

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 841**

51 Int. Cl.:

C07J 31/00	(2006.01)
A61K 31/575	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)
C07J 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031861**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13154752**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13775974 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2836502**

54 Título: **Un novedoso metabolito de colesterol, disulfato de 5-colesten-3beta-25-diol (25HCDS) para el tratamiento de trastornos metabólicos, hiperlipidemia, diabetes, esteatosis hepática y aterosclerosis**

30 Prioridad:

12.04.2012 US 201261623414 P
12.04.2012 US 201261623203 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2017

73 Titular/es:

VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY
(100.0%)
800 East Leigh Street Suite 3000
Richmond, VA 23219, US

72 Inventor/es:

REN, SHUNLIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 641 841 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

Un novedoso metabolito de colesterol, disulfato de 5-colesten-3beta-25-diol (25HCDS) para el tratamiento de trastornos metabólicos, hiperlipidemia, diabetes, esteatosis hepática y aterosclerosis

5

Campo de la invención

La invención se refiere, en líneas generales, a un novedoso metabolito de colesterol, disulfato de 5-colesten-3β-25-diol, (25HCDS) y usos del mismo. En particular, la invención proporciona 25HCDS para la prevención y el tratamiento de enfermedades tales como trastornos metabólicos de los lípidos y trastornos inflamatorios, por ejemplo, hiperlipidemia, diabetes, esteatosis hepática y aterosclerosis.

10

Antecedentes de la invención

El hígado desempeña una función central en el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos. La acumulación de lípidos en tejidos hepáticos da lugar a esteatosis hepática no alcohólica (EHNA). La EHNA afecta a casi una cuarta parte de la población general de Estados Unidos y puede progresar hasta cirrosis sintomática y carcinoma hepatocelular. El espectro de EHNA varía de esteatosis no progresiva simple hasta esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) progresiva que provoca cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. La patogénesis de EHNA se ve como un proceso de dos etapas. La primera etapa es la acumulación de triglicéridos y lípidos asociados en los hepatocitos. La segunda etapa es la aparición de inflamación hepática. La característica distintiva de EHNA se caracteriza por acumulación aumentada de triglicéridos intrahepáticos. La reducción de los niveles de lípidos es un elemento importante del tratamiento exitoso de EHNA. En mamíferos, la proteína-1c de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-1c) controla preferentemente la expresión de genes lipogénicos; y regula la homeostasis de ácidos grasos y triglicéridos. Su función en la biosíntesis de ácidos grasos y el desarrollo de esteatosis hepática está bien documentada. Sin embargo, actualmente no hay un tratamiento aprobado para EHNA.

15

20

25

Los oxisteroles pueden actuar en múltiples puntos en la homeostasis del colesterol y el metabolismo de los lípidos. El receptor de oxisterol, LXR, es un factor de transcripción regulado por esterol del metabolismo de los lípidos. La activación de LXR estimula la expresión de la evacuación y eliminación del colesterol a través de ABCA1 y ABCG5/8, pero también regula por incremento la expresión de SREBP-1c, que a su vez regula al menos 32 genes implicados en la biosíntesis y transporte de lípidos. Por lo tanto, aunque la activación de LXR por ligando sintéticos podría reducir el nivel de colesterol en el suero para proteger contra la aterosclerosis, la activación también da lugar a esteatosis hepática e hipertrigliceridemia debido a la inducción de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a través de la activación de SREBP-1c. Los hepatocitos tienen una capacidad limitada de almacenar ácidos grasos en forma de triglicéridos. Una vez se ha superado la capacidad, se produce daño celular. Cantidades en exceso de ácidos grasos intracelulares activan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), causando lipotoxicidad y activación de las rutas de señalización inflamatorias, que en finalmente dan lugar a apoptosis.

30

35

El 3-sulfato de 5-colesten-3β, 25-diol (25HC3S) es un oxisterol que se ha identificado recientemente en núcleos hepáticos primarios de rata. El 25HC3S se divulga en el documento WO 2006/047022. Este oxisterol puede sintetizarse por la esterol sulfotransferasa SULT2B1b a partir de 25-hidroxicolesterol (25HC) por sulfatación del oxisterol. La administración exógena de un metabolito de colesterol similar, el 3β-sulfato de 5-colesten-3β,25-diol (25HCβS), disminuye la expresión tanto de SREBP-1 como de SREBP-2; bloquea el procesamiento de SREBP-1c; y reprime la expresión de enzima clave implicadas en el metabolismo de los lípidos, incluyendo la acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC-1), la ácido graso sintasa (FAS) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), disminuyendo posteriormente los niveles de lípidos neutros y colesterol.

40

45

Los resultados indican que 25HC3S actúa como un antagonista de LXR y como una señal de saciedad de colesterol; suprimiendo la ruta sintética de ácidos grasos y triglicéridos mediante la inhibición de la señalización de LXR/SREBP. Por otra parte, 25HC3S aumenta la expresión de kBβ; bloquea la degradación de kBβ inducida por TNFα; y disminuye los niveles nucleares de NFκB. Por el contrario, 25HC actúa de una manera opuesta, induciendo la degradación de kBβ y la acumulación nuclear de NFκB. Estos resultados indican que 25HC3S también está implicado en las respuesta inflamatorias y puede representar un vínculo entre las rutas inflamatorias y la regulación de la homeostasis de los lípidos.

