(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 590 333**

(51) Int. CI.:

A61K 31/575 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005 E 11176271 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2392336**

(54) Título: **24-nor-UDCA para el tratamiento de la hepatitis autoinmune**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2016

(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

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

24-nor-UDCA para el tratamiento de la hepatitis autoinmune

La presente invención se refiere a un nuevo uso del ácido 24-*nor*-ursodesoxicólico (*nor*UDCA) en el tratamiento de la hepatitis autoinmune (AIH).

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 tratar enfermedades hepáticas, en donde una de las más importantes áreas de indicación del UDCA es la disolución de cálculos biliares y el tratamiento de la cirrosis biliar primaria (PBC) y la colangitis esclerosante primaria (PSC). El UDCA es un ácido biliar de origen natural con efectos citoprotector, estabilizante de la membrana y anti-apoptótico. Además, el UDCA reduce los niveles séricos de bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina como marcador de la colestasis (Trauner y Graziadei 1999, Beuers y Paumgartner 2002).

Los estudios del UDCA en pacientes que sufren de enfermedades hepáticas, especialmente pacientes con PBC, han demostrado que la administración de UDCA hace aumentar la velocidad del flujo de la bilis desde los hepatocitos, combatiendo así la colestasis y diluyendo e inhibiendo los ácidos biliares tóxicos, que son los principales responsables de la lesión de los hepatocitos. Además, el UDCA es también capaz de inhibir la respuesta inmunitaria en el hígado reduciendo la lesión inmunológica contra los conductos biliares y el hígado. El UDCA, como se ha afirmado anteriormente, se utiliza regularmente para tratar la PSC y la PBC.

La PSC, que afecta principalmente a los varones, es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, que puede llevar a la colestasis (bloqueo del transporte de bilis al intestino). El bloqueo de los conductos biliares da lugar a la acumulación de ácidos biliares en el hígado y en la bilis, daños al hígado, y eventualmente provoca insuficiencia hepática. 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 circundante y dar lugar a una cicatrización de los conductos biliares pequeños y grandes, lo que provocará la constricción del tracto biliar. En consecuencia, tal constricción conduce a la alteración de la secreción de líquido biliar dañando aún más el hígado. En el curso de la enfermedad se puede desarrollar cirrosis hepática y colangiocarcinoma. También la PBC es una enfermedad inflamatoria de los conductos biliares, que afecta inicialmente a los conductos biliares más pequeños y finalmente resulta en cirrosis hepática. Al contrario que la PSC, la PBC afecta principalmente a los individuos femeninos y no está correlacionada con 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 de ambas enfermedades prometedor implica el uso de UDCA. Actualmente, el UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas (Paumgartner y Beuers 2002). El UDCA se utiliza en la PBC en una dosis de 12 – 15 mg/kg/día (generalmente 1000 – 1500 mg) administrados por vía oral una o dos veces al día. Este uso está aprobado por el organismo Food and Drug Administration. Se ha sumado la colchicina al tratamiento con UDCA. La colchicina se prescribe en una dosis de 0,6 mg dos veces al día, a causa de sus potenciales efectos antiinflamatorios y antifibróticos. Varios estudios han demostrado suaves mejoras en las pruebas hepáticas utilizando colchicina. Sin embargo, ninguno de ellos ha encontrado un beneficio para la histología hepática o la supervivencia de pacientes con PBC. El metotrexato, un agente de supresión inmunológica, es otro fármaco que ha sido ensayado en la PBC. Se administra a una dosis de 15 mg por semana. En estudios pequeños, el metotrexato tiene síntomas mejorados, mejores pruebas de sangre en el hígado y mejor progresión de la histología cuando se utiliza durante varios años. Sin embargo, el metotrexato provoca efectos secundarios graves, incluyendo la supresión de la médula ósea, el empeoramiento de la enfermedad hepática y la fibrosis pulmonar potencialmente fatal.

El UDCA es de una eficacia limitada en la PSC y no se ha demostrado que prolongue la supervivencia (libre de trasplante de hígado Trauner y Graziadei 1.999, y Paumgartner Beuers 2002). Hay estudios en curso que están comprobando si pueden ser más eficaces dosis altas de UDCA. En particular, el UDCA reduce el riesgo de cáncer de colon en pacientes con PSC y colitis ulcerosa. Basándose en la hipótesis de que la PSC tiene una causa inmunológica, se han ensayado corticosteroides y otros inmunosupresores. Los corticosteroides orales produjeron una mejora inicial en el perfil bioquímico. Sin embargo la falta de pruebas de un beneficio a largo plazo, así como la desmineralización ósea, son un argumento en contra de la utilización de este régimen. Otros medicamentos como azatioprina, ciclosporina, probados en asociación con corticosteroides y UDCA, no han sido nunca evaluados solos en la terapia de PSC. El metotrexato y la D-penicilamina demostraron también ser ineficaces. Por lo tanto, la terapia farmacéutica para la PSC necesita aún ser optimizada (Trauner y Graziadei 1999, Beuers y Paumgartner 2002).

Se considera que el tratamiento endoscópico en pacientes de PSC con estenosis dominantes sintomáticas, cálculos biliares o restos es una opción valiosa, añadido al tratamiento médico. Los pacientes de PSC sometidos a tratamiento endoscópico tenían un aumento de la supervivencia, que era mucho mayor que la predicha por modelos de supervivencia.

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

- 30% de los pacientes, y también hay una alta tasa de recurrencia de estenosis biliar, rechazo crónico, y colangitis de reflujo. Desgraciadamente, el uso de inmunosupresores no mejora la supervivencia ni la recurrencia de la enfermedad. Así pues, existe una necesidad urgente de un tratamiento con fármacos eficaz que prevenga la progresión de la enfermedad de la PSC, así como la recurrencia después del trasplante de hígado (Trauner y Graziadei 1999, Beuers y Paumgartner 2002).

Aunque el UDCA, que es bien tolerado con la excepción de raros episodios de diarrea y prúrigo (Trauner y Graziadei 1999, Beuers y Paumgartner 2002), se utiliza principalmente para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas, la eficacia del UDCA en la PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas como la colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3, es muy limitada (Trauner y Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et al. 1999).

En el documento EP 0 652 773 B1 se describe el uso de derivados de ácido nor- y homo-biliares, opcionalmente conjugados con taurina, glicina o alanina, como potenciadores de la absorción para medicamentos por la ruta enteral y otras no parenterales. Estos derivados muestran propiedades lipófilas y detergentes y no son metabolizados por la flora bacteriana intestinal.

El documento EP 0 624 595 B1 describe derivados nor- diméricos de ácidos biliares para su uso en un medicamento, especialmente adecuados para el tratamiento de la hiperlipidemia. Las sustancias descritas en ese texto consisten en dos derivados de ácidos biliares individuales, que están unidos entre sí por enlace covalente.

La patente de EE. UU. nº 4.892.868 describe el ácido 22-metil-nor-ursodesoxicólico y el ácido 23-metil-ursodesoxicólico a usar para tratar trastornos de la función hepatobiliar, con particular referencia al metabolismo del colesterol y la producción de bilis (por ejemplo, para el tratamiento de la colestasis).

Nakamura et al. (J. Gastroent. Hepatol. 13 (1998), 490-495) caracteriza la hepatitis autoinmune (AIH) como "una enfermedad hepática inflamatoria crónica de etiología desconocida".

Manns et al. (Hepatol. 43 (2006), S132-S144) describen los mecanismos relevantes de AIH y que el papel de UDCA "en la terapia de AIH o en combinación con la terapia inmunosupresora todavía no es claro".

