
- Schmassmann et al. Hepatology 1990; 11(6):989-996.
- Trauner M et al. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13(8):979-996.
- Wagner et al. Gastroenterology 2003; 125(3):825-838.
- Yoon et al. Gastroenterology 1986; 90(4):837-852.

Listado de secuencias

<110> Medizinische Universitat Graz

5 <120> Uso de 24-norUDCA
 <130> R 59692

10 <140> DESCONOCIDO
 <141> 12-05-2005
 <160> 34

15 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 1
 caatgggaac gttggaaga 19

30 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

<400> 2
 tgatgcactg gaagaggaac 20

40 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 3

50 ccaccagtag cacacttcc 20

55 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

60 <400> 4
 ttccatctcc atcacagtat ca 22

65 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 5
 ctgggtgtg acgttccat ta 22
 10 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 20 ccgacagcac gaggctt 18
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 7
 gccaggaccg ctcagaga 18
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 40 tgcctcgact gttagtcaag ca 22
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 50 gccaccaag aacgatagtc a 21
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 60
 65

gaaggcaact ggatggaagt ct 22

5 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 11

15 cccaccaagt ctaactctct ggaa 24

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 12

25 ggggtctgac tgcacaaag a 21

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 13

cctcaacgga agaaccaaag ag 22

40 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 14

50 ctgagacagc gaggcacatc 20

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN

55 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

60 <400> 15

ggcaggcca cactgagt 18

65 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 16
 agtcctcaga tgcagccta gtga 24
 10 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 20 ttagatgggc ctctggttct 20
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 18
 gccacaatt ccaattccaa cctt 24
 <210> 19
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 19
 acatcaggtc ggccatcact 20
 45 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 55 cgtaccggat gagctgtgaa tt 22
 <210> 21
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 65 <400> 21

ES 2 547 127 T3

gcaggggtcc aacgatgtg 20

5 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 22

15 gcagccatcg actaggacag a 21

20 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<400> 23

30 ggtggtttc agttcagcta tgg 23

35 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

40 <400> 24

45 ctggaagaa gtctgaggaa tgc 23

50 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador

<400> 25

60 tcgacatgga gctggtgaaa 20

65 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

60 <400> 26

ctggcgagcc ttagttgga 20

65 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 27
 gaccctcaca ctcagatcat ctct 25
 10 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 28
 20 cctccacttg gtggttgct 20
 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 29
 tgactaaac agcagaaccg ag 22
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 30
 40 ttgctcagcc tcatgcactg 20
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 50 ggaaggacca cgactcataa c 21
 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 32
 60
 65

gattcttcac aaggtttgtg ttacc 25

5 <210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 33

15 tctgagccct gcatctatct g 21

20 <210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 34

25 cccagaggc gttgacata 19

REIVINDICACIONES

1. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el uso en el tratamiento y/o la prevención de esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica.
- 5 2. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el uso según la reivindicación 1, caracterizado en que el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo se formula(n) para administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, tópica o rectal.
- 10 3. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado en que el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo se va(n) a administrar a un paciente en una cantidad de 25 mg a 5 g, preferiblemente 100 mg a 2,5 g, en particular 800 mg a 1,5 g por día.