50

55

Sumario de la invención

Otro metabolito de colesterol regulador, el disulfato de 5-colesten-3β, 25-diol (25HCDS) se ha identificado ahora. Los estudios de 25HCDS indican que la expresión disminuida de este metabolito de origen natural desempeña una función importante tanto en la acumulación de lípidos como en la lesión celular en hepatocitos y macrófagos, contribuyendo de ese modo a la patogénesis de los trastornos metabólicos. La adición de 25HCDS al medio de cultivo de hepatocitos y macrófagos disminuyó los niveles de ARNm de las proteínas de unión al elemento regulador de esterol (SREBP), inhibió el procesamiento de las SREBP y posteriormente reguló por disminución las enzimas clave implicadas en la biosíntesis de lípidos, dando lugar a niveles disminuidos de lípidos intracelulares en hepatocitos y macrófagos. El 25HCDS también aumentó la expresión del receptor del activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR), kB, y los

60

65

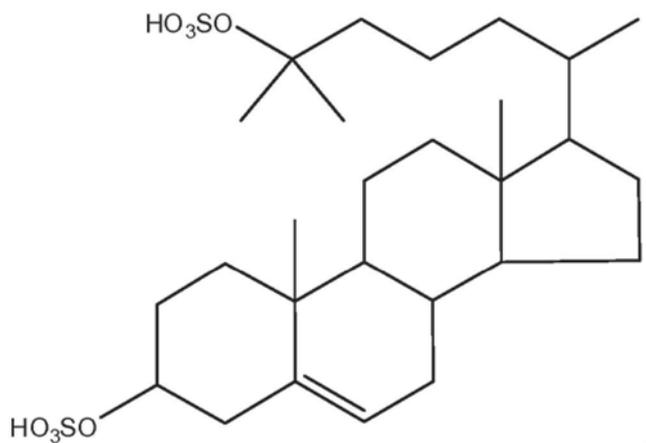
niveles de ARNm del coactivador 1 alfa del receptor del activador de la proliferación de peroxisomas (PGC-1 α), disminuyó los niveles nucleares de NF κ B y redujo la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias. De manera significativa, los estudios *in vivo* demostraron que la administración de 25HCDS disminuía los lípidos neutros hepáticos en un 20-35 % sin mostrar toxicidad.

5 Por lo tanto, el metabolito de colesterol recién descubierto 25HCDS funciona como un auténtico agonista de PPAR γ y antagonista de LXR que inhibe la biosíntesis de colesterol y lípidos en hepatocitos y macrófagos *in vitro* e *in vivo*, además de reprimir las respuestas inflamatorias mediante la ruta de señalización de PPAR γ /I κ B/NF κ B. El 25HCDS, que se ha sintetizado químicamente como se describe en la sección de ejemplos de este documento, por tanto, puede usarse como medicamento para el tratamiento y la prevención de trastornos metabólicos de los lípidos e inflamatorios, incluyendo hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes, esteatosis hepática, etc.

15 Otras características y ventajas de la presente invención se expondrán en la siguiente descripción de la invención y, en parte, serán evidentes a partir de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. La invención se logrará y alcanzará por las composiciones y métodos señalados particularmente en la descripción escrita y las reivindicaciones de la misma.

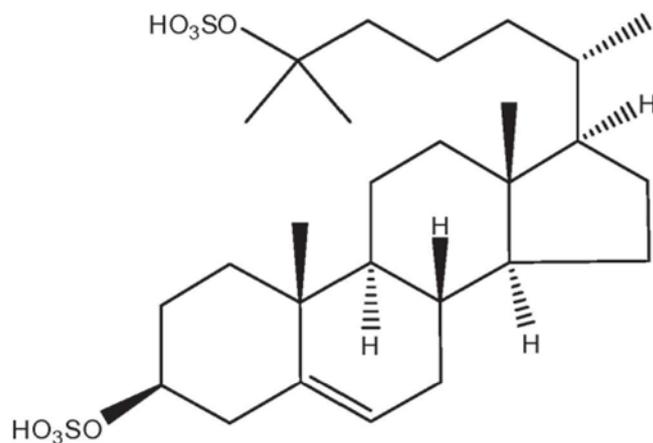
En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que es: (i) disulfato de 5-colesten-3,25-diol (25HCDS) de fórmula

20



o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable del mismos; para su uso como medicamento. En algunos aspectos, el compuesto es

25

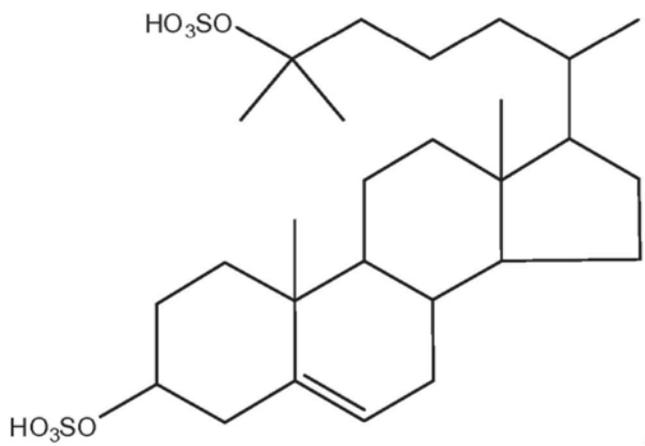


30 En algunos aspectos, la invención proporciona el compuesto para su uso en un método de: reducción de los lípidos en un sujeto que lo necesita; reducción de la biosíntesis de colesterol y lípidos en un sujeto que los necesita; reducción de la inflamación en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la diabetes en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la hiperlipidemia en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la esteatosis hepática en un sujeto que lo necesita; o tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto que

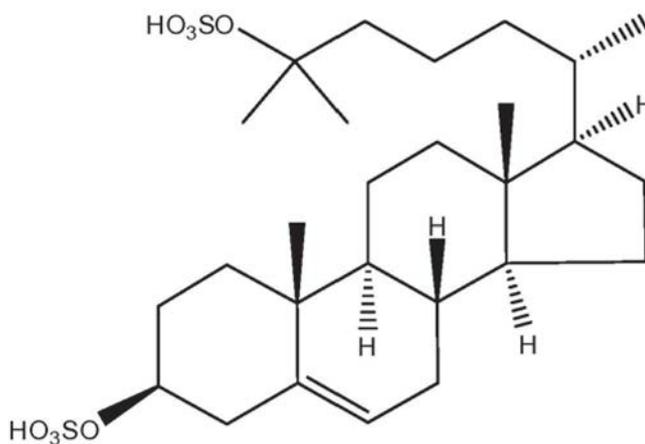
lo necesita.