Es un objeto de la presente invención proporcionar productos farmacéuticos alternativos para el tratamiento de AIH.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de 24-nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente para su uso en el tratamiento y/o la prevención de AIH.

Sorprendentemente, resultó que un medicamento o composición farmacéutica que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico, un análogo C_{23} de cadena lateral acortada del ácido biliar C_{24} de origen natural ursodesoxicólico (UDCA), y/o sales farmacéuticamente aceptables y ésteres del mismo, pueden ser empleados con éxito para el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas, porque esos análogos influyen sobre 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 las sales y ésteres del mismo conducen a la inducción de la secreción biliar de bicarbonato, 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 potente eliminador para especies de oxígeno reactivo. Esto conduce a la reconstitución de la función de la barrera de colangiocitos y detendrá la pericolangitis en curso y la subsiguiente fibrosis periductal, reduciendo al mínimo la lesión de las células epiteliales del conducto biliar procedentes del lumen del conducto biliar. Además, resultó que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico y las sales y ésteres del mismo tienen también efectos antiinflamatorios y anti-fibróticos.

Al contrario que el ácido 24-nor-desoxicólico y las sales y ésteres del mismo, el ácido ursodesoxicólico mejora sólo la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares e incrementa los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero e induce infartos biliares. Sin embargo, el ácido ursodesoxicólico no mejora la enfermedad de conductos pequeños. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares con respecto a la lesión hepática pueden relacionarse con las diferencias en el nivel de secreción biliar, es decir, que el ácido 24-nor-ursodeoxicólico y sales y ésteres del mismo estimulan la secreción principalmente ductular mientras que el ácido ursodesoxicólico estimula la secreción de bilis canalicular aguas arriba de los conductos afectados.

La administración de ácido 24-nor-desoxicólico y sales y ésteres del mismo induce la destoxificación del ácido biliar a través de la hidroxilación, la sulfatación y la glucuronidación, que dan como resultado metabolitos de ácidos biliares más solubles en agua y por tanto menos tóxicos, que diluyen los ácidos biliares tóxicos en la bilis ductular e inducen un coleresis rica en bicarbonato ductular que reduce el estrés oxidativo.

La generación de una coleresis rica en bicarbonato por el ácido 24- nor-ursodesoxicólico y sales y ésteres del mismo tiene también implicaciones terapéuticas en colangiopatías humanas (por ejemplo PSC, PBC, el rechazo de injerto hepático crónico, colangitis destructiva no supurativa), ya que la derivación o shunt colehepático tiene como

resultado un flujo continuado de moléculas a través del epitelio ductular biliar que ayuda a los conductos biliares alterados a manejar mejor el estrés tóxico/oxidativo. Por ejemplo, se ha demostrado que el sulindac, un NSAID que también sufre derivación colehepática en los seres humanos, mejora las enzimas hepáticas en pacientes con PBC con respuesta incompleta al tratamiento con UDCA.

Los métodos para la preparación de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales y ésteres del mismo son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden preparar preferiblemente por un método como se describe en Schteingart CD y Hofmann AF (J. Lip. Res. 29 (1988): 1.387 - 1.395).

Desde luego, el fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse en personas, así como en mamíferos (por ejemplo, cerdos, caballos, primates, ganado, gatos, perros).

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) como el ibuprofeno reducen la inflamación portal y lobular en el hígado (que dará lugar a 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 y ésteres del mismo muestran también propiedades anti-inflamatorias, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico puede utilizarse solo o en combinación con otros fármacos anti-inflamatorios, como NSAIDs (por ejemplo ibuprofeno, sulindac (Bolder, Trang , et. al 1999)).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, pueden formularse ácido 24-nor-ursodesoxicólico y sales del mismo para administración oral o intravenosa, en donde estas formulaciones comprenden además portadores, coadyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, preferiblemente comprimidos efervescentes o masticables, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico se puede mezclar con sustancias usadas regularmente, como la sacarosa, manitol, sorbitol, almidón y derivados de almidón, lactosa, agentes lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio), disgregantes y agentes de tamponamiento. Las tabletas y píldoras pueden prepararse también con recubrimientos entéricos para 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.

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

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

Los preparados 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. El preparado inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua y una solución isotónica de cloruro sódico. También se utilizan convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión.

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

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden usar para administrar ácido 24-nor-ursodesoxicólico, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y microgránulos (por ejemplo, el documento EP 1 317 925). La dosis requerida se puede administrar como una sola unidad o en una forma de liberación retardada.

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

De acuerdo con la invención, el ácido 24-nor-ursodesoxicólico se puede formular en forma de sal farmacéuticamente aceptable. Las sales del ácido 24-nor-ursodesoxicólico farmacéuticamente aceptables incluyen preferiblemente sales metálicas, en particular las sales de metales alcalinos, u otras sales farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido 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 orgánicos de las clases alifático, cicloalifático, aromático, heterocíclico, carboxílico y sulfónico, tales como el 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-hidroxibutírico, ciclohexilaminosulfónico, galactárico y galacturónico. Las sales de adición de bases aceptables farmacéuticamente incluyen sales metálicas preparadas a partir de litio, aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales orgánicas preparadas a partir de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas cíclicas. Todas las sales de ácido 24-nor-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 la base apropiados).

Los métodos para la elaboración de un fármaco de acuerdo con la presente invención que comprende ácido 24-nor-ursodesoxicólico y formulado para la administración como se describe en el presente texto, se pueden encontrar, por ejemplo, en el "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations" (Sarfaraz K Niazi , CRC Press LLC, 2004).

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

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

Por término medio puede administrarse a un paciente ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, 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 al día. Sin embargo, lo más preferible es administrar a un paciente 1 g de ácido 24-nor-ursodesoxicólico y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Se observa además que el ácido 24-nor-ursodesoxicólico, y/o las sales de farmacéuticamente aceptables del mismo, se pueden administrar a un individuo arazón de 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 de una vez o preferiblemente en más de una dosis (al menos 2, 3, 4, 5 ó 10 dosis) por día. El fármaco o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar 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 durante toda la vida.

El ácido 24-nor-ursodesoxicólico se puede administrar no sólo en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables y en formas de dosificación como se describen en el presente texto, sino, por supuesto, también en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales que también se sabe que son eficaces contra la misma enfermedad o una enfermedad similar que se ha de tratar.

La presente invención se ilustra con más detalle por medio de las siguientes realizaciones y ejemplo, sin limitarse a los mismos.

Fig. 1. El norUDCA cura la colangitis esclerosante en ratones Mdr2-/-. (A) Histología hepática (tinción H & E) en ratones *Mdr2-/-* alimentados con la dieta de control (KO), ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) y ratones *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA (KO + *nor*UDCA) (ampliación x 10). La enfermedad de los conductos biliares grandes pronunciada en KO (puntas de flecha), que está reducida significativamente en KO + UDCA (puntas de flecha) y ausente en KO + *nor*UDCA. (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) Tinción con rojo sirio mostrando fibrosis significativa con fibras de colágeno periductales (rojo) en KO. Reducción moderada de la fibrosis en KO + UDCA y reducción incluso más pronunciada en KO + *nor*UDCA (ampliación de b, c x 40); bd, conducto biliar.

Fig. 2. El norUDCA reduce significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en Mdr2-/-. Contenido de hidroxiprolina hepática en ratones *Mdr2-/-* de tipo silvestre (WT) alimentados con la dieta de control (KO), ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) y en ratones *Mdr2-/-* alimentados con *nor*-UDCA (KO + *nor*UDCA). El

contenido de hidroxiprolina hepática está significativamente aumentado en KO en comparación con WT y reducido a niveles basales en KO + *nor*UDCA. Los valores son media ± SEM de n = 5 por grupo. p < 0,05, WT vs. KO; KO vs. KO + *nor*UDCA.

