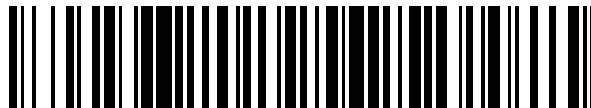


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 204**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005** **E 11176272 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2392337**

54 Título: **Uso de 24-norUDCA**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2015

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 2 550 204 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

La presente invención se refiere a nuevos usos del ácido 24-*nor*-ursodesoxicólico (*nor*UDCA) tal y como se definen en las reivindicaciones.

5 El ácido ursodesoxicólico (UDCA), el ácido biliar de origen natural, que se puede encontrar en pequeñas cantidades en la bilis y en la sangre de los seres humanos, es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades hepáticas, en donde una de las áreas de indicación más importantes del UDCA es la disolución de los cálculos biliares y el tratamiento de la cirrosis biliar primaria (PBC) y colangitis esclerosante primaria (PSC). El UDCA es un ácido biliar natural citoprotector, estabilizador de membrana y con efectos anti-apoptóticos. Por otra parte, el
10 UDCA disminuye los niveles séricos de bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina como marcador de la colestasis (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).

Los estudios de UDCA en pacientes que sufren de enfermedades del hígado, especialmente los pacientes con PBC, han demostrado que la administración de UDCA aumenta la velocidad de flujo de la bilis desde los hepatocitos, combatiendo de este modo la colestasis y diluyendo e inhibiendo los ácidos biliares tóxicos, que son los principales
15 responsables de la lesión de los hepatocitos. Además, el UDCA también es capaz de inhibir la respuesta inmune en el hígado reduciendo la lesión inmunológica de los conductos biliares y del hígado. UDCA- como hemos dicho - se utiliza regularmente para tratar PSC y PBC.

La PSC, que afecta principalmente a los machos, es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, lo que puede conducir a la colestasis (bloqueo del transporte de bilis al intestino). El bloqueo de los conductos biliares conduce a la acumulación de ácidos biliares en el hígado y en la bilis, daña el hígado y eventualmente causa la insuficiencia hepática. La mayoría de los pacientes que sufren PSC muestran también una inflamación crónica del colon (por ejemplo, colitis ulcerosa). La inflamación del conducto biliar puede afectar también al tejido hepático circundante y dar lugar a una cicatrización de los conductos biliares pequeños y grandes, lo que causará que la
20 constricción del sistema biliar. En consecuencia, esta constricción conduce a una secreción alterada de líquido biliar dañando aún más el hígado. En el transcurso de la enfermedad se pueden desarrollar cirrosis hepática y colangiocarcinoma. También PBC es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, que afecta inicialmente los conductos biliares más pequeños y finalmente da como resultado cirrosis hepática. En contraste con PSC, PBC afecta principalmente a las hembras y no está relacionada con las enfermedades inflamatorias del colon.

El método más eficaz para el tratamiento de PBC y PSC es el trasplante de hígado. Hasta ahora el único tratamiento farmacológico prometedor de ambas enfermedades implica el uso de UDCA. En la actualidad, el UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas (Paumgartner y Beuers 2002). El UDCA se utiliza en PBC a una dosis de 12-15mg/ kg/ día (generalmente 1000-1500 mg) administrado por vía oral una vez o dos veces al día. Este uso ha sido aprobado por la "Food and Drug Administration" de EE.UU. Se ha añadido colchicina al tratamiento con UDCA. La colchicina se prescribe a una dosis de 0,6 mg dos veces al día, debido a sus potenciales efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos. Varios estudios han demostrado mejoras leves en las pruebas hepáticas utilizando colchicina. Sin embargo, ninguno encontró un beneficio para la histología hepática o la supervivencia de pacientes con PBC. El metotrexato, un agente inmunosupresor, es otro fármaco que ha sido probado en la PBC. Se administra a una dosis de 15 mg por semana. En estudios pequeños, el metotrexato ha mejorado los síntomas, los análisis de sangre del hígado y la progresión de la histología cuando se utiliza durante
30 varios años. Sin embargo, el metotrexato provoca efectos secundarios graves, incluyendo supresión de la médula ósea, el empeoramiento de la enfermedad hepática y fibrosis pulmonar potencialmente mortal.

El UDCA tiene eficacia limitada en PSC y no se ha demostrado que prolongue la supervivencia (libre de trasplante de hígado Trauner y Graziadei 1999, & Paumgartner Beuers 2002). Los ensayos en curso examinan si las dosis altas de UDCA pueden ser más eficaces. En particular, el UDCA reduce el riesgo de cáncer de colon en pacientes con PSC y colitis ulcerosa. Sobre la base de la hipótesis de que la PSC tiene una causa inmunológica, se han probado corticosteroides y otros inmunosupresores. Los corticosteroides orales produjeron una mejoría inicial en el perfil bioquímico. Sin embargo, la falta de pruebas para el beneficio a largo plazo, así como la desmineralización ósea, son un argumento en contra de la utilización de este régimen. Otros medicamentos como la cazatioprina, la ciclosporina, probados en asociación con corticosteroides y UDCA, nunca han sido evaluados por sí solos en la
45 terapia de la PSC. El metotrexato y la D-penicilamina también demostraron ser ineficaces. Por lo tanto, la terapia farmacológica para la PSC necesita todavía ser optimizada (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).

El tratamiento endoscópico en pacientes con PSC estricturas sintomáticas dominantes, cálculos biliares o restos se considera que es una opción valiosa además del tratamiento médico. Los pacientes con PSC sometidos a tratamiento endoscópico tenían una mayor supervivencia, que era mucho mayor que la predicha a partir de los modelos de supervivencia.
55

El trasplante ortotópico de hígado es una terapia eficaz para PSC y hasta ahora la única opción para salvar la vida de la enfermedad en fase terminal. Después del trasplante, sin embargo, PSC tiende a reaparecer en 15-30% de los