En algunos aspectos, el compuesto se administra en una cantidad que varía de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg basada en la masa corporal de dicho sujeto, o el compuesto se administra en una cantidad que varía de 1 mg/kg a 10 mg/kg, basada en la masa corporal de dicho sujeto; y/o la administración comprende al menos uno de administración oral, administración entérica, administración sublingual, administración transdérmica, administración intravenosa, administración peritoneal, administración parenteral, administración por inyección, inyección subcutánea e inyección intramuscular.

- 5
- 10 En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que es: (i) disulfato de 5-colesten-3,25-diol (25HCDS) de fórmula



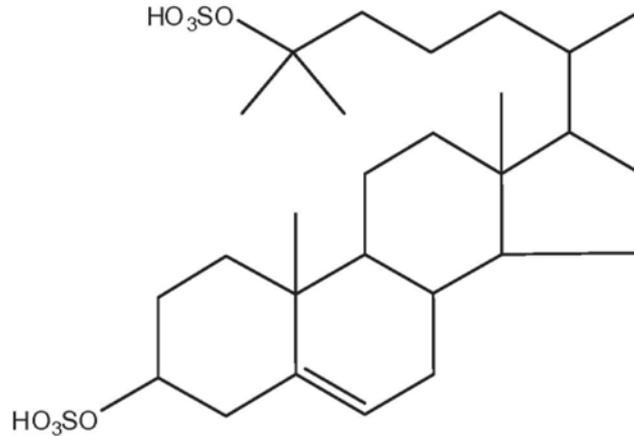
- 15 o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos aspectos, el compuesto es



- 20 En algunos aspectos, el compuesto es un compuesto aislado. En otros aspectos, el compuesto es sustancialmente puro. En otros aspectos más, el compuesto está en forma sólida. La forma sólida puede estar en forma de polvo; y/o en forma liofilizada.

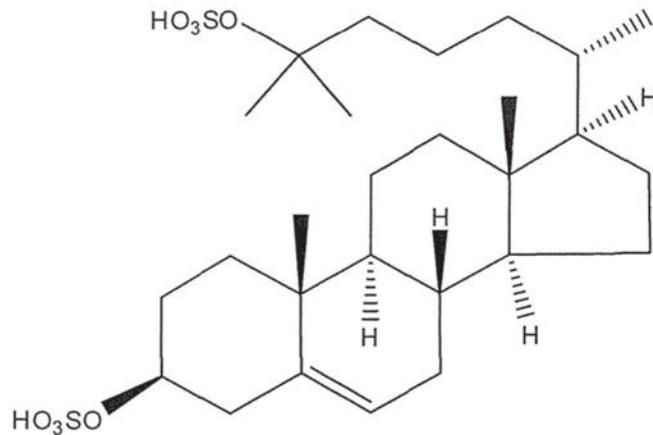
La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto que es: (i) disulfato de 5-colesten-3,25-diol (25HCDS) de fórmula

25



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un excipiente, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. En algunos aspectos, el compuesto es

5

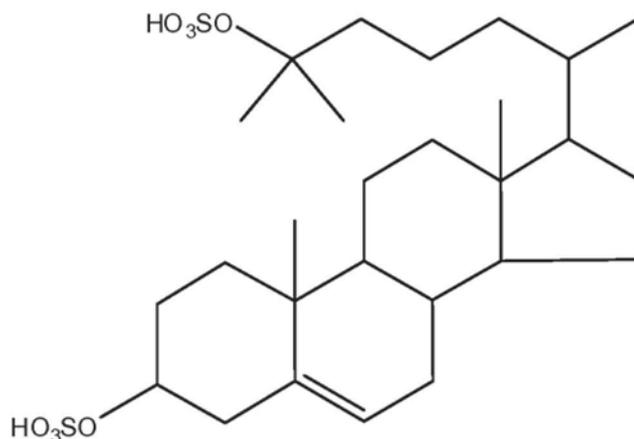


En algunos aspectos, la composición farmacéutica se formula en una forma de dosificación unitaria. En otros aspectos, la composición farmacéutica está en forma sólida. Las formas sólidas de la composición incluyen aquellas en que: la composición farmacéutica está en forma de un polvo, un comprimido, una cápsula o una pastilla para chupar; o la composición comprende el compuesto en forma liofilizada junto con un agente espesante, estando opcionalmente la composición en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende un vehículo que es un líquido. En este aspecto, el compuesto puede solubilizarse en el líquido o dispersarse en el líquido; y/o el líquido es acuoso; y/o el líquido es agua estéril para inyecciones o solución salina tamponada con fosfato; y/o la composición está en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa.