Fig. 3. El norUDCA reduce significativamente la infiltración/extravasación portal de neutrófilos en Mdr2-/-. Inmunohistoquímica para CD11b (rojo, tinción de neutrófilos) en ratones *Mdr2-/-* (KO) alimentados con dieta control, en ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) y en ratones *Mdr2-/-* alimentados con *nor*-UDCA (KO + *nor*UDCA) de conductos biliares (A) interlobulares y (B) 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 media ±SEM de n= 3 por grupo. p <0,05.

Fig. 4. El norUDCA inhibe la expresión de la molécula de adhesión celular vascular portal (VCAM) en ratones Mdr2-/-. Inmunohistoquímica para VCAM (rojo) en conductos biliares interlobulares (A) y lobulares (B) de ratones *Mdr2-/-* alimentados con la dieta control (KO), en ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) y en ratones *Mdr2-/-* alimentados con *nor*-UDCA (KO + *nor*UDCA). (A) No hay una diferencia evidente en la expresión de VCAM portal entre KO y KO + UDCA mientras que KO + *nor*UDCA muestra una expresión significativamente más baja 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 norUDCA inhibe la proliferación de los hepatocitos y colangiocitos en ratones Mdr2-/-. Inmunohistoquímica para Ki-67 (rojo) en hepatocitos (A) y colangiocitos (B) en ratones *Mdr2-/-* alimentados con la dieta control (KO), ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) y en ratones *Mdr2-/-* alimentados con nor-UDCA(KO + *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 (puntas de flecha) en KO + UDCA y KO + *nor*UDCA, respectivamente. (C) Número de hepatocitos positivos para Ki-67 por 30 HPFs y (D) número de colangiocitos positivos para Ki-67 por 20 campos portales. Sólo el *nor*UDCA reduce significativamente el número de hepatocitos y colangiocitos proliferantes. Los valores son valores de la media ± SEM a partir de n = 3 por grupo. p <0,05, *WT vs. KO; † WT vs. KO + UDCA; ‡ KO vs. norUDCA.

Fig. 6. Correlación positiva entre la producción de bicarbonato biliar y el flujo de bilis en Mdr2-/-. Se representa la producción de bicarbonato biliar frente al flujo de bilis en ratones *Mdr2-/-* alimentados con la dieta control (control, círculos abiertos), en ratones *Mdr2-/-* alimentados con UDCA (KO + UDCA) (UDCA, triángulos abiertos) y en ratones *Mdr2-/-* alimentados con *nor*-UDCA (KO + *nor*UDCA) (*nor*UDCA, círculos cerrados). Se ha de observar la correlación positiva entre la producción de bicarbonato y el flujo de bilis, así como la agrupación de los animales tratados con *nor*-UDCA mostrando la producción de bicarbonato más alta arriba a la derecha.

Fig. 7. Mecanismos terapéuticos sugeridos del norUDCA en los ratones Mdr2-/-. El *nor*UDCA es absorbido por los hepatocitos y se segrega en los canalículos y conductos biliares donde es absorbido por los colangiocitos que llevan a la secreción de bicarbonato ductular. El norUDCA se segrega de nuevo en el plexo peribiliar y se deriva tornando a los hepatocitos (shunt colehepático). El norUDCA induce la expresión de Sult2a1 etc. y Mrp3 y Mrp4 que destoxifican 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).

Ejemplo 1:

Los ratones con rotura dirigida del gen *Mdr2 (Abcb4)* que codifican una fosfolípido flipasa canalicular desarrollan colangitis esclerosante con características macroscópicas y microscópicas que se parecen mucho a las observadas en la colangitis esclerosante humana (p. ej., la colangitis esclerosante primaria, PSC) (Fickert, Zollner, et al. 2002, Fickert, Fuchsbichler, et al. 2004). Las lesiones del conducto biliar en estos ratones están relacionadas con la secreción defectuosa de fosfolípidos biliares que da como resultado un aumento de la concentración de ácidos biliares no micelares libres que subsiguientemente provocan la lesión de las células epiteliales del conducto biliar (colangiocitos), pericolangitis, fibrosis periductal con proliferación ductular y finalmente colangitis esclerosante (Fickert , Fuchsbichler, 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 importante para probar terapias para el amplio espectro de enfermedades humanas del hígado que resultan de mutaciones *MDR3* (el ortólogo humano de *Mdr2*) que van desde la colestasis neonatal a la enfermedad hepática del adulto (Jansen & Sturm 2003).

Actualmente el UDCA es el único fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas (Paumgartner y Beuers 2002). Sin embargo la eficacia del UDCA en la PSC y en pacientes con enfermedades hepáticas debidas a mutaciones *MDR3* (por ejemplo colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3) es limitada (Trauner y Graziadei 1999, Jacquemin, Hermans, et al. 1997, Jacquemin 2000, Ismail, Kalicinski, et. al 1999). El acortamiento de la cadena lateral del UDCA podría incrementar su eficacia terapéutica ya que esta modificación influye significativamente 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). El *nor*UDCA, un análogo C_{23} del UDCA de cadena lateral acortada, es un potente agente colerético en diversos roedores (por ejemplo, hamster, rata o cobaya) que sufren de derivación colehepática extensa y que induce la secreción de bicarbonato biliar a nivel del

conducto biliar (Yoon, Hagey, et al. 1986, Cohen, Hofmann, et al. 1986). Al contrario que el UDCA, los efectos del *nor*UDCA no han sido nunca estudiados 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 investigaron los efectos del *nor*UDCA en ratones *Mdr2-/-* como un modelo de la colangitis esclerosante (Fickert, Fuchsbichler, et al 2004). En este ejemplo se examinan los efectos positivos del *nor*UDCA en el tratamiento para enfermedades hepáticas humanas causadas por mutaciones *MDR3* y colangiopatías humanas, tales como la colangitis esclerosante (por ejemplo, PSC).

1.1. Materiales y métodos.

1.1.1. Experimentos con animales.

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

1.1.2. Alimentación con ácidos biliares en ratones Mdr2-/-.

Mdr2-/- de dos meses de edad (momento en el que la colangitis esclerosante está ya totalmente establecida en estos animales (Fickert, Zollner, et al 2002) fueron alimentados con una dieta suplementada con *nor*UDCA (0,5%, p/p) o bien con UDCA como comparador clínico (0,5% p/p) durante 4 semanas y se compararon con *Mdr2-/-* alimentados con la dieta estándar y con controles de tipo silvestre.

1.1.3. Histología hepática.

Para la microscopía óptica convencional, los hígados fueron fijados en una disolución de formaldehído tamponado 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 codificadas y examinadas por un patólogo (H. D.), ignorante del tratamiento de los animales.

1.1.4. Bioquímica sérica de rutina.

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

1.1.5. Inmunohistoquímica para la alfa-SMA.

La inmunohistoquímica para la alfa-SMA fue realizada en secciones de parafina (4 micras de espesor) tratadas con microondas (0,01 mmol/L de tampón citrato pH 6,0) utilizando el anti alfa-SMA monoclonal de ratón (dilución 1:500, Sigma, St Louis, MO). La unión del anticuerpo fue detectada usando el sistema ABC (Dako, Glostrup, Dinamarca) usando ß-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 mmol/L de tampón de citrato pH 6,0) usando un anticuerpo policlonal anti-Ki-67 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 fue calculado contando los núcleos positivos en 30 campos de alta potencia en secciones de 3 animales en cada grupo. El número de células epiteliales proliferantes del conducto biliar se calculó contando núcleos positivos en 20 campos portales en secciones de 3 animales en cada grupo.