- pacientes, y también hay una alta tasa de recurrencia de estenosis biliares, rechazo crónico, y colangitis reflujo. Desafortunadamente, el uso de inmunosupresores no mejora la supervivencia y la recurrencia de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un tratamiento eficaz de drogas prevención de progresión de la enfermedad de PSC, así como la recurrencia después del trasplante hepático (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002).
- Aunque el UDCA, que se tolera bien con la excepción de raros episodios de diarrea y prurigo (Trauner & Graziadei 1999, Beuers & Paumgartner 2002), se utiliza principalmente para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas, la eficacia del UDCA en PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas como la colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3 es muy limitada (Trauner & Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et al. 1999).
- En el documento EP0652773B1 se describe el uso de derivados nor y homo de ácidos biliares, opcionalmente conjugados con taurina, glicina o alanina, como potenciadores de la absorción de medicamentos por vía enteral y otras vías no parenterales. Estos derivados muestran propiedades lipófilas y detergentes y no se metabolizan por la flora bacteriana intestinal.
- El documento EP0624595B1 describe derivados nor diméricos de ácidos biliares para el uso en un medicamento, especialmente apropiado para el tratamiento de la hiperlipidemia. Las sustancias descritas en la misma consisten en dos derivados de ácidos biliares individuales, que están unidos covalentemente entre sí.
- El documento US4892868 describe el ácido 22-metil-nor-ursodesoxicólico y el ácido 23-metil-ursodesoxicólico que se utilizan para tratar los trastornos de la función hepatobiliar, con particular referencia al metabolismo del colesterol y a la producción de bilis (por ejemplo, para el tratamiento de la colestasis).
- Es un objeto de la presente invención proporcionar productos farmacéuticos alternativos para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas, seleccionadas entre el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma, que son más eficaces que los fármacos conocidos como el ácido ursodesoxicólico y muestran menos efectos secundarios que el metotrexato.
- Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso del ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma.
- De forma inesperada resultó que un medicamento o composición farmacéutica que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico, un análogo de cadena lateral C₂₃ corta del ácido ursodesoxicólico (UDCA) ácido biliar C₂₄ de origen natural, y/o sus sales farmacéuticamente aceptables puede ser empleado con éxito para el tratamiento de diversas 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 características diferentes cuando se administran a mamíferos (véase, por ejemplo Yoon YB, Hagey LR, et al., 1986).
- El ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sus sales conducen a la inducción de la secreción de bicarbonato biliar, lo que diluye el contenido biliar tóxico y protege a las células epiteliales del conducto biliar contra el estrés oxidativo ya que el bicarbonato es un limpiador potente para especies reactivas de oxígeno. Esto conduce a la reconstitución de la función de barrera del colangiocito y detendrá la pericolangitis en curso y la fibrosis periductal posterior, reduciendo al mínimo la lesión de las células epiteliales del conducto biliar del lumen del conducto biliar. Además, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sus sales resultó tener también efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos.
- A diferencia del ácido 24-nor-desoxicólico y sus sales, el ácido ursodesoxicólico sólo mejora la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares y aumenta los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) e induce infartos biliares. Sin embargo, el ácido ursodesoxicólico no mejora la enfermedad del conducto pequeño. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares en lo que respecta a la lesión hepática puede estar relacionado con las diferencias en el nivel de secreción de la bilis es decir, que el ácido 24-nor-ursodeoxicólico y sales estimulan principalmente la secreción ductular mientras que el ácido ursodesoxicólico estimula la secreción canalicular de la bilis aguas arriba de los conductos afectados.
- La administración de ácido 24-nor-desoxicólico y sus sales induce la desintoxicación del ácido biliar a través de la hidroxilación, la sulfatación y glucuronidación dando como resultado metabolitos de ácidos biliares con una mejor solubilidad en el agua y por lo tanto menos tóxicos, que diluyen los ácidos biliares tóxicos en la bilis ductular e inducen un coleresis ductular rica en bicarbonato reduciendo el estrés oxidativo.
- La generación de una coleresis rica en bicarbonato por el ácido 24-nor-ursodeoxicólico y sus sales también tiene implicaciones terapéuticas en las colangiopatías humanas (por ejemplo, PSC, PBC, el rechazo del injerto hepático crónico, la colangitis destructiva no supurativa), como derivación colehepatica da como resultado un flujo continuo de moléculas a través del epitelio ductal biliar que ayuda a los conductos biliares alterados a manejar mejor el estrés tóxico/oxidativo. Por ejemplo, sulindaco, un AINE que también experimenta derivación colehepatica en los seres

humanos, se ha demostrado que mejora las enzimas hepáticas en pacientes con PBC con respuesta incompleta al tratamiento con UDCA.

5 Los métodos para la preparación de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sus sales son conocidos por el experto en la técnica y se pueden preparar preferiblemente mediante un método como se describe en Schteingart CD y Hofmann AF (J. Lip. Res. 29 (1988): 1387-1395).

Por supuesto, el medicamento según la presente invención puede usarse en seres humanos, así como en los mamíferos (por ejemplo, cerdos, caballos, primates, ganado, gatos, perros).

10 Un medicamento que comprende el ácido 24-nor-desoxicólico y sus sales puede ser utilizado para la prevención/quimioprevención del carcinoma de hígado, seleccionado entre el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma. También pueden ser tratados con este fármaco el rechazo del injerto hepático crónico y la colangitis destructiva no supurativa.

Especialmente las enfermedades que son un resultado o consecuencia de una lesión de la vía biliar pueden ser tratadas por un medicamento que comprende el ácido 24-nor-ursodeoxicólico y sus sales.

15 Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como el ibuprofeno reducen la inflamación portal y lobular en el hígado (que dará lugar a la fibrosis periductal y a la proliferación ductular) y la formación del carcinoma hepatocelular (HCC) (Pikarsky, Porat, et al. 2004). Dado que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sus sales exhiben también propiedades anti-inflamatorias, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede utilizarse solo o en combinación con otros fármacos anti-inflamatorios, como los AINE (por ejemplo, ibuprofeno, sulindaco (Bolder, Tran, et. al 1999)).

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

25 Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, preferiblemente efervescentes o tabletas masticables, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el ácido 24-nor- ursodesoxicólico se pueden mezclar con sustancias usadas normalmente como sacarosa, manitol, sorbitol, almidón y derivados de almidón, lactosa, agentes lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio), disgregantes y agentes amortiguadores. Las tabletas y píldoras pueden prepararse también con recubrimientos entéricos con el fin de evitar que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico se vea afectado por los ácidos y enzimas del estómago. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden comprender además celulosa microcristalina y/o fosfato dicálcico.

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

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

45 Las preparaciones inyectables, por ejemplo suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes adecuados, agentes humectantes y/o agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar está el agua y una disolución de cloruro de sodio isotónica. Los aceites fijos estériles también se utilizan convencionalmente como disolvente o medio de suspensión.

50 De acuerdo con la presente invención las formas de dosificación que comprenden el 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. Los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, aceites, preferiblemente aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, agentes tensioactivos, aceites esenciales, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, es de ácidos grasos de petroetral, hidroximetil-celulosa y polivinilpirrolidona. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, amortiguadores, colorantes, sustancias aromatizantes y/o

aromáticas que no reaccionar de forma perjudicial con los compuestos activos. Para la aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantas.

5 Se conocen diversos sistemas de liberación y se pueden utilizar para administrar ácido 24-nor-ursodesoxicólico, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y microgránulos (por ejemplo EP1317925). La dosis requerida se puede administrar como una sola unidad o en una forma de liberación prolongada.

10 La biodisponibilidad del ácido 24-nor-ursodesoxicólico se puede mejorar mediante la micronización de las formulaciones utilizando técnicas convencionales tales como trituración, molienda y secado por atomización en presencia de los excipientes adecuados o de agentes tales como fosfolípidos o tensioactivos.

15 Según la invención el ácido 24-nor-ursodesoxicólico se pueden formular en forma de una sal o farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables del ácido 24-nor-ursodesoxicólico incluyen preferiblemente sales metálicas, en particular sales de metales alcalinos, u otras sales farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos, como ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico, o ácidos orgánicos, como los ácidos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, 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, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, algénico, sulfanílico, esteárico, p-hidroxitúterico, ciclohexilaminosulfónico, galactárico y galacturónico. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales metálicas elaboradas 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 24-nor-ácido ursodesoxicólico se pueden preparar por métodos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo haciendo reaccionar ácido 24-nor-ursodesoxicólico con el ácido o base apropiada). Los métodos para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la presente invención que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico y formulado para la administración como se describe en el presente documento se pueden encontrar, por ejemplo, en el "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations" (Sarfara K Niazi, CRC Press LLC, 2.004).

25 El medicamento comprende preferiblemente una cantidad eficaz de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y un transportador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

35 En promedio el ácido 24-nor ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar a un paciente preferiblemente en una cantidad de 25 mg a 5 g, preferiblemente de 100 mg a 2,5 g, en particular de 800 mg a 1,5 g por día. Sin embargo, se administra más preferiblemente a un paciente 1 g de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Se observa además que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden administrarse a un individuo en 1-100 mg/kg/d, preferiblemente de 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 vez o preferiblemente en más de una dosis (al menos 2, 3, 4, 5 ó 10 dosis) por día. El medicamento o la composición farmacéutica según la presente invención se pueden administrar durante más de una semana, preferiblemente durante más de cuatro semanas, más preferiblemente durante más de seis meses, lo más preferiblemente durante más de un año, en particular, durante toda la vida.