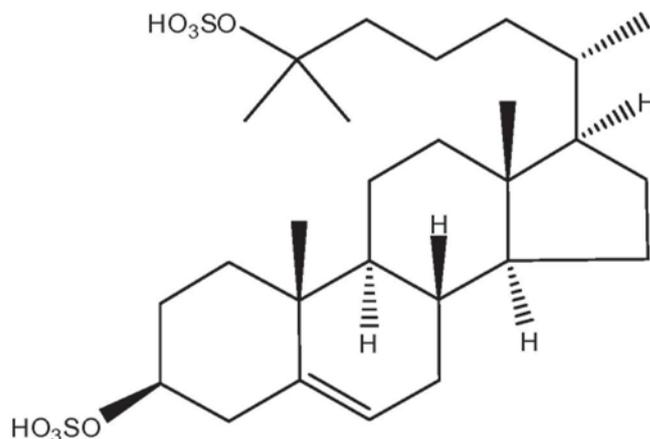
10

15

La invención también proporciona procesos para producir un compuesto



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un compuesto



5

comprendiendo dicho proceso hacer reaccionar 25-hidroxicolesterol con una fuente de trióxido de azufre y, opcionalmente, formar una sal farmacéuticamente aceptable a partir del disulfato de 5-colesten-3,25-diol, (25HCDS) resultante. En algunos aspectos, la fuente de trióxido de azufre es un complejo de amina de trióxido de azufre. La invención también proporciona un proceso de producción de la composición farmacéutica, comprendiendo dicho proceso combinar el compuesto con un excipiente, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable.

10

Como se indica anteriormente, la presente invención proporciona *inter alia* los compuestos especificados para su uso en un método de: reducción de los lípidos en un sujeto que lo necesita; reducción de la biosíntesis de colesterol y lípidos en un sujeto que los necesita; reducción de la inflamación en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la diabetes en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la hiperlipidemia en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la esteatosis hepática en un sujeto que lo necesita; o tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto que lo necesita. Para disipar cualquier duda, en este aspecto, la presente invención puede proporcionar el compuesto especificado para su uso como medicamento en el método especificado. Además, la presente invención puede proporcionar el compuesto especificado como un ingrediente terapéutico activo en el método especificado. Además, la presente invención puede proporcionar el compuesto especificado para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal por tratamiento, comprendiendo el método el método especificado.

15

20

25 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización de oxiesterol nuclear como disulfato de 5-colesten-3 β , 25-diol por espectrometría de masas con triple cuadruplo de iones negativos. Espectro de exploración completa negativa por HPLC/EM, se muestra el perfil de elución de HPLC-EM clasificado con el ion de masa 80 del espectro de exploración del producto de m/z 583 y m/z 561.

30

Figura 2. Análisis de 25HCDS sintetizado químicamente. Espectro de EM del producto. 1

Figura 3. Espectro de RMN de H de 25HCDS. Las flechas indican el protón en la posición 3 del compuesto y su desplazamiento químico de resonancia en el material de partida y en el producto.

Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C de 25HCDS. Las flechas indican las posiciones del carbono 3 y 25 del compuesto y su desplazamiento químico de resonancia en el material de partida y en el producto.

Figura 5A-D. 25HCDS regula la expresión de genes biosintéticos de los lípidos. **A**, se muestra el análisis por RT-PCR a tiempo real de los niveles de ARNm de SREBP-1c, ACC y FAS en células THP-1 tratadas con 25HCDS a la concentración indicada; **B**, niveles de ARNm de SREBP-2, HMG-CoA reductasa y LDLR; PPAR γ e I κ B mRNA en células THP-1 tratadas con 25HCDS en los tiempos indicados, **(C)** y a las concentraciones indicadas **(D)**. Los niveles de expresión se normalizaron a GAPDH. Cada valor representa la media de tres mediciones diferentes \pm desviación típica.

Figura 6. La administración de 25HCDS disminuye la acumulación de lípidos en el tejido hepático en modelos de ratón de EHNA. A los animales se les inyectó por vía peritoneal 25HCDS una vez cada 3 días durante 6 semanas. Se determinaron los triglicéridos hepáticos, los ácidos grasos libres, el colesterol total, el colesterol libre y el éster de colesterol, los ácidos grasos libres y los triglicéridos como se describe en el ejemplo. Cada nivel individual se normalizó por la concentración de proteína. Todos los valores se expresan como la media \pm DT; El símbolo * representa $p < 0,05$ frente al hígado de ratones tratados con vehículo alimentados con HFD.

Descripción detallada

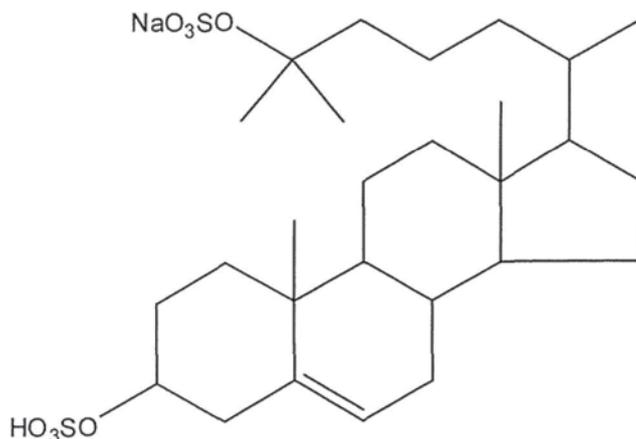
Un novedoso metabolito de colesterol, disulfato de 5-colesten-3 β ,25-diol (25HCDS), se ha identificado ahora. La administración de 25HCDS aumentó sustancialmente la expresión de PPAR γ , el coactivador 1 alfa de PPAR γ (PGC-1 α) e I κ B, y disminuyó los niveles hepáticos de triglicéridos y colesterol mediante la ruta de señalización de LXR-SREBP-1c *in vivo* en modelos de EHNA de ratón. Estos hallazgos demuestran que 25HCDS es un potente regulador implicado en el metabolismo de los lípidos y las respuestas inflamatorias.