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

Para cuantificar los neutrófilos se detectaron las células positivas para CD-11B 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 con acetona utilizando el anti CD106 monoclonal de rata (VCAM-1, dilución 1:30, PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) y la unión del anticuerpo fue detectada usando el sistema ABC (Dako), utilizando AEC (Dako) como sustrato.

1.1.9. Inmunohistoquímica para aductos de proteína 4-hidroxinonenal.

Se desparafinaron secciones de hígado y después se incubaron con el supresor de peroxidasa Immunopure (Pierce, Rockford, IL) durante 30 min y después se bloqueó la proteína (DAKO, Carpenteria, CA) durante 2 h. Esto fue seguido por la incubación durante la noche con el anticuerpo anti-4-hidroxinonenal primario (Calbiochem, San Diego, CA) a temperatura ambiente y la unión del anticuerpo fue detectada 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 este modelo hepático se determinó el contenido de hidroxiprolina. El lóbulo derecho del hígado fue homogeneizado en HCl 6N (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% disuelta en tampón de citrato - acetato (50 g de ácido cítrico x H_2O, 12 ml de ácido acético, 120 g de acetato de sodio x 3 H_2O, 34 g de NaOH y 1 litro de agua destilada; pH 6,0). Después de añadir 250 µl de ácido perclórico y de 12 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 250 µl de solución de p-dimetilaminobenzaldehído y se incubó a 60 °C durante 20 min. Se midió el contenido de hidroxiprolina a 565 nm utilizando una curva patrón 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 la PCR en tiempo real Taqman® se realizaron como se ha descrito anteriormente (Wagner, Fickert, et al. 2003). Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas marcadas 5' FAM, 3' TAMRA: Col1a1 fwd (directa): caatgcaatgaagaactggactgt (Sec ID No. 1), Col1a1 rev (inversa): tcctacatcttctgagtttggtga (Sec ID No. 2) y sonda Col1a1: cagaaagcacagcactcgccctcc (Sec ID No. 3); TIMP-1 fwd: catggaaagcctctgtggatatg (Sec ID No. 4), TIMP-1 rev: aagctgcaggcattgatgtg (Sec ID No. 5) y TIMP-1 sonda: ctcatcacgggccgcctaaggaac (Sec ID No. 6); MMP-2 fwd: ctttgagaaggatggcaagtatgg (Sec ID No. 7), MMP-2 rev: ttgtaggaggtgccctggaa (Sec ID No. 8) y MMP-2 sonda: cagatggacagccctgcaagttccc (Sec ID No. 9).

1.1.12. Medición del flujo de bilis.

El flujo de bilis se determinó gravimétricamente y se normalizó en referencia al 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) de acuerdo con 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. La concentración del glutatión biliar (GSH) 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.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ácidos biliares se analizó usando un ensayo de 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Ecoline St, DiaSys) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.1.13. Análisis estadístico.

Los datos se exponen como medias aritméticas ± SD. Se estudiaron de 4 a 6 animales en cada grupo. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student en caso apropiado o ANOVA con test posterior de Bonferroni cuando se comparaban tres o más grupos. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

1.2. Resultados

1.2.1. El 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 de la lesión hepática y de la colestasis) fueron significativamente elevados en los ratones *Mdr2-/-* alimentados con la dieta estándar en comparación con los controles de tipo silvestre (Tabla 1).

Tabla 1. Bioquímica sérica y niveles de ácidos biliares bajo diversas condiciones experimentales.

	ALT (U/L)	AP (U/L)	Bili
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 + nor-UDCA	165 ± 23#	162 ± 25#	0,23 ± 0,2#
NOTA. Los valores se expresan como media ± SD a partir de n = 5 por grupo. ALT, alanina transaminasa; AP, fosfatasa alcalina; SBA, ácidos biliares en suero, WT, ratones de tipo silvestre; KO, ratones knockout *Mdr2*, KO +			

UDCA, ratones knock-out *Mdr2* alimentados con UDCA; KO + *nor*UDCA, ratones knockout *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)

El *nor*UDCA 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 mostraron una colangitis esclerosante pronunciada (Fig. 1) con proliferación ductular y fibrosis hepática reflejada por el contenido significativamente elevado de hidroxiprolina hepática (Fig. 2). Los *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA mostraron conductos biliares regulares de tamaño grande y medio y con ninguna o sólo una modesta fibrosis periductal (Fig. 1); la proliferación ductular era prácticamente ausente (no mostrada). En línea con estos cambios histológicos, el *nor*UDCA redujo significativamente el contenido de hidroxiprolina hepática en *Mdr2-/-* (Fig. 2), que era paralela a una reducción significativa de la expresión del RNAm del colágeno hepático 1 y 3 (Tabla 2).

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

	Directo	Inverso
Cyp2b10	CAATGGGAACGTTGGAAGA	TGATGCACTGGAAGAGGAAC
Cyp3a11	CCACCAGTAGCACACTTTCC	TTCCATCTCCATCACAGTATCA
IL-1ß	CTGGTGTGTGACGTTCCCATTA	CCGACAGCACGAGGCTTT
IL-1R	GCCAGGACCGCTCAGAGA	TGCCTCGACTGTTAGTCAAGCA
IL-6	GCCCACCAAGAACGATAGTCA	GAAGGCAACTGGATGGAAGTCT
MMP3	CCCACCAAGTCTAACTCTCTGGAA	GGGTGCTGACTGCATCAAAGA
MIP-2	CCTCAACGGAAGAACCAAAGAG	CTCAGACAGCGAGGCACATC
Mrp3	GGCAGGGCCACACTGAGT	AGTCCTCAGATGTCAGCCTAGTGA
Mrp4	TTAGATGGGCCTCTGGTTCT	GCCCACAATTCCAATTCCAACCTT
i-NOS	ACATCAGGTCGGCCATCACT	CGTACCGGATGAGCTGTGAATT
Procolágeno 1	GCAGGGTTCCAACGATGTTG	GCAGCCATCGACTAGGACAGA
Procolágeno 3	GGTGGTTTTCAGTTCAGCTATGG	CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC
TGF-beta	TCGACATGGAGCTGGTGAAA	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGA
TNF-alfa	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
TNF-R1	TGCACTAAACAGCAGAACCGAG	TTGCTCAGCCTCATGCACT
Sult2a1	GGAAGGACCACGACTCATAAC	GATTCTTCACAAGGTTTGTGTTACC
Ugt1a1	TCTGAGCCCTGCATCTATCTG	CCCCAGAGGCGTTGACATA

El tratamiento con UDCA en *Mdr2-/-* como comparador clínico y el tratamiento estándar actual de las enfermedades hepáticas colestásicas (incluyendo PSC) se estudiaron de forma simultánea. Al contrario que el *nor*UDCA, 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 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 solamente una tendencia a un contenido de hidroxiprolina hepática más bajo sin alcanzar significación estadística (Fig. 2). Estos hallazgos indican claramente que el *nor*UDCA (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-/-.