40 El ácido 24-nor-ursodesoxicólico se pueden administrar no sólo en combinación con transportadores farmacéuticamente aceptables y en las formas de dosificación que se describen en la presente memoria, sino, por supuesto, también en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales (por ejemplo, ácido ursodesoxicólico, AINE, como sulindaco y el ibuprofeno), que se sabe que son también eficaces para tratar la misma enfermedad o similares (por ejemplo, el ácido ursodesoxicólico) o contra otras enfermedades, que pueden ser preferiblemente resultado de una enfermedad hepática.

45 La presente invención se ilustra a continuación mediante las siguientes figuras y ejemplo.

Fig. 1. El norUDCA cura la colangitis esclerosante en ratones *Mdr2*^{-/-}.

50 (A) la histología hepática (tinción H & E) en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO), ratones *Mdr2*^{-/-} (KO + UDCA) y ratones *Mdr2*^{-/-} (KO + norUDCA) alimentados con la dieta de control (Ampliación x 10). La enfermedad de los conductos biliares grandes pronunciada en KO (puntas de flecha), reducida significativamente en KO+UDCA (puntas de flecha) y 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 (aumento x 40). (C) La tinción con rojo sirio muestra fibrosis significativa con fibras de colágeno

periductales (rojo) en KO. Reducción moderada de la fibrosis en KO + UDCA y reducción aún más pronunciada en KO + *nor*UDCA (Ampliación de b, c x 40); bd, conducto biliar.

Fig. 2. El *nor*UDCA reduce significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en *Mdr2*^{-/-}.

5 Contenido de hidroxiprolina hepática en el tipo silvestre (WT), en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO) alimentados con la dieta control, en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+UDCA) alimentados con UDCA y en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+*nor*UDCA) alimentados con Nor-UDCA. El contenido de hidroxiprolina hepática es significativamente mayor KO en comparación con WT y se reduce a niveles basales en KO+*nor*UDCA. Los valores son promedios ± SEM de n = 5 por grupo. p <0,05, WT vs. KO; KO vs KO+*nor*UDCA.

Fig. 3. El *nor*UDCA reduce significativamente la infiltración/extravasación portal de neutrófilos en *Mdr2*^{-/-}.

10 Inmunohistoquímica para CD11b (rojo, tinción de neutrófilos) de ratones *Mdr2*^{-/-} (KO) alimentados con la dieta control, en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+UDCA) alimentados con UDCA y en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+*nor*UDCA) alimentados con Nor-UDCA de (A) interlobular y (B) conductos biliares lobulares. (C) Cuantificación de las células CD11b-positivas por 20 campos portales. El *nor*UDCA reduce significativamente el número de células CD11b-positivas en *Mdr2*^{-/-}. Los valores son promedios ±SEM de n= 3 por grupo. p <0,05.

15 **Fig. 4. El *nor*UDCA inhibe la expresión de la molécula de adhesión celular vascular portal (VCAM) en ratones *Mdr2*^{-/-}.**

20 Inmunohistoquímica para VCAM (rojo) en los conductos biliares interlobulares (A) y lobulares (B) de ratones *Mdr2*^{-/-} (KO) alimentados con la dieta control, en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+UDCA) alimentados con UDCA y en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+*nor*UDCA) alimentados con Nor-UDCA. (A) No hay diferencia obvia en la expresión de VCAM portal entre KO y KO+UDCA mientras que KO + *nor*UDCA muestra una expresión significativamente menor en las proliferaciones de los conductos biliares. (B) A nivel de los conductos biliares lobulares tanto el UDCA como el *nor*UDCA reducen la expresión de VCAM colangiocelular.

Fig. 5. El *nor*UDCA inhibe la proliferación de los hepatocitos y colangiocitos en ratones *Mdr2*^{-/-}.

25 Inmunohistoquímica de Ki-67 (rojo) en los hepatocitos (A) y colangiocitos (B) de ratones *Mdr2*^{-/-} (KO) alimentados con la dieta control, en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+UDCA) alimentados con UDCA y en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+*nor*UDCA) alimentados con Nor-UDCA. (A) Numerosos hepatocitos positivos para Ki-67 en KO y KO + UDCA y núcleos positivos dispersos en KO + *nor*UDCA. (B) Numerosos colangiocitos positivos para Ki-67 en KO, pocos colangiocitos positivos (cabezas de flecha) en KO + UDCA y KO + *nor*UDCA, respectivamente. (C) Número de hepatocitos positivos para Ki-67 por 30 HPF y (D) número de colangiocitos positivos para Ki-67 positivos por 20 campos portales. Sólo el *nor*UDCA reduce significativamente el número de hepatocitos y colangiocitos que proliferan. Los valores son promedios ± SEM de n = 3 por grupo. p <0,05, * WT vs. KO; † WT vs. KO +UDCA; ‡ KO vs *nor*UDCA.

Fig. 6. Correlación positiva entre la producción de bicarbonato biliar y el flujo de bilis en *Mdr2*^{-/-}.

35 Se representó la producción de bicarbonato biliar frente al flujo de bilis en ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta control (control, círculos abiertos), en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+UDCA) alimentados con UDCA (UDCA, triángulos abiertos) y en ratones *Mdr2*^{-/-} (KO+*nor*UDCA) alimentados con *nor*-UDCA (*nor*UDCA, círculos cerrados). Nótese la correlación positiva entre la producción de bicarbonato y el flujo de bilis, así como la agrupación de los animales tratados con Nor-UDCA que muestran la producción de bicarbonato más alta en la parte superior derecha.

Fig. 7. Mecanismos terapéuticos sugeridos del *nor*UDCA en los ratones *Mdr2*^{-/-}.

40 El *nor*UDCA es absorbido por los hepatocitos y se secreta en los canalículos y conductos biliares y donde es absorbido por los colangiocitos que llevan a la secreción del bicarbonato ductular. El *nor*UDCA se secreta de nuevo en el plexo peribiliar y se deriva de nuevo a los hepatocitos (derivación colehepatica). El *nor*UDCA induce la expresión de Sult2a1 etc. y Mrp3 y Mrp4 que desintoxican las sales biliares y las hace susceptibles de eliminación renal.

Fig. 8. Estructura química del *nor*UDCA (ácido 3-alfa, 7-alfa-dihidroxi-24-nor-5-beta-colan-23-oico).

45 **Ejemplo 1:**

50 Los ratones con alteración dirigida del gen (ABCB4) *Mdr2* codifica una flipasa fosfolípido canalicular desarrollan colangitis esclerosante con las características macroscópicas y microscópicas parecidas a las observadas en la colangitis esclerosante humana (por ejemplo, la colangitis esclerosante primaria, PSC) (Fickert, Zollner, et al. 2002, Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004). Las lesiones del conducto biliar en estos ratones está vinculada a la secreción defectuosa de fosfolípidos biliares dando como resultado un aumento de la concentración de ácidos biliares no micelares libres que posteriormente causan la lesión de las células epiteliales del conducto biliar (colangiocitos), la pericolangitis, la fibrosis periductal con la proliferación ductular y, finalmente, la colangitis esclerosante (Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004, Lammert, Wang, et al. 2004). Además de la oportunidad de estudiar nuevas estrategias de tratamiento para PSC este modelo puede ser relevante para probar terapias para el amplio espectro de

enfermedades de hígado humano que resultan de mutaciones *MDR3* (ortólogo humano de *Mdr2*) que van desde la colestasis neonatal a la enfermedad de hígado adulto (Jansen & Sturm 2003).