Fig. 1

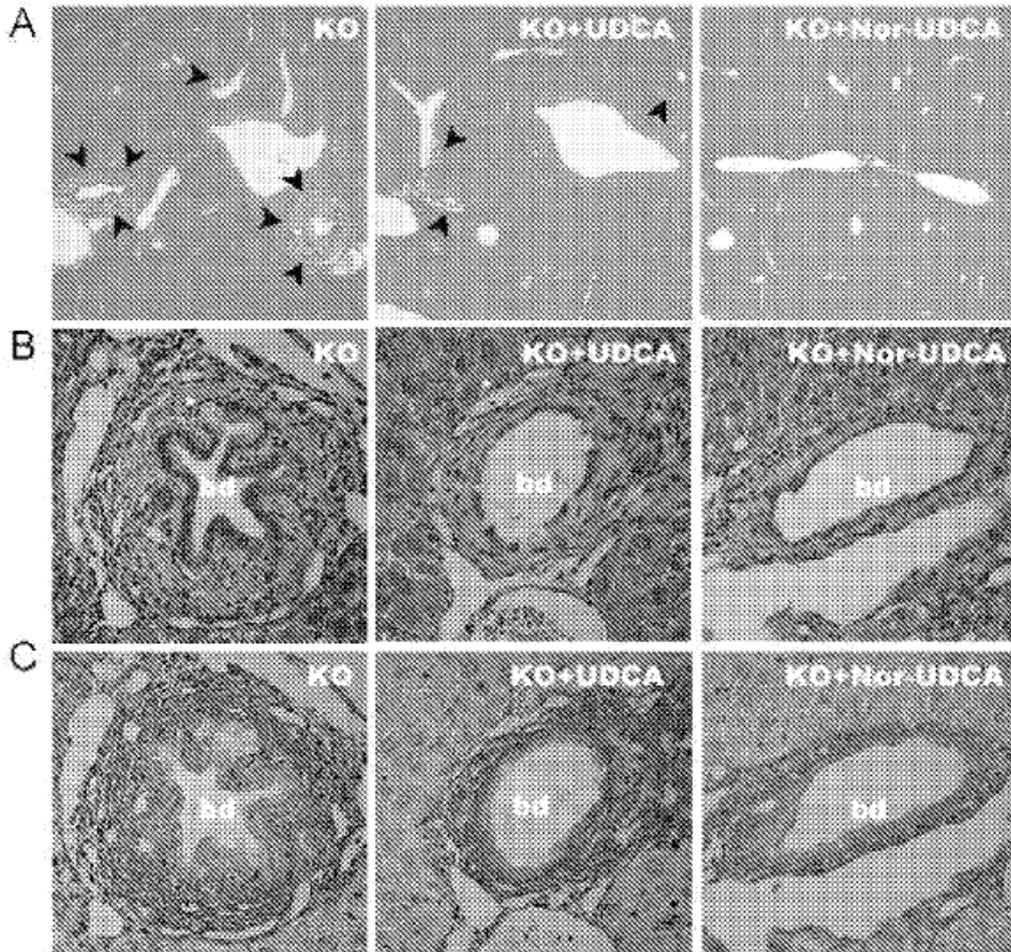


Fig. 2

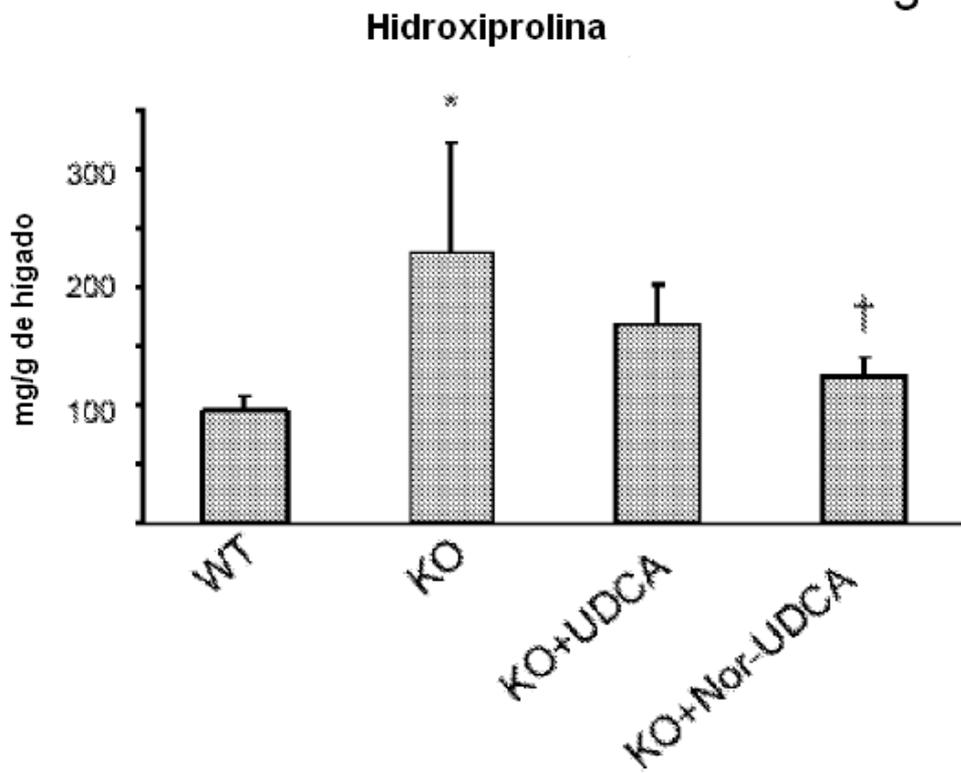