Dado que la inflamación portal puede representar el principal desencadenante de fibrosis periductal en *Mdr2-/-* (Pikarsky, Porat, et al. 2004), se analizó la reducción de la inflamación portal con *nor*UDCA. 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 *nor*UDCA también mejoró la pericolangitis en *Mdr2-/-* como se refleja por el 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 coincidieron con la expresión de VCAM significativamente menor en las células epiteliales del conducto biliar de los conductos biliares interlobulares y lobulares de *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA (Fig. 4). Dado que se había demostrado previamente que la inflamación desencadena también la proliferación de *Mdr2-/-* en hígados (Pikarsky, Porat, et al 2004), se ensayó si esta era afectada por el *nor*UDCA. Los *Mdr2-/-* alimentados con 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 *nor*UDCA redujo significativamente el grado de proliferación de hepatocitos y de las células epiteliales del conducto biliar a niveles próximos 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). También aquí estos datos indican que los efectos anti-inflamatorios y anti-proliferantes del *nor*UDCA 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 *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 la bilis y excreción biliar de los ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y glutatión bajo diversas condiciones experimentales.

		KO	KO + UDCA	KO + *nor*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	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 media ± SD. KO, ratones *Mdr2* knockout, KO + UDCA, ratones *Mdr2* knockout alimentados con UDCA; KO + *nor*UDCA, ratones *Mdr2* knockout alimentados con *nor*UDCA.

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

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

En comparación con los *Mdr2-/-* alimentados con la dieta de control y los alimentados con UDCA, el *nor*UDCA indujo significativamente la secreción de bicarbonato biliar de forma consecuente con el concepto de que *nor*UDCA experimenta una derivación colehepática relevante en *Mdr2-/-* (Bolder, Trang, et al. 1999). El UDCA, pero no el *nor*UDCA, estimula la excreción biliar de los ácidos biliares. No se observaron efectos significativos sobre la producción biliar de ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y glutatión. Estos hallazgos indican que el *nor*UDCA lleva al lavado de los conductos biliares lesionados con una bilis menos tóxica enriquecida con bicarbonato en *Mdr2-/-*.

1.2.4. EL norUDCA induce las rutas de destoxificación de la fase II y las rutas excretoras alternativas de los ácidos biliares en ratones Mdr2-/-.

Para probar la hipótesis de que la inducción de las rutas de biotransformación de fase I/II y de las rutas de flujo de salida alternativas para los ácidos biliares potencialmente tóxicos también puede contribuir a los efectos beneficiosos observados de *nor*UDCA en *Mdr2-/-*, se estudió la expresión de enzimas metabólicas clave (Tabla 4) y la composición de ácidos biliares del suero, hepáticos, y biliares en *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA.

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

	KO	KO + UDCA	KO + *nor*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 ± SD; n = 5 en cada grupo; n. d. no detectable, KO, ratones *Mdr2* knockout, KO + UDCA, ratones *Mdr2* knockout alimentados con UDCA; KO + *nor*UDCA, ratones *Mdr2* knockout 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)

Se prestó una especial atención a Sult2a1 y Mrp4, ya que la sulfatación y el transporte de los compuestos sulfatados están relacionados entre sí formando una ruta regulada do forma coordinada para la excreción de esteroides sulfatados y ácidos biliares (Schuetz, Strom, et al. 2001). El *nor*UDCA no tuvo efectos significativos sobre la expresión de ARNm de los sistemas de absorción hepatocelular (Ntcp, Oatp1) y descarga canalicular (Bsep, Mrp2) para los ácidos biliares y los aniones orgánicos (datos no mostrados). Sin embargo, el *nor*UDCA tuvo como resultado una robusta inducción de las enzimas de destoxificación de la fase I y II (Tabla 4) con los efectos más pronunciados sobre la expresión de Sult2a1. Además, el *nor*UDCA aumentó profundamente la expresión de sistemas de descarga 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 de rutas de biotransformación y sistemas de descarga por *nor*UDCA vino acompañada por la aparición de ácidos biliares glucurónidos y también de sulfatos que reflejan las implicaciones funcionales de los cambios de expresión observados.

1.3. Discusión.

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

El desarrollo de la colangitis esclerosante en *Mdr2-/-* está directamente relacionado con la secreción defectuosa de fosfolípidos biliares y con el aumento concomitante de los niveles biliares de ácidos biliares tóxicos no unidos a micelas 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 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 las las células epiteliales de los conductos biliares contra el estrés oxidativo, ya que el bicarbonato es un potente eliminador para especies de oxígeno reactivas. Por tanto el *nor*UDCA detiene la pericolangitis en curso, y la fibrosis periductal subsiguiente en *Mdr2-/-* minimizando la lesión de las células epiteliales del conducto biliar procedentes del lumen del conducto biliar. Esto lleva a la reconstitución de la función de barrera de los colangiocitos, lo que significaría que los efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos observados del *nor*UDCA en *Mdr2-/-* son secundarios. Sin embargo, es evidente que el *nor*UDCA tiene también efectos directos anti-inflamatorios y anti-fibróticos.

Los hallazgos de este ejemplo demuestran que la inhibición de la fibrosis periductal, cuando viene acompañada de la modulación del contenido biliar (es decir, 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-/-*.

Al contrario que el *nor*UDCA, el UDCA mejoró sólo la fibrosis periductal de los conductos biliares lobulares sino que hizo aumentar los niveles de ALT en suero e indujo infartos biliares inducidos en *Mdr2-/-*. En un estudio previo con un período de tratamiento más corto se sacó la conclusión de que esto podría estar relacionado principalmente con los efectos coleréticos del UDCA en presencia de la obstrucción biliar no resuelta comparable con los hallazgos en

ratones CBDL alimentados con UDCA (Fickert, Zollner, et al. 2002). Al contrario que en esta suposición previa, se encontró solamente una tendencia al aumento del flujo de bilis en ratones alimentados con UDCA e incluso más así en *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA en el presente estudio usando dosis más bajas. Sin embargo, dado que el 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 que podría haber conducido a los infartos biliares observados. Los efectos divergentes de ambos ácidos biliares en relación con la lesión hepática están relacionados con las diferencias al nivel de la secreción biliar, es decir, que el *nor*UDCA 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 causal entre la inflamación portal y lobular que conduce a la fibrosis periductal y a la proliferación ductular, así como la formación de carcinoma hepatocelular (HCC) en *Mdr2-/-* (Fickert, Fuchsbichler, et al 2004, Pikarsky, Porat, et al., 2004). En el estudio actual el *nor*UDCA normalizó los hepatocitos y la proliferación de las células epiteliales de los conductos biliares. Pikarsky et al. han demostrado una reducción de la inflamación y la formación de HCC relacionada usando en este modelo el fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID) ibuprofeno (Pikarsky, Porat, et al. 2004). Los efectos terapéuticos de los NSAID y del *nor*UDCA pueden combinarse e incluso amplificarse mediante el sulindac, un NSAID que experimenta derivación colehepatica en ratas (Bolder, Trang, et al. 1999).

Los ácidos biliares naturales son N-acilamidados (conjugados) eficientemente en un enlace amida con glicina o taurina y después segregados a los canalículos biliares. En cambio, los ácidos biliares *nor*(C_{23}) tienen marcadas diferencias en su biotransformación y sus propiedades fisiológicas en comparación con sus homólogos naturales (C_{24}). Se demostró que el *nor*UDCA da como resultado una inducción coordinada y robusta 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 implicaciones funcionales de estos hallazgos están apoyadas por la aparición de sulfatos de ácidos biliares y glucurónidos en la orina de *Mdr2-/-* alimentados con *nor*UDCA. La inducción adaptativa de la destoxificación de los ácidos biliares por el *nor*UDCA a través del metabolismo de fase I (hidroxilación) y II (sulfatación, glucuronidación), puede dar como resultado metabolitos de ácidos biliares con mejor solubilidad en agua y por tanto menos tóxicos que se eliminan por medio de bombas de descarga hepatocelular alternativas (por ejemplo Mrp4) seguido por su excreción renal como se demuestra en este ejemplo. La inducción de tales mecanismos por el *nor*UDCA fue mucho más pronunciada que la de UDCA (en este ejemplo) o de los ligandos agonistas de CAR referidos anteriormente (Assem et al. 2004). Esto indica que el *nor*UDCA induce profundamente la destoxificación y la exportación de ácidos biliares mediada por Sult2a1 por sobreexpresión adaptativa de Mrp4 mientras que el propio *nor*UDCA experimenta una derivación colehepática continuada. Esto tiene un doble efecto beneficioso a causa de (i) el desplazamiento y dilución de los ácidos biliares tóxicos en la bilis ductular y (ii) la inducción de una coleresis ductular rica en bicarbonato que reduce el estrés oxidativo.