En la actualidad, el UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas (Paumgartner y Beuers 2002). Sin embargo la eficacia de UDCA en PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas debidas a mutaciones *MDR3* (por ejemplo colestasis tipo 3 intrahepática familiar progresiva) es limitada (Trauner y Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et al. 1999). Acortamiento de la cadena lateral de UDCA podría aumentar su eficacia terapéutica ya que esta modificación influye significativamente en las propiedades fisiológicas de ácidos biliares (Hofmann 1999, Schmassmann, Hofmann, et al., 1990, Yoon, Hagey, et al., 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). El *norUDCA*, un análogo C₂₃ de UDCA de cadena lateral acortada, es un agente colerético potente en diferentes roedores (por ejemplo, hámster, rata, cobaya) que padecen derivación colehepática extensa e induciendo la secreción de bicarbonato biliar a nivel del conducto biliar (Yoon, Hagey, et al. 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). A diferencia de UDCA, los efectos del *norUDCA* nunca han sido estudiados en la colestasis. Para probar la hipótesis de que la derivación colehepática de un ácido biliar no tóxico puede ser beneficiosa en el tratamiento de colangiopatías se investigaron los efectos del *norUDCA* en ratones *Mdr2*^{-/-} como un modelo de la colangitis esclerosante (Fickert, Fuchsbichler, et al 2004). En este ejemplo se examinan los efectos positivos del *norUDCA* en el tratamiento de enfermedades hepáticas humanas causadas por mutaciones *MDR3* y colangiopatías humanas, como la colangitis esclerosante (por ejemplo, PSC).

1.1. Materiales y métodos

1.1.1. Experimentos con Animales.

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

1.1.2. La alimentación con ácidos biliares a ratones *Mdr2*^{-/-}.

Mdr2^{-/-} de dos meses de edad (fase en la que cuando la colangitis esclerosante ya está totalmente establecida en estos animales (Fickert, Zollner, et al 2002) fueron o bien alimentados con una dieta suplementada con *norUDCA* (0,5%, w/w) o con UDCA como comparador clínico (0,5% w/w) durante 4 semanas y se comparó con los *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta estándar y con los controles de tipo silvestre.

1.1.3. Histología hepática.

Para la microscopía de luz convencional, los hígados se fijaron en una disolución de formaldehído amortiguado neutro al 4% y embebidos en parafina. Las secciones (4 µm de espesor) fueron teñidas con tinción H & E y rojo sirio, respectivamente. Las secciones fueron catalogadas y examinadas por un patólogo (H.D.) que ignoraba el tratamiento de los animales.

1.1.4. Bioquímica sérica de rutina.

Las muestras de suero se almacenaron a -70°C hasta que se realizó el análisis de la alanina transaminasa (ALT) y de la fosfatasa alcalina (AP) por química clínica de rutina en un analizador Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Para la determinación de los niveles de ácidos biliares totales en suero, se utilizó un ensayo de deshidrogenasa 3-alfa-hidroxiesteroide comercial (Ecoline S+; DiaSys, Holzheim, Alemania).

1.1.5. Inmunohistoquímica para la alfa-SMA.

La inmunohistoquímica para la alfa-SMA se realizó con secciones de parafina (4 micras de espesor) tratadas con microondas (0,01 mmol/L de tampón citrato pH 6,0) utilizando el ratón monoclonal anti alfa-SMA (dilución 1:500, Sigma, St Louis, MO). La unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako, Glostrup, Dinamarca) utilizando 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 con secciones de parafina (4 µm de espesor) tratados con microondas (0,01 mmol/L de tampón citrato pH 6,0) usando un anticuerpo anti-Ki-67 policlonal de conejo (dilución 1:750, Novocastra, Newcastle upon Tyne, Reino Unido). La unión del anticuerpo se detectó usando el sistema ABC (Dako) usando AEC (Dako) como sustrato. El número de hepatocitos proliferantes se calculó contando los núcleos positivos en 30 campos de alta potencia en secciones de 3 animales en cada grupo. El número de células epiteliales del conducto biliar proliferantes se calculó contando núcleos positivos en 20 campos portales en secciones de 3 animales en cada grupo.

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

Para cuantificar los neutrófilos se detectaron las células CD-11B positivas como se describió 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 las células positivas en 20 campos portales en secciones de 3 animales en cada grupo.

1.1.8. Inmunohistoquímica para la molécula de adhesión celular vascular (VCAM).

La inmunohistoquímica para VCAM se llevó a cabo con criosecciones fijadas en acetona utilizando el ratón monoclonal anti CD106 (VCAM-1, dilución 1:30 PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) y la unión del anticuerpo se detectó mediante el sistema ABC (Dako), utilizando AEC (Dako) como sustrato.

1.1.9. Inmunohistoquímica para aductos de 4-hidroxinonenal en proteínas.

Las secciones de hígado se desparafinaron y después se incubaron con el supresor de peroxidasa de Immunopure (Pierce, Rockford, IL) durante 30 min y posteriormente se bloquea la proteína (DAKO, Carpintería, CA) durante 2 h. Esto fue seguido de la incubación durante la noche con el anticuerpo anti-4-hidroxinonenal primario (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 hepático se determinó el contenido de hidroxiprolina. El lóbulo derecho del hígado 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 2,2% de NaOH disuelto en amortiguador citrato-acetato (50 g de ácido cítrico x H₂O, 12 ml de ácido acético, 120 g de acetato de sodio x 3 H₂O, 34 g de NaOH y 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 una disolución de p-dimetilaminobenzaldehído y se incubó a 60° C durante 20 min. Se midió el contenido de hidroxiprolina a 565 nm utilizando una curva estándar de hidroxiprolina.

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

El aislamiento del ARN, la síntesis de ADNc y PCR Taqman® en tiempo real se realizaron como se ha descrito previamente (Wagner, Fickert, et al. 2003). Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas marcadas con 5' FAM, 3' TAMRA: Colla1 fwd: caatgcaatgaagaactggactgt (Seq ID No. 1), Colla1 rev: tctacatcttctgagttgtga (Seq ID No. 2) y la sonda Colla1: cagaaagcacagcactgcctcc (Seq ID No. 3); TIMP-1 fwd: catggaagcctctgtgatatg (Seq ID No. 4), TIMP-1 rev: aagctgcaggcattgatgtg (Seq ID No. 5) y TIMP-1 sonda: ctcatcacggcgccctaaggaac (Seq ID No. 6); MMP-2 fwd: ctttgagaaggatggcaagatgg (Seq ID No. 7), MMP-2 rev: tttagtaggtgccttgaa (Seq ID No. 8) y MMP-2 sonda: cagatggacagccctgcaagttccc (Seq ID No. 9).

1.1.12. Medición de flujo de bilis.

El flujo biliar se determinó gravimétricamente y se normalizó para el peso del hígado como se ha descrito previamente (Fickert, Zollner, et al. 2001). La concentración de fosfolípidos biliares se determinó usando un kit disponible comercialmente (fosfolípido B; Wako, Neuss, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración de colesterol biliar se determinó usando un kit comercialmente disponible (Colesterol Liquicolor; Human, Wiesbaden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (GSH). La concentración del glutatión biliar se determinó después de la precipitación de la proteína en ácido metafosfórico al 5% usando el Kit de ensayo de Glutatión (Calbiochem, San Diego, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La concentración de ácidos biliares biliar se analizó usando un ensayo de deshidrogenasa 3-alfa-hidroxiesteroide (Ecoline St, DiaSys) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.1.13. El análisis estadístico.

Los datos se presentan como promedios aritméticos ± DS. Se estudiaron de 4 a 6 animales en cada grupo. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student cuando era apropiado o ANOVA con un test posterior de Bonferroni cuando se comparaban tres o más grupos. Un valor de p <0,05 fue considerado significativo.