Fig. 6

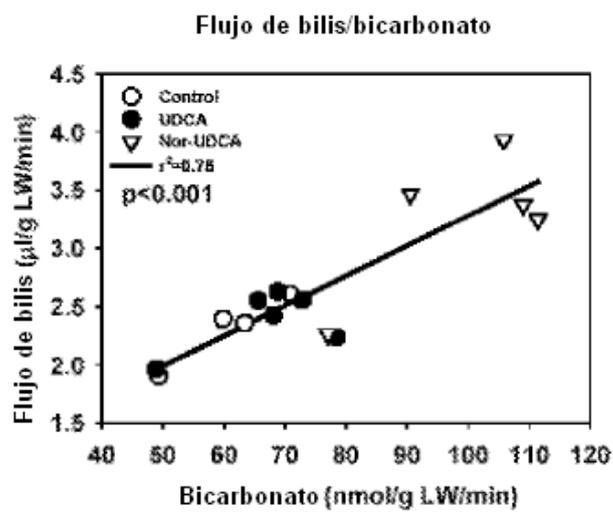


Fig. 3

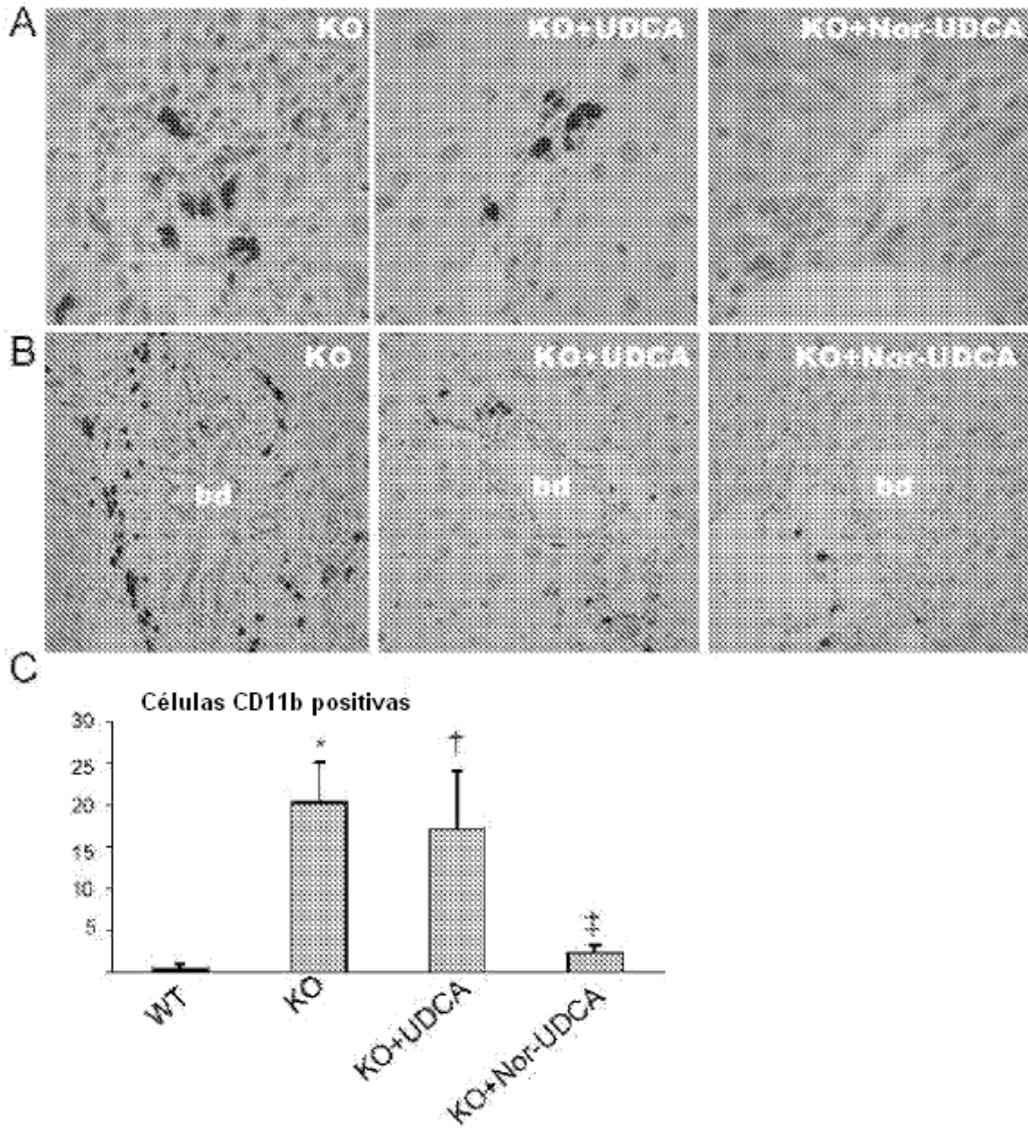