La generación de una coleresis rica en bicarbonato por el *nor*UDCA tiene también implicaciones terapéuticas en las colangiopatías de las personas (por ejemplo PSC, PBC, el rechazo del injerto hepático crónico, colangitis destructiva no supurativa), ya que la derivación colehepática tiene como resultado un flujo continuado de moléculas a través del epitelio biliar ductular que ayuda a los conductos biliares alterados a manejar mejor el estrés tóxico/oxidativo. Por ejemplo, se ha demostrado que el sulindac, un NSAID que también experimenta derivación colehepática en las personas, mejora las enzimas hepáticas en pacientes con PBC con respuesta incompleta al tratamiento con UDCA.

Hay dos paralelismos interesantes en el metabolismo del *nor*UDCA entre los ratones y los seres humanos que contrastan con las observaciones previas en otros roedores y animales de experimentación (por ejemplo, ratas fistulares biliares, hamsters, conejos de indias). Cebadoro, tanto los ratones como las personas muestran una considerable excreción renal de *nor*UDCA. Además, se encontró también que el principal metabolito del *nor*UDCA en ratones era un glucurónido lo que también está en línea con los hallazgos en los seres humanos.

En segundo lugar, al contrario que las ratas (Yoon, Hagey, et al. 1986) la potencia colerética estimada del *nor*UDCA en ratones y seres humanos está aproximadamente tres veces por encima del flujo biliar normal en ambas especies. Sin embargo, el *nor*UDCA indujo el flujo de bilis en un grado mucho mayor en las ratas (160 ml/min-kg). No obstante, teniendo en cuenta estos hallazgos en su conjunto, se pudo demostrar que los efectos del *nor*UDCA en *Mdr2-/-* se pueden extrapolar directamente a enfermedades hepáticas colestásicas humanas.

En resumen, se pudo demostrar que el *nor*UDCA cura la colangitis esclerosante en *Mdr2-/-*. El *nor*UDCA es un compuesto eficaz para las enfermedades hepáticas colestásicas, en particular para la PSC y enfermedades hepáticas humanas 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.

Lista de secuencias

<110> Medizinische Universität Graz

<120> Uso de 24-norUDCA

<130> R 59693

<140> DESCONOCIDO
<141> 12-05-2005

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1

caatgggaac gttggaaga 19

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

<220>
<223> Cebador

<400> 2

tgatgcactg gaagaggaac 20

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

<220>
<223> Cebador

<400> 3

ccaccagtag cacactttcc 20

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

<220>
<223> Cebador

<400> 4

ttccatctcc atcacagtat ca 22

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

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5

ctggtgtgtg acgttcccat ta 22

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6

ccgacagcac gaggcttt 18

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7

gccaggaccg ctcagaga 18

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 8

tgcctcgact gttagtcaag ca 22

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 9

gcccaccaag aacgatagtc a 21

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Cebador

<400> 10

gaaggcaact ggatggaagt ct 22

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

<220>
<223> Cebador

<400> 11

cccaccaagt ctaactctct ggaa 24

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

<220>
<223> Cebador

<400> 12

gggtgctgac tgcatcaaag a 21

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

<220>
<223> Cebador

<400> 13

cctcaacgga agaaccaaag ag 22

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

<220>
<223> Cebador

<400> 14

ctcagacagc gaggcacatc 20

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15

ggcagggcca cactgagt 18

<210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16

agtcctcaga tgtcagccta gtga 24

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17

ttagatgggc ctctggttct 20

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18

gcccacaatt ccaattccaa cctt 24

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

<220>
<223> Cebador

<400> 19

acatcaggtc ggccatcact 20

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 20

cgtaccggat gagctgtgaa tt 22

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 21

gcagggttcc aacgatgttg 20

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

<220>
<223> Cebador

<400> 22

gcagccatcg actaggacag a 21

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

<220>
<223> Cebador

<400> 23

ggtggttttc agttcagcta tgg 23

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

<220>
<223> Cebador

<400> 24

ctggaaagaa gtctgaggaa tgc 23

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

<220>
<223> Cebador

<400> 25

tcgacatgga gctggtgaaa 20

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

<220>
<223> Cebador

<400> 26

ctggcgagcc ttagtttgga 20

<210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 27

gaccctcaca ctcagatcat cttct 25

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 28

cctccacttg gtggtttgct 20

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 29

tgcactaaac agcagaaccg ag 22

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

<220>
<223> Cebador

<400> 30

ttgctcagcc tcatgcactg 20

<210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 31

ggaaggacca cgactcataa c 21

<210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 32

gattcttcac aaggtttgtg ttacc 25

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

<220>
<223> Cebador

<400> 33

tctgagccct gcatctatct g 21

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

<220>
<223> Cebador

<400> 34

ccccagaggc gttgacata 19

REIVINDICACIONES

1. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente, para uso en el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis autoinmune.

2. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente para uso en el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis autoinmune según la reivindicación 1, caracterizado por que el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente se formulan para la administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, nasal, tópica o rectal.

3. Ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente para uso en el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis autoinmune según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el ácido nor-ursodesoxicólico y/o sus sales aceptables farmacéuticamente se administran 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

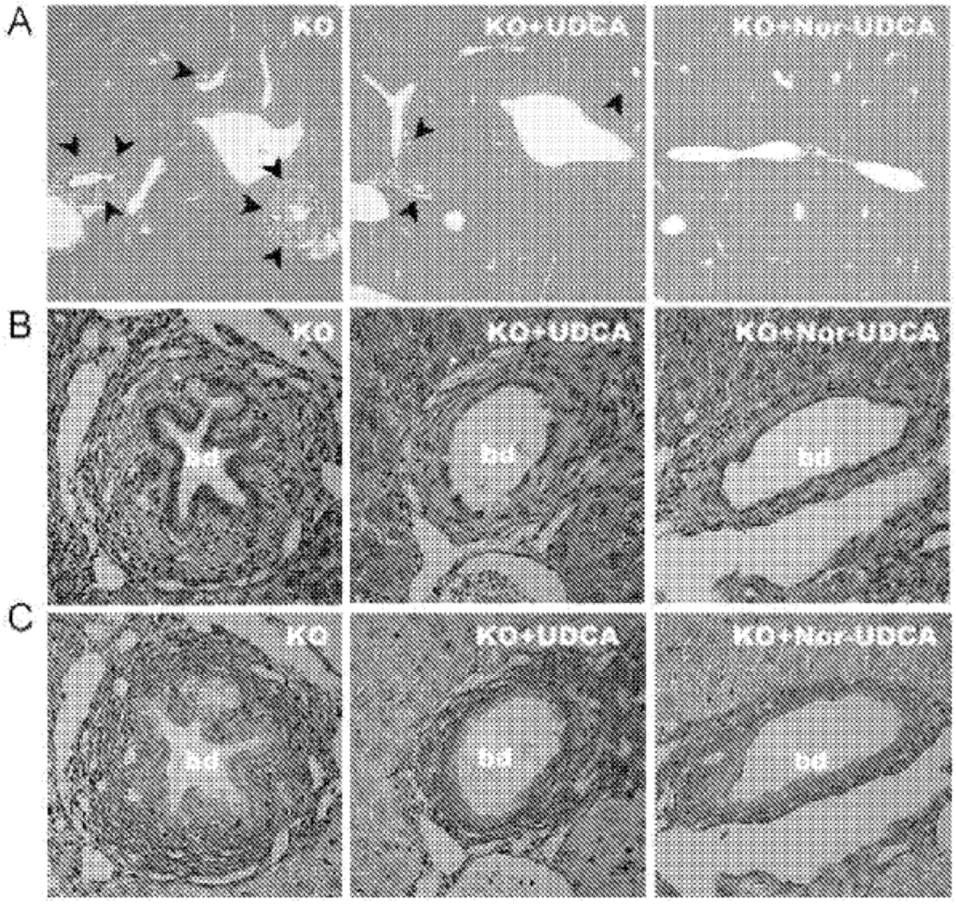

A
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
B
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
bd
bd
bd
C
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
bd
bd
bd