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

Los niveles de ALT y AP sérica (como marcadores bioquímicos de la lesión hepática y de la colestasis) fueron significativamente elevados en los ratones *Mdr2*^{-/-} (KO) alimentados con la dieta estándar en comparación con los controles silvestres (Tabla 1).

Tabla 1. Bioquímica del suero y de los niveles de ácidos biliares en diversas condiciones experimentales.

	ALT (U/L)	AP (U/L)	Bilis
WT	71±19	92±13	0,09±0,003
KO	405±187	235±55	0,32±0,11
KO+UDCA	576±175*	399±73*	0,55±0,19
KO+Nor-UDCA	165±23*#	162±25*#	0,23±0,2#

NOTA. Los valores se expresan como promedio ± DS de n= 5 por grupo. ALT, alanina transaminasa; AP, fosfatasa alcalina; SBA, los ácidos biliares en suero, WT, ratones de tipo silvestre; KO, ratones *Mdr2* knock-out, KO + UDCA, ratones *Mdr2* knock-out alimentados con UDCA; KO + *norUDCA*, ratones knock-out *Mdr2* alimentados con *norUDCA*

• * p <0.05, KO vs KO + UDCA y KO vs KO + *norUDCA* (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

• #p <0,05, KO + UDCA vs KO + *norUDCA* (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

El *norUDCA* mejoró significativamente los niveles en suero de ALT y de AP en comparación con *Mdr2*^{-/-} alimentados con dieta estándar (Tabla 1). En paralelo los *Mdr2*^{-/-} alimentados con dieta estándar muestran una colangitis esclerosante pronunciada (Fig. 1) con proliferación ductular y fibrosis hepática reflejada en el contenido significativamente elevado de hidroxiprolina hepática (Fig. 2). Los *Mdr2*^{-/-} alimentados con *norUDCA* mostraron conductos biliares de tamaño medio regular y con ninguna o sólo una moderada fibrosis periductal (Fig. 1); la proliferación ductular estaba prácticamente ausente (no se muestra). En línea con estos cambios histológicos, el *norUDCA* redujo significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en *Mdr2*^{-/-} (Fig. 2), que estaba acompañada de una reducción significativa la expresión del RNAm del colágeno hepático 1 y 3 (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias (5' - 3') de los cebadores de PCR en tiempo real

	Sentido	Antisentido
Cyp2b10	CAATGGGAACGTTGGAAGA	TGATGCACTGGAAGAGGAAC
Cyp3a11	CCACCAGTAGCACACTTTCC	TTCCATCTCCATCACAGTATCA
IL-1B	CTGGTGTGTGACGTTCCCATTA	CCGACAGCACGAGGCTTT
IL-1R	GCCAGGACCGCTCAGAGA	TGCCTCGACTGTTAGTCAAGCA
IL-6	GCCCACCAAGAACGATAGTCA	GAAGGCAACTGGATGGAAGTCT
MMP3	CCCACCAAGTCTAACTCTCTGGAA	GGGTGCTGACTGCATCAAAGA
MIP-2	CCTCAACGGAAGAACCAAAGAG	CTCAGACAGCGAGGCACATC
Mrp3	GGCAGGGCCACACTGAGT	AGTCCTCAGATGTCAGCCTAGTGA
Mrp4	TTAGATGGGCCTCTGGTTCT	GCCCACAATTCCAATCCAACCTT
i-NOS	ACATCAGGTGCGCCATCACT	CGTACCGGATGAGCTGTGAATT
Procolágeno 1	GCAGGGTTCCAACGATGTTG	GCAGCCATCGACTAGGACAGA
Procolágeno 3	GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG	CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC
TGF-beta	TCGACATGGAGCTGGTGAAA	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGA
TNF-alpha	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
TNF-R1	TGCACTAAACAGCAGAACCGAG	TTGCTCAGCCTCATGCACTG
Sult2a1	GGAAGGACCACGACTCATAAC	GATTCTTCACAAGGTTTGTGTTAC
Ugt1a1	TCTGAGCCCTGCATCTATCTG	CCCCAGAGGCGTTGACATA

Se estudio de forma simultánea el tratamiento con UDCA de *Mdr2*^{-/-} como comparador clínico y el tratamiento estándar actual de las enfermedades hepáticas colestásicas (incluyendo PSC). A diferencia del *norUDCA*, el UDCA aumentó significativamente la actividad de ALT y de AP en *Mdr2*^{-/-} (Tabla 1) y 2 de cada 5 animales mostraron infartos biliares en línea con las observaciones anteriores (Fickert, Zollner, et al., 2002). El UDCA pareció reducir la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares e interlobulares (Fig. 1), pero mostró sólo una tendencia de

menor contenido de hidroxiprolina hepática sin alcanzar significación estadística (Fig. 2). Estos resultados indican claramente que el *norUDCA* (pero no el UDCA) reduce significativamente la lesión hepática, la pericolangitis y la fibrosis periductal en *Mdr2*^{-/-} conduciendo finalmente a la curación de la colangitis esclerosante.

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

5 Dado que la inflamación portal puede representar el principal desencadenante de la fibrosis periductal en *Mdr2*^{-/-} (Pikarsky, Porat, et al. 2004) se analizó la reducción de la inflamación portal con *norUDCA*. Los ratones *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta de control tenían un número significativamente elevado de neutrófilos portales en comparación con los controles de tipo silvestre (Fig. 3). El *norUDCA* también mejoró la pericolangitis en *Mdr2*^{-/-} como se refleja por un número significativamente reducido de neutrófilos portales en comparación con los *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta estándar (Fig. 3). Estos efectos anti-inflamatorios aparentes de *norUDCA* fueron acompañados de la expresión significativamente menor de VCAM en las células epiteliales del conducto biliar de los conductos biliares interlobulillares y lobulares de *Mdr2*^{-/-} alimentados con *norUDCA* (Fig. 4). Dado que se había demostrado previamente que la inflamación también desencadena la proliferación en los hígados de *Mdr2*^{-/-} (Pikarsky, Porat, et al 2004) se estudió si esta se vio afectada por el *norUDCA*. Los *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta estándar mostraron un número significativamente elevado de hepatocitos y colangiocitos positivos para Ki-67 en comparación con los controles de tipo silvestre (Fig. 5). El *norUDCA* redujo significativamente el grado de hepatocitos y la proliferación de las células epiteliales del conducto biliar a los niveles cercanos al del control de tipo silvestre (Fig. 5). El UDCA no tuvo efectos significativos sobre la inflamación portal (Fig. 3), en la expresión de VCAM (Fig. 4), y en la proliferación de los hepatocitos (Fig. 5). Sin embargo, el UDCA redujo la proliferación de las células epiteliales del conducto biliar en los conductos biliares grandes (Fig. 5). Una vez más, estos datos indican que los efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos del *norUDCA* son superiores a los del UDCA.

1.2.3. El *norUDCA* induce la secreción de bicarbonato biliar en ratones *Mdr2*^{-/-}.

Para determinar si la coleresis rica en bicarbonato resultante de la derivación colehepática de *norUDCA* podría ser responsable de los efectos terapéuticos observados, se determinaron el flujo de la bilis y la composición (Tabla 3).