Fig. 4

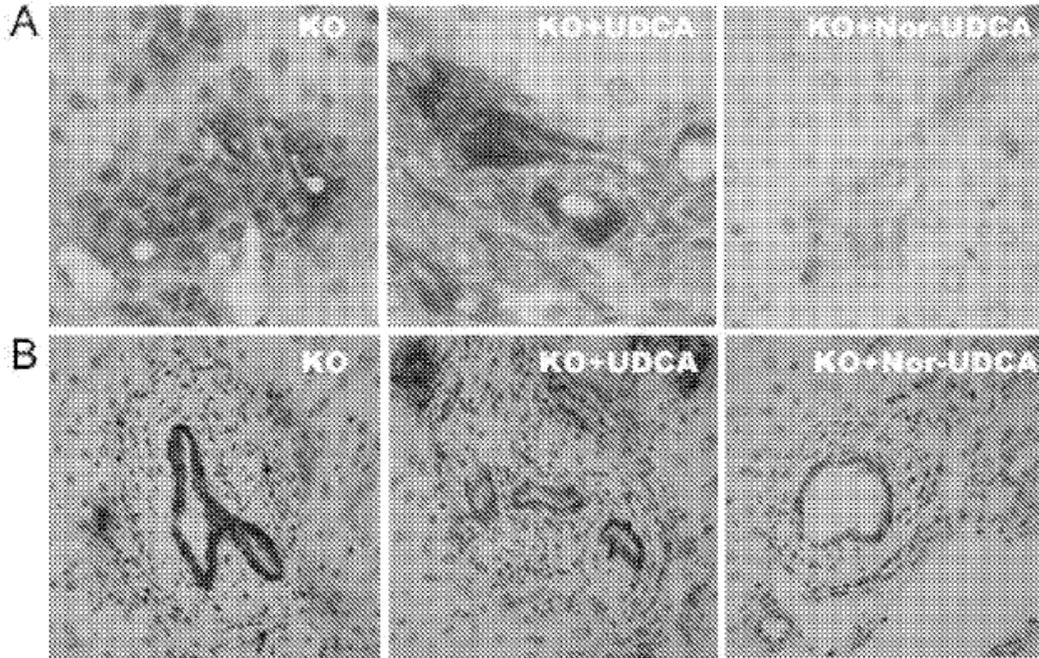


Fig. 7

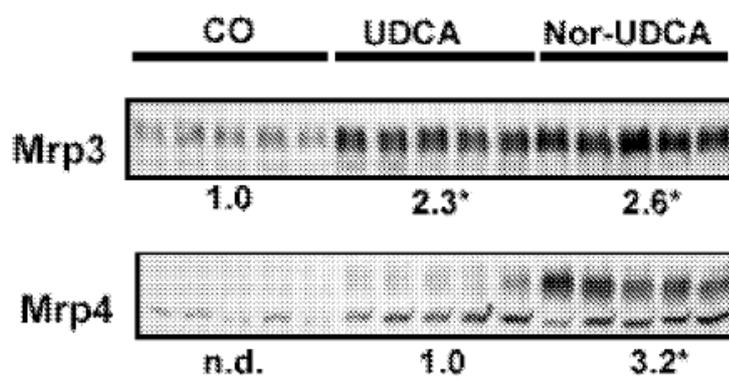