La invención, por tanto, proporciona métodos de uso de 25HCDS para el tratamiento y la prevención de trastornos metabólicos de los lípidos e inflamatorios. En algunos aspectos, los métodos implican administrar una dosis terapéuticamente eficaz de 25HCDS a los sujetos que necesitan dicho tratamiento, para elevar el nivel de 25HCDS en el sujeto y/o para lograr cambios beneficiosos en el metabolismo de los lípidos. La implementación de los métodos, en general, implica identificar pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar trastornos metabólicos de los lípidos y afecciones asociadas con los mismos, y/o identificar a los pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar inflamación anómala, y administrar 25HCDS en una forma aceptable por una vía apropiada. La identificación de sujetos adecuados puede conseguirse, por ejemplo, usando diversas pruebas hematológicas, resultados de biopsia hepática, la presencia de síntomas evidentes de enfermedad, etc., como se sabe en la técnica. Los sujetos adecuados para tratamiento incluyen aquellos que se identifican como que están padeciendo o probablemente padecen un trastorno metabólico de los lípidos y/o inflamación. El 25HCDS y las composiciones farmacéuticas relacionadas también se proporcionan de acuerdo con la presente invención. Estos se pueden usar en los métodos de tratamiento.

El 25HCDS puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de doble adición o una sal de una adición. Una sal de doble adición se forma por pérdida de los átomos de hidrógeno en cada uno de los dos grupos sulfato de la molécula de 25HCDS. Una sal de una adición se forma por la pérdida del átomo de hidrógeno en solamente uno de los dos grupos sulfato de la molécula de 25HCDS (en la posición 3 o en la 25 de la molécula).

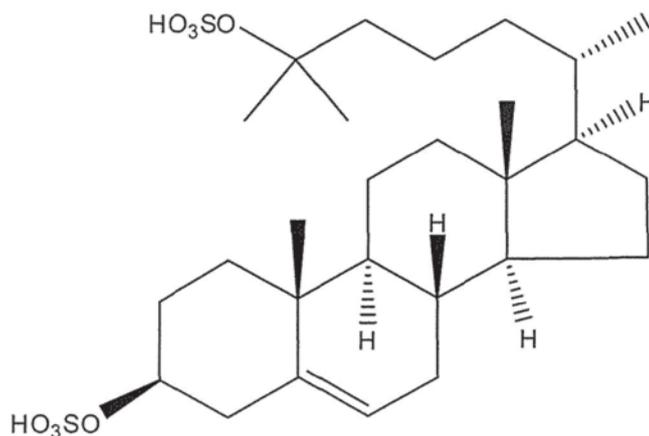
La sal farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una sal de metal alcalino (por ejemplo, una sal de litio, sodio o potasio), una sal de metal alcalinotérreo (por ejemplo, una sal de calcio) o una sal de amonio. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una sal de sodio, potasio, calcio, litio o amonio.

Un ejemplo de dicha sal es una sal de sodio de 25HCDS, por ejemplo, una sal de una adición de sodio de 25HCDS, tal como la sal de una adición formada por la pérdida del átomo de hidrógeno en el grupo sulfato en la posición 25 de 25HCDS, es decir, el compuesto de fórmula



Para disipar cualquier duda, se destaca que las referencias en toda esta memoria descriptiva a "25HCDS" incluyen sales farmacéuticamente aceptables de 25HCDS salvo que se indique explícitamente lo contrario.

- 5 El colesterol contiene ocho centro quirales, dando lugar, por tanto, a una gran cantidad de isómeros estereoisoméricos distinguibles. Estos ocho centro quirales también están presentes en 25HCDS. En general, el 25HCDS usado en la presente invención puede estar en cualquier forma estereoisomérica individual o puede ser una mezcla de dos cualesquiera o más de estas formas estereoisoméricas. Sin embargo, al menos un 50 % en peso, preferiblemente al menos un 90 % en peso y mucho más preferiblemente al menos un 95 % en peso del 25HCDS puede tener la fórmula
- 10



Se apreciará que la quiralidad en cada uno de los ocho centros quirales en esta fórmula es análoga a la encontrada en el colesterol nativo. Por lo tanto, este estereoisómero corresponde a la forma estereoisomérica del metabolito 25HCDS nativo *in vivo*.

- 15
- 20 El 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser 25HCDS aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. "Aislado" significa no comprendido dentro del material tisular contenido dentro, o extraído de, un sujeto humano o animal. Por ejemplo, el 25HCDS aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo no está comprendido dentro de una célula. Por lo tanto, el 25HCDS aislado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es claramente distinguible del 25HCDS nativo que está comprendido dentro de material tisular (por ejemplo, una célula) que está en sí mismo contenido dentro, o se ha extraído de, un sujeto humano o animal.

- 25 El 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser sustancialmente puro. Por ejemplo, el 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede proporcionarse en una forma sustancialmente purificada para su uso en los métodos de tratamiento.

- 30 Cuando es "sustancialmente puro" o está "sustancialmente purificado", el oxiesterol disulfatado (el 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) puede estar en una forma que está al menos aproximadamente un 75 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % o más libre de otras especies químicas. El 25HCDS sustancialmente puro o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede comprender, en particular, al menos

aproximadamente un 90 % en peso o al menos aproximadamente un 95 % y más preferiblemente al menos aproximadamente un 98 % en peso, al menos aproximadamente un 99 % en peso o, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente un 99,5 % en peso o al menos aproximadamente un 99,8 % en peso de 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 El 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser sólido. Por ejemplo, el 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar en forma de un polvo.

10 El 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar en forma liofilizada. Como es bien sabido, la liofilización es un proceso de deshidratación usado normalmente para conservar material perecedero o hacer que el material sea más adecuado para su transporte. Hay tres fases principales en esta técnica, concretamente congelación, secado primario y secado secundario. La congelación se realiza normalmente usando una máquina de liofilización. Durante el secado primario, la presión se controla por la aplicación de niveles apropiados de vacío mientras se suministra suficiente calor para posibilitar que cualquier cantidad de agua presente sublime. En el proceso de secado
15 secundario, se elimina el agua de hidratación por la aplicación adicional de calor. Normalmente, la presión también se disminuye para fomentar el secado adicional. Después de completarse el proceso de liofilización, el vacío puede interrumpirse con un gas inerte tal como nitrógeno antes del precintado o el material puede precintarse al vacío.