25 **Tabla 3. Flujo de la bilis y excreción biliar de los ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y glutatión en diversas condiciones experimentales.**

		KO	KO+UDCA	KO+ <i>norUDCA</i>
		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	nmol/g/min	23,0±5,9	37,2±7,6*	29,5±2,3
Colesterol	nmol/g/min	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,04
Fosfolípidos	nmol/g/min	0,4±0,1	0,3± 0,03	0,3±0,1
Glutatión	nmol/g/min	4,6±2,0	5,6±1,1	5,8±1,2
Bicarbonato	nmol/g/min	60,9±8,0	67,1±10,0	98,8±14,6#

NOTA. Los valores se expresan como promedio ± desviación estándar. KO, ratones *Mdr2* knock-out, KO + UDCA, ratones *Mdr2* knock-out alimentados con UDCA; KO + *norUDCA*, ratones knock-out *Mdr2* alimentados con *norUDCA*

30 • * p <0,05, KO vs KO + UDCA (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

• #p <0,05, KO + vs KO + *norUDCA* (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

En comparación con los *Mdr2*^{-/-} alimentados con la dieta de control y los alimentados con UDCA, *norUDCA* induce significativamente la secreción de bicarbonato biliar consecuentemente con el concepto de que *norUDCA* sufre una derivación colehepática relevante en *Mdr2*^{-/-} (Bolder, Trang, et al. 1999). UDCA estimula la excreción biliar de los ácidos biliares pero no *norUDCA*. No se observaron efectos significativos en la producción biliar de ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y de glutatión. Estos hallazgos muestran que *norUDCA* conduce al lavado de los conductos biliares lesionados con una bilis menos tóxica enriquecido con bicarbonato en *Mdr2*^{-/-}.

1.2.4. EL *norUDCA* induce la fase II de las rutas de desintoxicación y de las rutas de excreción alternativas de los ácidos biliares en ratones *Mdr2*^{-/-}.

40 Para demostrar la hipótesis de que la inducción de la fase I/II de las rutas de biotransformación y de las rutas de flujo de salida alternativas para los ácidos biliares potencialmente tóxicos también pueden contribuir a los efectos beneficiosos observados de *norUDCA* en *Mdr2*^{-/-} se estudió la expresión de enzimas metabólicas clave (Tabla 4) y la composición de ácidos biliares del suero, hepática, y biliar en *Mdr2*^{-/-} alimentados con *norUDCA*.

Tabla 4. PCR en tiempo real para la cuantificación de los niveles de expresión relativos de las enzimas metabólicas clave y proteínas de transporte en 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*

5 **NOTA.** Los valores se expresan como promedio ± desviación estándar para cada grupo. n. d. no detectable, KO, ratones *Mdr2* knock-out, KO + UDCA, ratones *Mdr2* knock-out alimentados con UDCA; KO + *nor*UDCA, ratones knock-out *Mdr2* alimentados con *nor*UDCA

• * p <0.05, KO vs KO + UDCA y KO vs KO+*nor*UDCA (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

• #p <0,05, KO +UDCA vs KO + *nor*UDCA (ANOVA con un test posterior de Bonferroni)

10 Se prestó atención específica a *Sult2a1* y *Mrp4*, ya que la sulfatación y el transporte de los compuestos sulfatados están relacionados entre sí para formar una ruta regulada de manera coordinada para la excreción de esteroides sulfatados y ácidos biliares (Schuetz, Strom, et al. 2001). El *nor*UDCA no tuvo efectos significativos en la expresión del ARNm de los sistemas de absorción hepatocelular (*Ntcp*, *Oatp1*) de flujo de salida canalicular (*Bsep*, *Mrp2*) de los ácidos biliares y de los aniones orgánicos (datos no mostrados). Sin embargo, el *nor*UDCA tiene como resultado una fuerte inducción de las enzimas de desintoxicación de la fase I y II (Tabla 4) con efectos más pronunciados sobre la expresión *Sult2a1*. Además, el *nor*UDCA aumentó profundamente la expresión de sistemas de flujo de salida basolateral alternativos tales como *Mrp4* y - en menor grado – *Mrp3* (Tabla 4, Figura 7). Los efectos de UDCA fueron menos pronunciados (Tabla 4, Figura 7). Esta inducción coordinada por *nor*UDCA de rutas de biotransformación y de los sistemas de flujo de salida fue acompañada por la aparición de glucurónidos de ácidos biliares y también de sulfatos lo que refleja las implicaciones funcionales de los cambios de expresión observados.

20 1.3. Discusión

Se pudo demostrar que el *nor*UDCA cura la colangitis esclerosante en ratones *Mdr2*^{-/-}, un sistema modelo bien caracterizado para PSC, en el plazo de 4 semanas. Además, se pudo demostrar que el *nor*UDCA es significativamente más eficaz que el UDCA.

25 El desarrollo de la colangitis esclerosante en *Mdr2*^{-/-} está directamente relacionado con la secreción de fosfolípidos biliares defectuosos y de forma concomitante con el aumento de los niveles biliares de ácidos biliares tóxicos no micelares que causan lesiones del conducto biliar y pericolangitis (Fickert, Zollner, et al. 2002, Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004). La inducción de la secreción de bicarbonato biliar en *Mdr2*^{-/-} alimentados con *nor*UDCA presentada por medio de este ejemplo es muy consistente con la derivación colehepática del *nor*UDCA (Hofmann 1977, Yoon, Hagey, et al., 1986). El aumento de la secreción de bicarbonato biliar (i) diluye el contenido biliar tóxico en *Mdr2*^{-/-} y (ii) protege los conductos biliares de las células epiteliales contra el estrés oxidativo ya que el bicarbonato es un absorbente potente para especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto el *nor*UDCA detiene la pericolangitis en curso, y la fibrosis periductal subsecuente en *Mdr2*^{-/-} minimizando la lesión de las células del conducto biliar del lumen del conducto biliar. Esto conduce a la reconstitución de la función de barrera del colangiocito lo que significaría que los efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos del *nor*UDCA observadas en *Mdr2*^{-/-} son secundarios. Sin embargo, es evidente que el *nor*UDCA también tiene efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos directos.

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

40 A diferencia del *nor*UDCA, el UDCA mejora sólo la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares pero aumenta los niveles de ALT en suero y los infartos biliares inducidos en *Mdr2*^{-/-}. En un estudio anterior con un período de tratamiento más corto se concluyó que esto podría principalmente estar relacionado con los efectos coleréticos del UDCA en presencia de la obstrucción biliar sin resolver comparable con los resultados en los ratones CBDL alimentados con UDCA (Fickert, Zollner, et al. 2002). En contraste con esta suposición anterior, sólo se encontró una tendencia al aumento en el flujo de bilis en ratones alimentados con UDCA- e incluso más aún en *Mdr2*^{-/-} alimentados con *nor*UDCA del presente estudio utilizando a dosis bajas más bajas. Sin embargo, aunque

UDCA no mejoró la enfermedad en los conductos pequeños de *Mdr2^{-/-}* esto no excluye la posibilidad del aumento de la presión biliar a nivel de los canales de Herring en *Mdr2^{-/-}* alimentados con UDCA lo que podría haber dado lugar a los infartos biliares observados. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares en lo que respecta a la lesión hepática se relacionan con las diferencias al nivel de la secreción de bilis es decir, que el *norUDCA* estimula principalmente la secreción ductular mientras que el UDCA estimula la secreción de bilis canalicular aguas arriba de los conductos afectados.

Recientemente se ha demostrado una relación de causalidad entre la inflamación portal y lobular que conduce a la fibrosis periductal y a la proliferación ductular así como la formación del carcinoma hepatocelular (HCC) en *Mdr2^{-/-}* (Fickert, Fuchsbichler, et al 2004, Pikarsky, Porat, et al., 2004). En los hepatocitos normalizados *norUDCA* y en la proliferación de las células epiteliales de los conductos biliares del estudio actual Pikarsky et al. han demostrado una reducción de la inflamación y de la formación relacionada con HCC utilizando el fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) ibuprofeno en este modelo (Pikarsky, Porat, et al. 2004). Los efectos terapéuticos de los AINE y del *norUDCA* pueden combinarse e incluso amplificarse con sulindaco, un AINE, que experimenta derivación colehepática en ratas (más audaz, Trang, et al. 1999).