Fig. 2

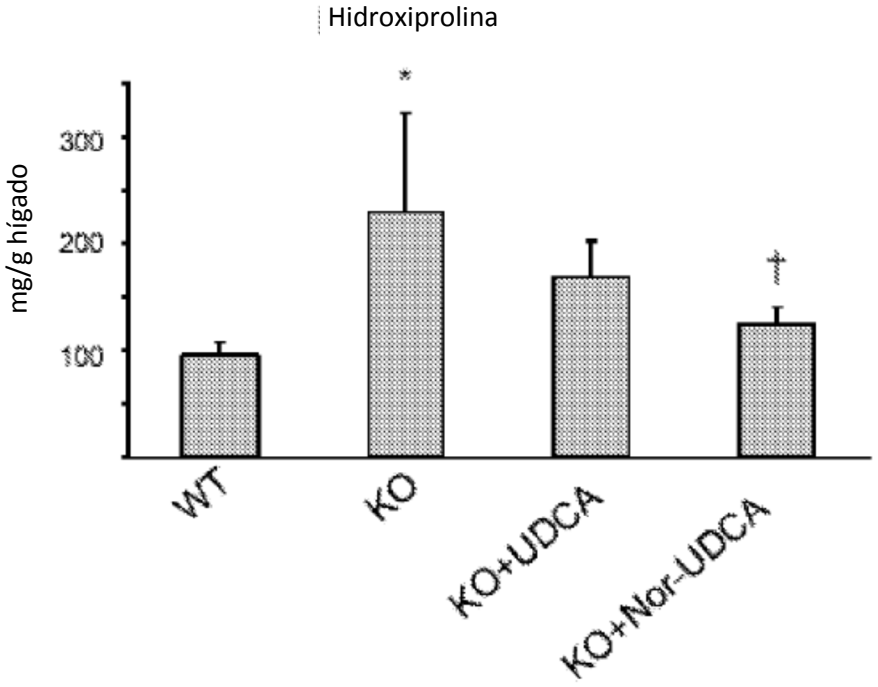

Hidroxiprolina
mg/g hígado
300
200
100
*
†
WT
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA

Fig. 6

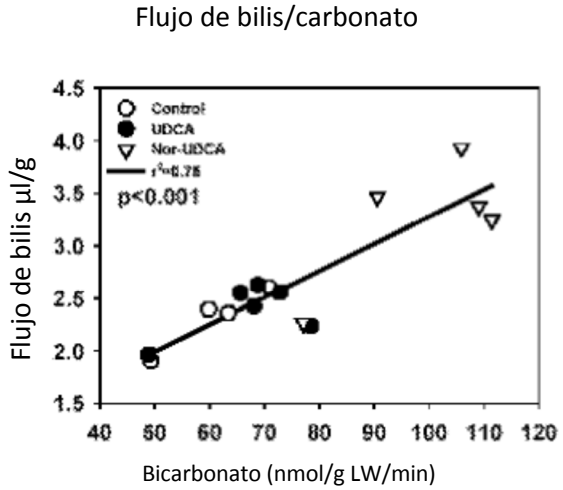

Flujo de bilis/carbonato
Flujo de bilis µl/g
Control
UDCA
Nor-UDCA
p<0.001
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Bicarbonato (nmol/g LW/min)

Fig. 3

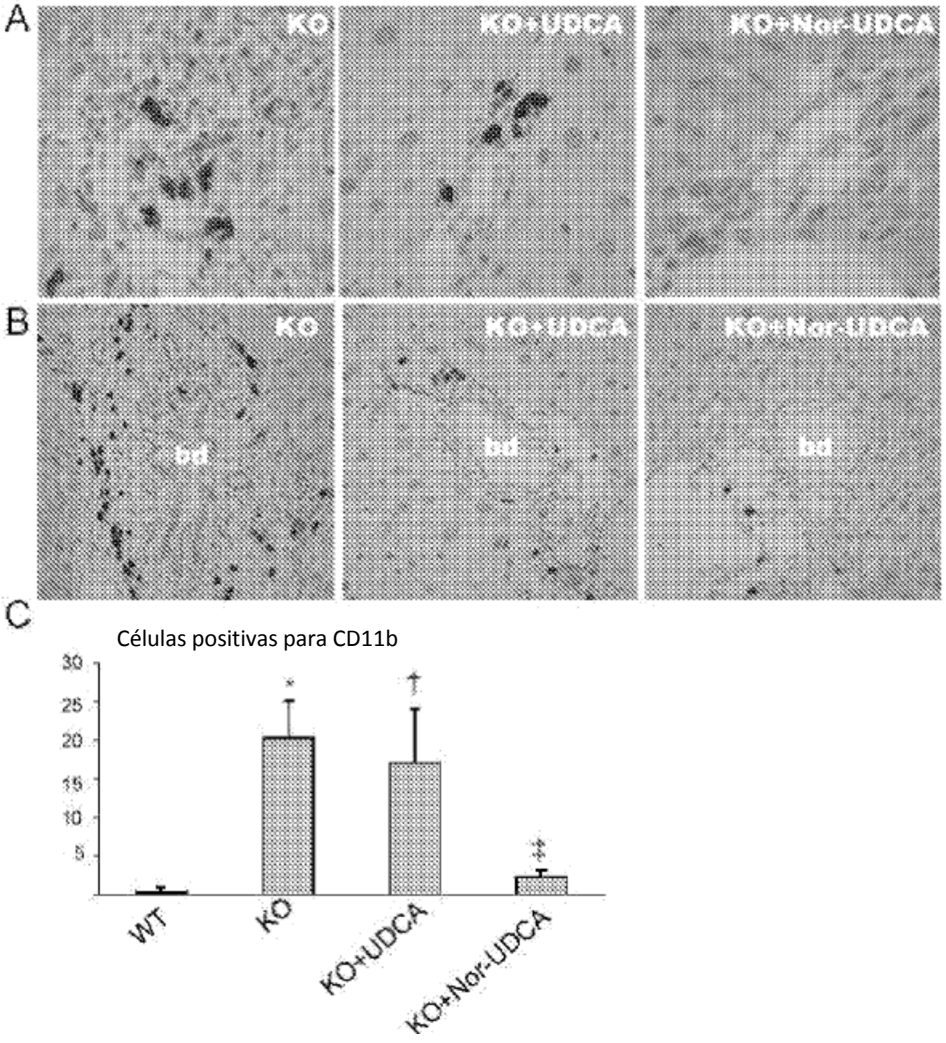

A
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
B
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
bd
bd
bd
C
Células positivas para CD11b
30
25
20
15
10
5
*
†
‡
WT
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA

Fig. 4

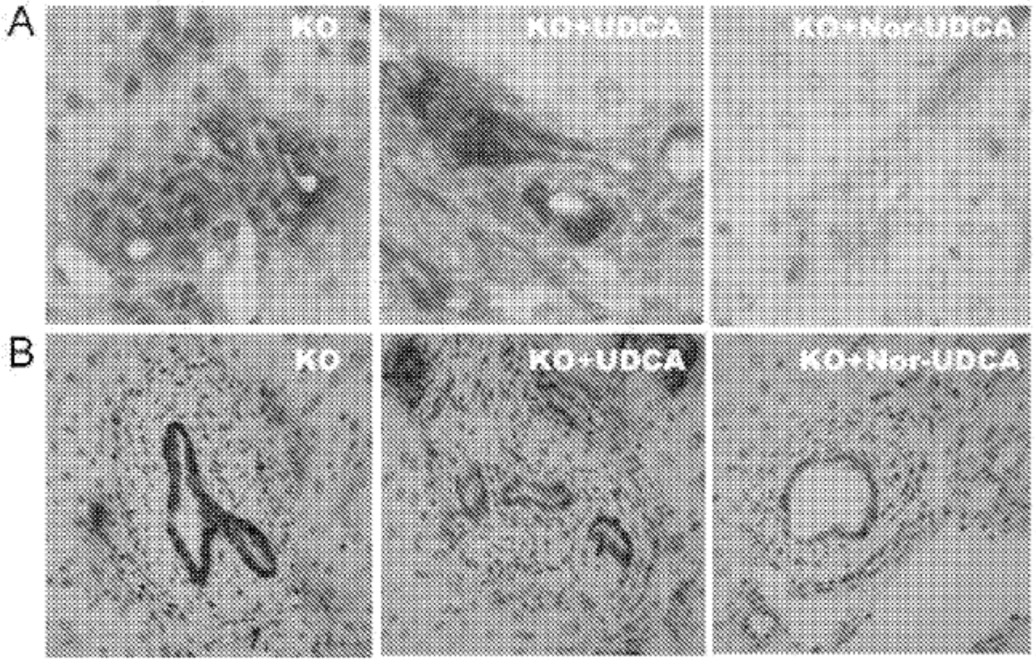

A
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
B
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA

Fig. 7

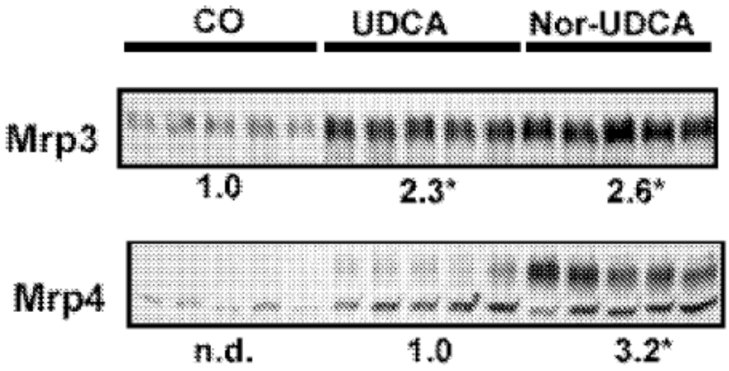
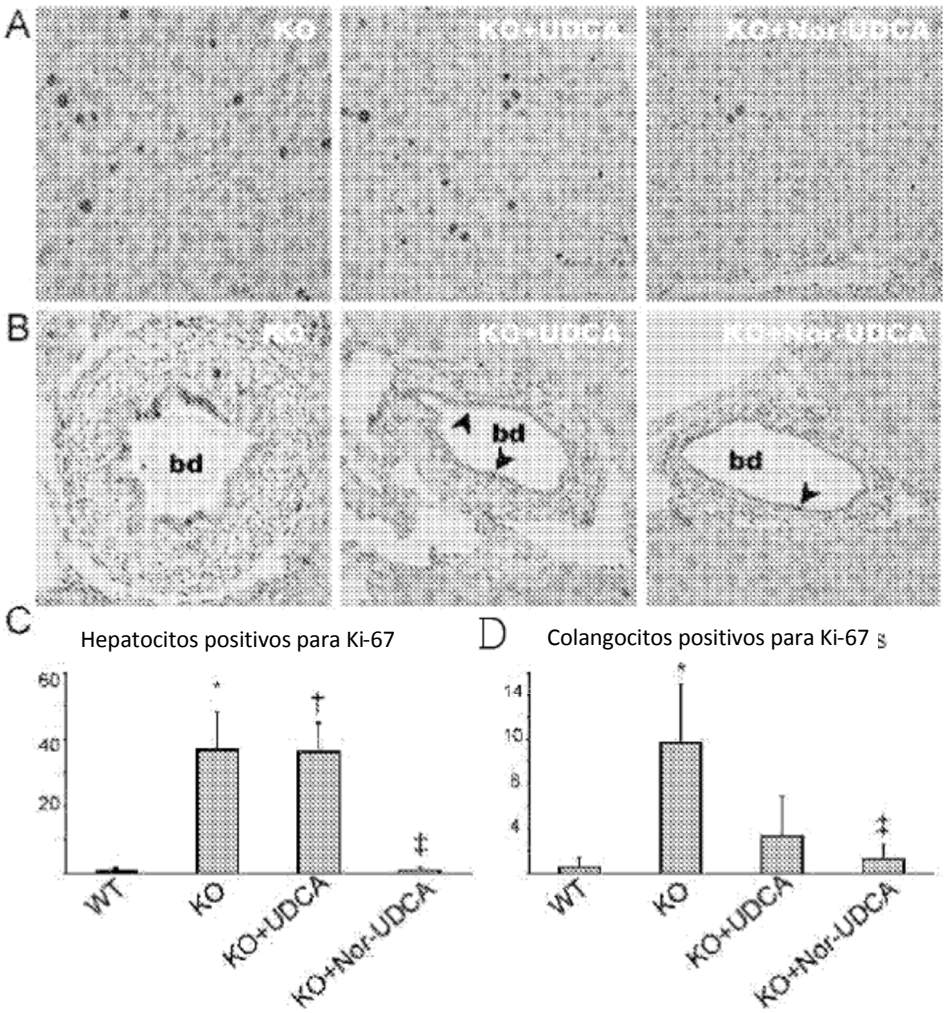

CO
UDCA
Nor-UDCA
Mrp3
1.0
2.3*
2.6*
Mrp4
n.d.
1.0
3.2*

Fig. 5


A
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
B
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
bd
bd
bd
C
Hepatocitos positivos para Ki-67
60
40
20
WT
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA
D
Colangocitos positivos para Ki-67
14
10
8
4
WT
KO
KO+UDCA
KO+Nor-UDCA

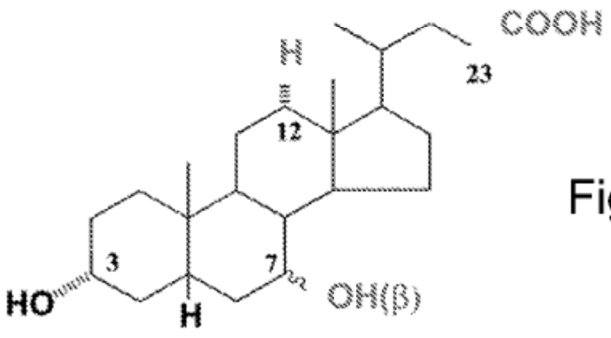

COOH
H
23
12
3
7
HO
H
OH(β)

Fig. 8