20 Aunque es posible aislar y purificar el 25HCDS de células vivas, los expertos en la materia reconocerán que para generar suficientes cantidades del oxiesterol disulfatado, el compuesto generalmente se sintetizará, por medios químicos sintéticos o por métodos que implican el uso de tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, usando enzimas clonadas para realizar modificaciones adecuadas del colesterol). Se proporciona un esquema de síntesis ejemplar en la sección de ejemplos a continuación.

25 Más generalmente, el 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede producirse de forma sintética haciendo reaccionar 25-hidroxicolesterol con una fuente de trióxido de azufre y, opcionalmente, formando una sal farmacéuticamente aceptable a partir del producto resultante.

30 Puede usarse cualquier fuente adecuada de trióxido de azufre para convertir los dos grupos hidroxilo (-OH) presentes en 25-hidroxicolesterol en grupos sulfato (-OSO₃H). Los complejos de trióxido de azufre-amina son un grupo ejemplar de fuentes de trióxido de azufre. Los ejemplos de dichos complejos incluyen complejo de trimetilamina de trióxido de azufre (TMAS), complejo de trietilamina de trióxido de azufre (TEAS), complejo de dimetilnilina de trióxido de azufre (DMAS), complejo de dimetilformamida de trióxido de azufre (DMFS), complejo de piridina de trióxido de azufre (PSS) y complejo de polivinilpiridina de trióxido de azufre (PVPS). Normalmente, se usa de uno a veinte moles, por ejemplo,
35 de dos a diez moles, de la fuente de trióxido de azufre elegida (tal como el complejo de trióxido de azufre-amina) por mol de 25-hidroxicolesterol.

La reacción se realiza normalmente en un disolvente inerte. El disolvente puede ser, por ejemplo, un disolvente anhidro. Un ejemplo de dicho disolvente es piridina anhidra.

40 También puede añadirse una base, por ejemplo, para generar la sal farmacéuticamente aceptable deseada a partir del producto de disulfato. Una dichas bases es NaOH, que puede usarse para generar una sal sódica de 25HCDS. Se apreciará fácilmente que pueden usarse reactivos alternativos (que tienen diferentes basicidades y/o diferentes cationes) para generar otras sales farmacéuticamente aceptables.

45 La temperatura de reacción puede ser normalmente de 10 a 100 °C, por ejemplo, de 20 a 80 °C. El tiempo de reacción puede ser normalmente de 0,1 a 24 horas, por ejemplo, de 0,25 a 5 horas.

50 Si se desea, el producto puede purificarse de la mezcla de reacción después de que haya tenido lugar la reacción. Si se desea, el producto puede aislarse de la mezcla de reacción después de que haya tenido lugar la reacción.

El material de partida 25-hidroxicolesterol es un producto disponible en el mercado. Como alternativa, puede prepararse hidroxilando el colesterol (véase, por ejemplo, Ogawa et al. Steroids 74:81-87). El proceso, por lo tanto, puede comprender además una etapa inicial de hidroxilación del colesterol para producir el 25-hidroxicolesterol.

55 El 25HCDS puede administrarse en forma pura o en una formulación farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones (composiciones) normalmente incluyen 25HCDS o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente, diluyente o vehículo/medio fisiológicamente aceptable (compatible). El 25HCDS puede estar, por ejemplo, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal de metal alcalino tal como sodio, potasio, calcio, litio, amonio, etc.) u orto complejo.
60

La composición farmacéutica es estéril. Estéril significa sustancialmente libre de microbios viables, por ejemplo, que se determina usando el ensayo de esterilidad de USP (véase "The United States Pharmacopeia", 30.^a revisión, The United States Pharmacopeial Convention: 2008). Para mantener la esterilidad, la composición farmacéutica puede presentarse en un envase precintado que puede evitar la entrada de microbios viables. Por ejemplo, en el caso de una
65 composición farmacéutica líquida, la composición puede precintarse en un vial o ampolla.

Debe entenderse que las formulaciones (composiciones) farmacéuticamente aceptables incluyen materiales líquidos y sólidos convencionalmente utilizados para preparar tanto formas inyectables de dosificación como formas sólidas de dosificación, tales como comprimidos, pastillas para chupar, polvos y cápsulas, así como formas de dosificación en aerosol. Los compuestos pueden formularse con vehículos acuosos o de base oleosa. Puede usarse agua como
 5 vehículo para la preparación de composiciones (por ejemplo, composiciones inyectables), que también pueden incluir tampones convencionales y agentes que hacen que la composición sea isotónica y que mantienen un pH fisiológicamente aceptable. Otros aditivos potenciales (preferiblemente los que se consideran generalmente seguros [GRAS]) incluyen: colorantes; aromatizantes; tensioactivos (TWEEN, ácido oleico, etc.); disolventes, estabilizantes, elixires y aglutinantes o encapsulantes (lactosa, liposomas, etc.). Los diluyentes y excipientes sólidos incluyen lactosa,
 10 almidón, agentes disgregantes convencionales, recubrimientos y similares. También pueden usarse conservantes tales como metilparabeno o cloruro de benzalconio.

En mayor detalle, cuando la composición está en forma sólida, puede estar en forma de un polvo, un comprimido, una cápsula o una pastilla para chupar. Cuando la composición está en forma sólida, la composición puede comprender el
 15 25HCDS en forma liofilizada junto con un agente espesante. Un agente espesante es una sustancia farmacéuticamente inactiva y normalmente inerte químicamente que puede añadirse a una composición para aumentar su masa. Los agentes espesantes comunes para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas liofilizadas, y que son adecuados en esta ocasión, incluyen manitol y glicina. Cuando la composición está en forma sólida, puede estar opcionalmente en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa.