Los ácidos biliares naturales son N-acilamidados (conjugados) eficientemente en un enlace amida con glicina o taurina y posteriormente secretados a los canalículos biliares. En contraste, los ácidos biliares *nor* (C_{23}) tienen diferencias marcadas en su biotransformación y propiedades fisiológicas en comparación con sus homólogos (C_{24}) naturales. Se demostró que el *norUDCA* da como resultado una inducción coordinada y fuerte de Sult2a1 (una transferasa que preferentemente sulfata 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 consecuencias funcionales de estos hallazgos se fundamentan en la aparición de sulfatos de ácidos biliares y glucurónidos en la orina de *Mdr2^{-/-}* alimentados con *norUDCA*. La inducción adaptativa de la desintoxicación de los ácidos biliares por el *norUDCA* mediante el metabolismo de las fases I (hidroxilación) y II (sulfatación, glucuronidación) puede dar lugar a unos metabolitos de ácidos biliares más solubles en el agua y por lo tanto menos tóxicos siendo que se eliminan por medio de bombas hepatocelulares de flujo de salida alternativas (por ejemplo Mrp4) seguido de la excreción renal como se demuestra en este ejemplo. La inducción de tales mecanismos por el *norUDCA* era mucho más pronunciada que la de UDCA (en este ejemplo) o la de los ligandos agonistas de CAR referidos anteriormente (Assem et al. 2004). Esto demuestra que el *norUDCA* induce profundamente la desintoxicación y la exportación de ácidos biliares mediada por Sult2a1 y por la sobreexpresión adaptativa de Mrp4 mientras que el propio *norUDCA* experimenta una derivación colehepática continuada. Esto tiene un doble efecto beneficioso por (i) desplazar y diluir los ácidos biliares tóxicos a la bilis ductular y (ii) e inducir una coleresis ductular rica en bicarbonato que reduce el estrés oxidativo.

La generación por el *norUDCA* de una coleresis rica en bicarbonato tiene también implicaciones terapéuticas en las colangiopatías de humanos (por ejemplo, PSC, PBC, el rechazo del injerto hepático crónico, colangitis destructiva no supurativa), como resultado de maniobras colehepática en un flujo continuo de moléculas a través de la vía biliar epitelio ductular que ayuda conductos biliares alterados para manejar mejor el estrés tóxico / oxidativo. Por ejemplo, sulindaco, un AINE que también experimenta derivación colehepática en los seres humanos, se ha demostrado que mejora las enzimas hepáticas en pacientes con PBC con respuesta incompleta al tratamiento con UDCA.

Existen dos paralelismos de interés en el metabolismo del *norUDCA* entre los ratones y los seres humanos que contrastan con observaciones anteriores en otros roedores y animales de experimentación (por ejemplo, ratas con fistulas biliares, hámster, conejillo de indias). En primer lugar, tanto los ratones como los hombres, muestran una considerable excreción renal del *norUDCA*. Además, también se encontró que el principal metabolito del *norUDCA* en ratones fue un glucurónido que también está en línea con los hallazgos en los seres humanos.

En segundo lugar, a diferencia de las ratas (Yoon, Hagey, et al. 1986) la potencia colerética estimado del *norUDCA* en ratones y seres humanos se encuentra alrededor de tres veces por encima del flujo biliar normal en ambas especie. Sin embargo, el *norUDCA* induce el flujo de bilis en un grado mucho mayor en las ratas (160 ml/min-kg). No obstante teniendo en cuenta en su conjunto estos resultados se puede demostrar que los efectos del *norUDCA* en *Mdr2^{-/-}* se pueden extrapolar directamente a enfermedades hepáticas colestásicas humanos.

En resumen, se puede demostrar que el *norUDCA* cura la colangitis esclerosante en *Mdr2^{-/-}*. El *norUDCA* es un compuesto eficaz para las enfermedades hepáticas colestásicas en particular para la PSC y enfermedades hepáticas humanas relacionados con las mutaciones de *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.
- 5 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.
- 10 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.

REIVINDICACIONES.

1. El ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma
- 5 2. El ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma, según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables se formulan para la administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, tópica o rectal.
- 10 3. El ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma, según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales farmacéuticamente aceptables se administran a un paciente en una cantidad de 25 mg a 5 g, preferiblemente de 100 mg a 2,5 g, en particular de 800 mg a 1,5 g al día.