Fig. 5

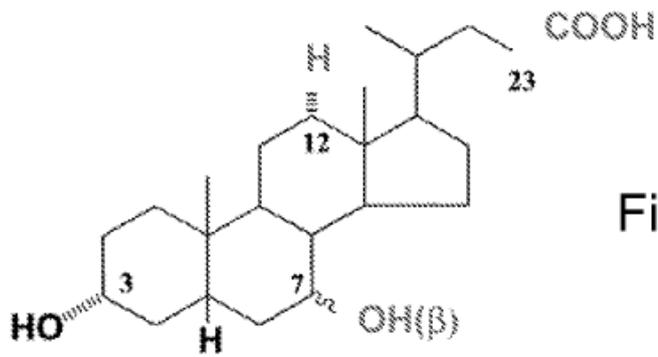
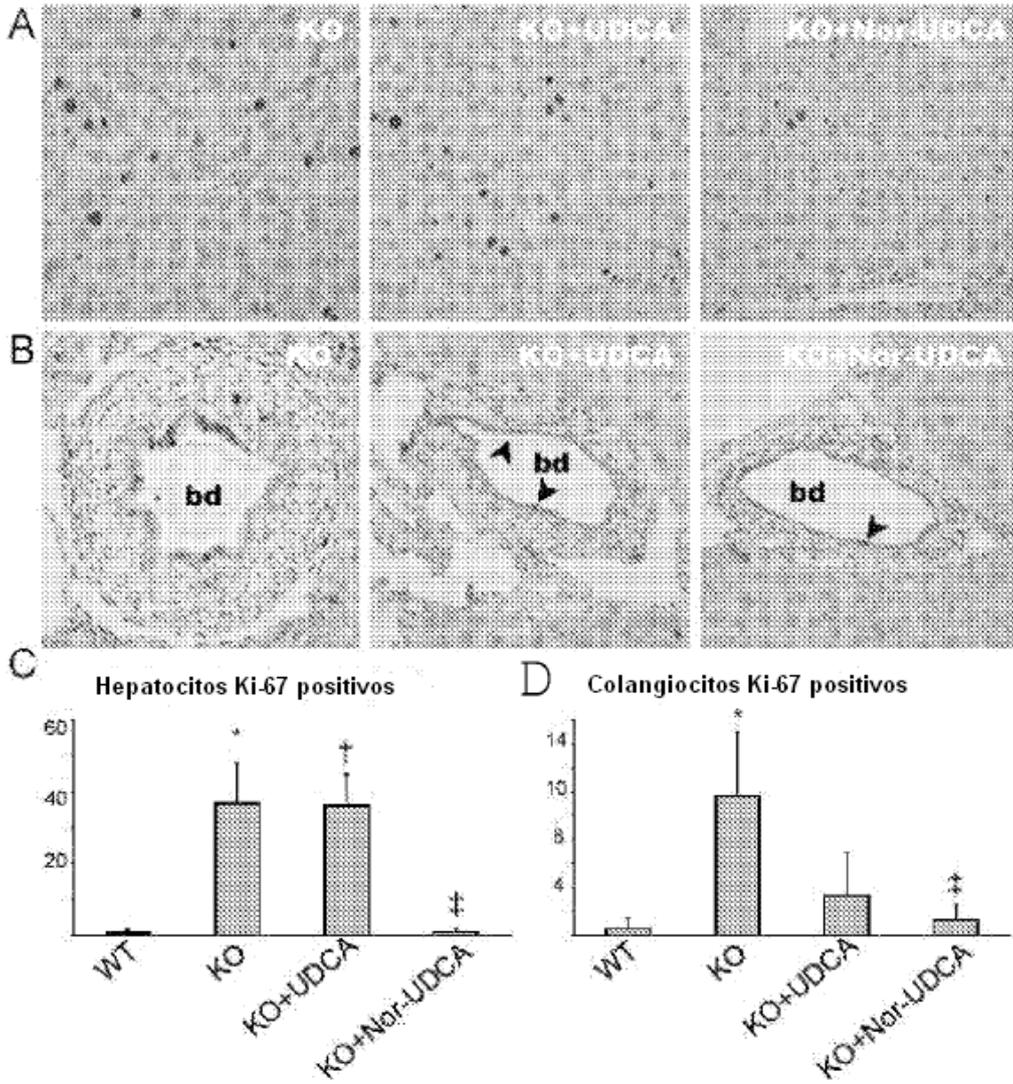


Fig. 8