Quando la composición farmacéutica comprende un vehículo líquido, el 25HCDS puede solubilizarse en dicho líquido o dispersarse en dicho líquido; y/o el líquido puede ser acuoso; y/o el líquido puede ser agua estéril para inyecciones o solución salina tamponada con fosfato. Cuando la composición farmacéutica comprende un vehículo líquido, la
 20 composición puede estar en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa.

Dependiendo de la formulación, se espera que el agente activo 25HCDS consista en aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % en peso de la composición y el "vehículo" portador constituirá de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % en peso de la composición. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir cualquier aditivo o auxiliar farmacéuticamente aceptable adecuado en la medida en que no impidan o
 25 interfieran con el efecto terapéutico del oxiesterol sulfatado.

La administración puede ser al menos una de administración oral, administración entérica, administración sublingual, administración transdérmica, administración intravenosa, administración peritoneal, administración parenteral, administración por inyección, inyección subcutánea e inyección intramuscular. Por ejemplo, la administración puede
 35 ser oral o parenteral, incluyendo inyección intravenosa, intramuscular subcutánea, intradérmica, inyección intraperitoneal, etc. o por otras vías (por ejemplo, suministro transdérmico, sublingual, oral, rectal y bucal, inhalación de un aerosol, etc.). En una realización preferida, la administración es oral. Además, la administración del compuesto puede realizarse como un único modo de tratamiento o junto con otros tratamientos, por ejemplo, con fármacos que reducen los lípidos o el colesterol, ejercicio y regímenes de alimentación, etc., como se describe anteriormente para regímenes de tratamiento que pueden asumirse por un sujeto tras la detección de un trastorno metabólico de los lípidos. La administración de 25HCDS a un paciente puede ser intermitente o en una tasa gradual o continua, constante o controlada. Además, el momento del día y la cantidad de veces por día que la formulación farmacéutica se administra pueden variar y se determinan mejor por los expertos en la materia, tales como médicos.

La dosificación exacta de 25HCDS a administrarse puede variar dependiendo de la edad, el género, el peso, el estado de salud global del paciente individual, etc., así como de la etiología precisa de la enfermedad. Sin embargo, en general, para la administración en mamíferos (por ejemplo, seres humanos), las dosificaciones terapéuticamente eficaces están en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg o más de compuesto por kg de peso corporal por 24 h, y habitualmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg de compuesto por kg de peso corporal por 24 h, y frecuentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg de compuesto por kg de peso corporal por 24 h, son eficaces.
 50

Una composición farmacéutica de la invención puede formularse en forma de dosificación unitaria, es decir, la composición farmacéutica puede estar en forma de partes concretas, que contienen, cada una, una dosis unitaria del 25HCDS. En este contexto, una dosis unitaria puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de 25HCDS.
 55

La composición farmacéutica puede prepararse combinando el 25HCDS con los excipientes, diluyentes y/o vehículos fisiológicamente aceptables elegidos.
 60

Aunque los sujetos son habitualmente seres humanos, también se contemplan aplicaciones veterinarias de la tecnología.

En otros aspectos, el nivel de 25HCDS se eleva en un sujeto que lo necesita aumentando la expresión/producción endógena de 25HCDS. Los métodos ejemplares para hacerlo incluyen proporcionar al sujeto una o más enzimas
 65

responsables de la síntesis de 25HCDS. En algunas realizaciones, se proporcionan las propias enzimas; en otras realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las enzimas. Las enzimas que están implicadas en la síntesis de 25HCDS son SULT2Bab y SULT2B1a, y una o ambas de estas pueden administrarse para elevar los niveles endógenos de 25HCDS. Por ejemplo, pueden proporcionarse vectores que contienen y expresan una o ambas de estas enzimas. Los vectores ejemplares incluyen, aunque sin limitación, vectores adenovíricos, vectores retrovíricos, vectores de replicación competente, vectores herpesvíricos, etc.