Fig. 1

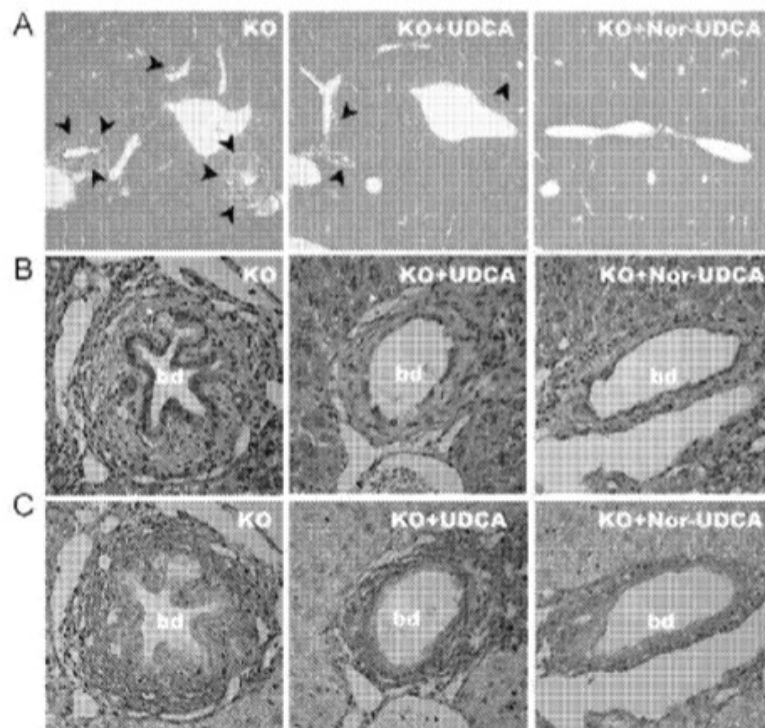


Fig. 2

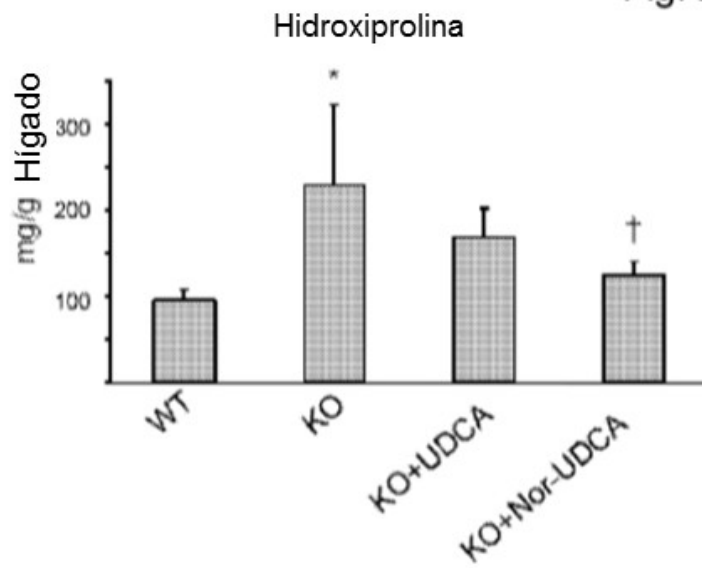


Fig. 6

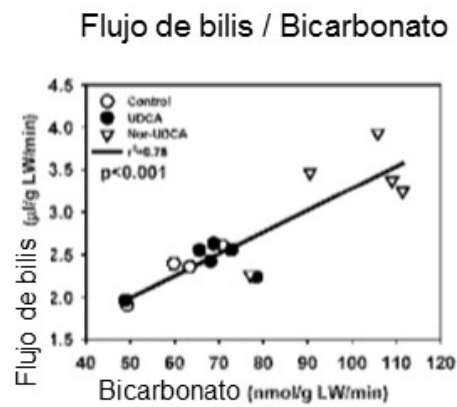


Fig. 3

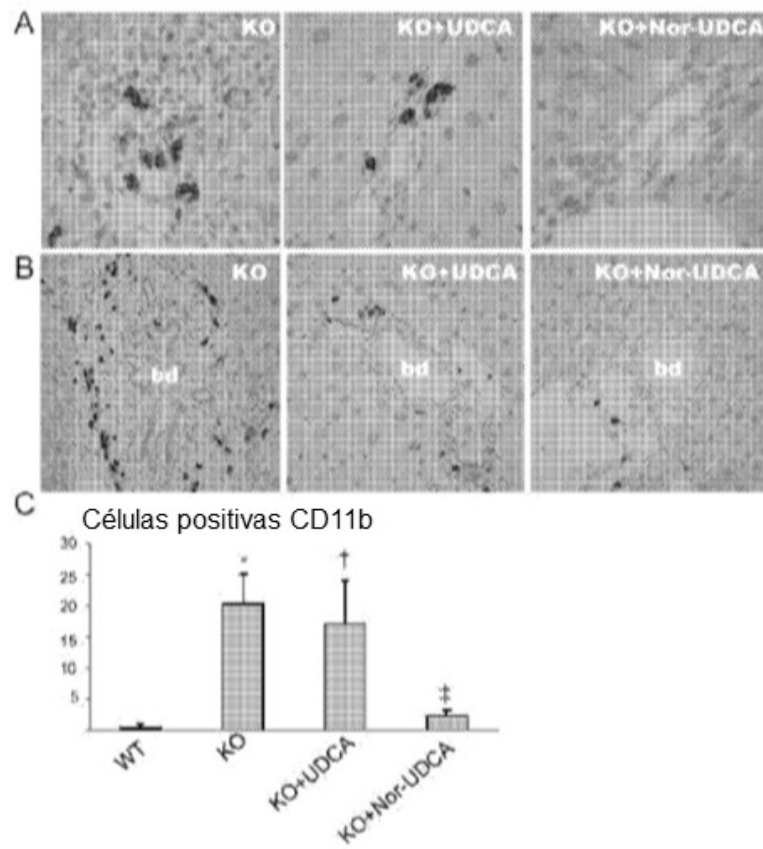


Fig. 4

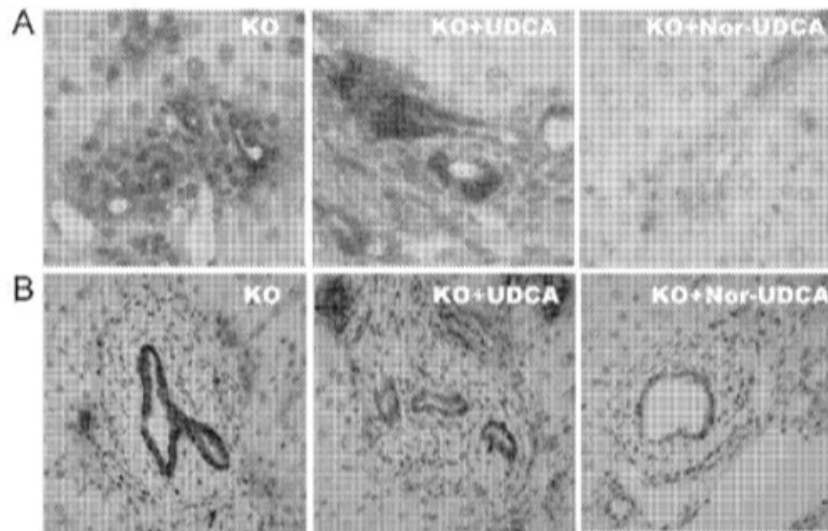


Fig. 7

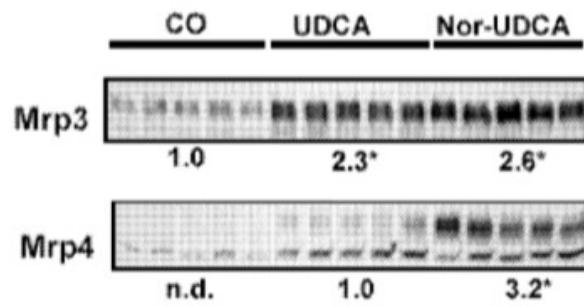


Fig. 5

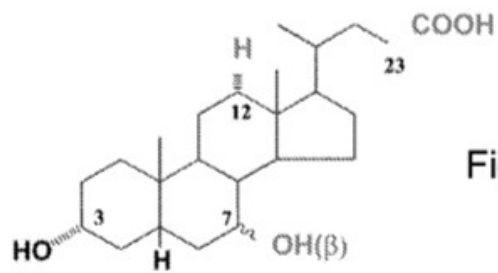
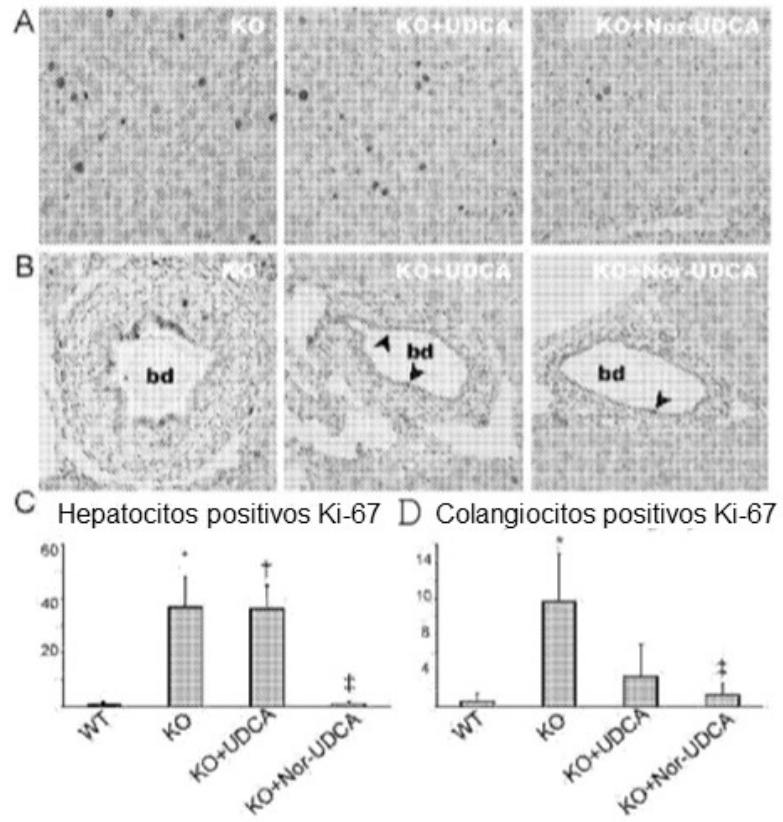


Fig. 8