Los trastornos metabólicos de los lípidos que pueden prevenirse o tratarse elevando los niveles de 25HCDS en un sujeto como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación: hepatitis (inflamación hepática) causada principalmente por diversos virus, pero también por algunas infecciones bacterianas, fármacos o agentes químicos (por ejemplo, venenos, alcohol), así como complicaciones asociadas tales como fibrosis hepática; autoinmunidad (hepatitis autoinmunitaria) o afecciones hereditarias; esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), una enfermedad de espectro asociada con la obesidad y caracterizada por una abundancia de grasa en el hígado, y diversos síndromes asociados con EHNA (por ejemplo, hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis, enfermedad hepática terminal, etc.); cirrosis, es decir, la formación de tejido cicatrizal fibroso en el hígado debido al remplazo de células hepáticas muertas (la muerte de las células hepáticas puede estar causada, por ejemplo, por hepatitis vírica, alcoholismo o contacto con otros agentes químicos hepatotóxicos); hemocromatosis, una enfermedad hereditaria que causa la acumulación de hierro en el organismo, que da lugar finalmente a daño hepático; cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular primario o colangiocarcinoma y cánceres metastásicos, habitualmente desde otras partes del tubo digestivo); enfermedad de Wilson, una enfermedad hereditaria que causa que el organismo retenga cobre; colangitis esclerosante primaria, una enfermedad inflamatoria del conducto biliar, probablemente de naturaleza autoinmunitaria; cirrosis biliar primaria, una enfermedad autoinmunitaria de los conductos biliares pequeños; síndrome de Budd-Chiari (obstrucción de la vena hepática); síndrome de Gilbert, un trastorno genético del metabolismo de la bilirrubina, encontrado en aproximadamente un 5 % de la población; glucogenosis de tipo II; así como diversas enfermedades hepáticas pediátricas, por ejemplo, incluyendo la atresia biliar, deficiencia de alfa-1 antitripsina, síndrome de Alagille y colestasis intrahepática familiar progresiva, etc. Además, el daño hepático por traumatismo también puede tratarse, por ejemplo, daño causado por accidentes, heridas de bala, etc. Además, puede prevenirse o tratarse el daño hepático causado por ciertas medicinas, por ejemplo, fármacos tales como el agente antiarrítmico amiodarona, diversos fármacos antivíricos (por ejemplo, análogos nucleosídicos), aspirina (de forma poco frecuente como parte del síndrome de Reye en niños), corticoesteroides, metotrexato, tamoxifeno, tetraciclina, etc. se sabe que causan daño hepático. En algunas realizaciones, los métodos de diagnóstico y tratamiento se realizan en asociación con (por ejemplo, antes, durante o después) cirugía hepática en un sujeto. Por ejemplo, la cirugía hepática puede ser cirugía de trasplante de hígado y el sujeto que se trata puede ser un donante o un destinatario; o la cirugía hepática puede ser cirugía que eliminar el tejido hepático enfermo o dañado, o que elimina tumores cancerosos, etc.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección que se previene o se trata es o está causada por hiperlipidemia. Por "hiperlipidemia" se entiende una afección de niveles elevados de forma anómala de cualquier lípido y/o lipoproteína o de todos en la sangre. La hiperlipidemia incluye los subtipos tanto primario como secundario, siendo la hiperlipidemia primaria habitualmente debida a causas genéticas (tales como una mutación en una proteína receptora) y surgiendo la hiperlipidemia secundaria de otras causas subyacentes tales como diabetes. Los lípidos y compuestos lipídicos que pueden estar elevados en un sujeto y disminuirse por los tratamientos descritos en este documento incluyen, aunque sin limitación, quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). En particular, se sabe que el colesterol elevado (hipercolesterolemia) y los triglicéridos elevados (hipertrigliceridemia) son factores de riesgo para enfermedades de los vasos sanguíneos y cardiovasculares debido a su influencia sobre la aterosclerosis. La elevación de los lípidos también puede predisponer a un sujeto a otras afecciones tales como pancreatitis aguda. Los métodos de la invención, por tanto, pueden usarse en el tratamiento o profilaxis (por ejemplo, tratamiento profiláctico) de afecciones que son o están asociadas con lípidos elevados. Dichas afecciones incluyen, por ejemplo, aunque sin limitación: hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hígado graso (esteatosis hepática), síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, cardiopatía coronaria, aterosclerosis (es decir, enfermedad vascular arteriosclerótica o EVAS) y enfermedades asociadas, pancreatitis aguda, diversos trastornos metabólicos, tales como el síndrome de resistencia a la insulina, diabetes, síndrome del ovario poliquístico, esteatosis hepática, caquexia, obesidad, arteriosclerosis, ictus, cálculos biliares, enfermedad inflamatoria del intestino, trastornos metabólicos hereditarios tales como lipodosis y similares. Además, diversas afecciones asociadas con la hiperlipidemia incluyen las descritas en las patentes de Estados Unidos otorgadas 8.003.795 (Liu, et al.) y 8.044.243 (Sharma, et al.), cuyos contenidos completos se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, las enfermedades y afecciones que se previenen o tratan incluyen inflamación y/o enfermedades y afecciones asociadas con, caracterizadas o causadas por la inflamación. Estas incluyen un gran grupo de trastornos subyacentes a muchas enfermedades humanas. En algunas realizaciones, la inflamación es aguda, resultante de, por ejemplo, una infección, una lesión, etc. En otras realizaciones, la inflamación es crónica. En algunas realizaciones, el sistema inmunitario está implicado en el trastorno inflamatorio como se observa tanto en reacciones alérgicas como en algunas miopatías. Sin embargo, también pueden tratarse diversas enfermedades no inmunitarias con orígenes etiológicos en procesos inflamatorios, incluyendo cáncer, aterosclerosis y cardiopatía isquémica, así como otras enumeradas a continuación.

Los ejemplos de trastornos asociados con inflamación anómala que pueden prevenirse o tratarse usando 25HCDS incluyen, aunque sin limitación: acné común, asma, diversas enfermedades autoinmunitarias, enfermedad celíaca, prostatitis crónica, glomerulonefritis, diversas hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, rechazo de trasplante, vasculitis y cistitis intersticial. También se incluyen trastornos inflamatorios que se producen como resultado del uso de fármacos tanto prescritos de forma legal como ilegales, así como inflamación activada por percepciones negativas o las consecuencias de las mismas, por ejemplo, causadas por estrés, violencia o privación.

En un aspecto, el trastorno inflamatorio que se previene o trata es una reacción alérgica (hipersensibilidad de tipo 1), el resultado de una respuesta inmunitaria inapropiada que activa la inflamación. Un ejemplo común en la polinosis, que está causada por una respuesta hipersensible de los mastocitos de la piel a alérgenos. Las respuestas inflamatorias importantes pueden madurar en una respuesta generalizada conocida como anafilaxia. Otras reacciones de hipersensibilidad (de tipo 2 y tipo 3) está mediadas por reacciones de anticuerpos e inducen inflamación atrayendo leucocitos que dañan el tejido adyacente, y también pueden tratarse como se describe en este documento.

En otros aspectos, se previenen o tratan miopatías inflamatorias. Dichas miopatías están causadas por el sistema inmunitario que ataca inapropiadamente los componentes del músculo, dando lugar a signos de inflamación muscular. Pueden producirse junto con otros trastornos inmunitarios, tales como esclerosis generalizada, e incluyen dermatomiositis, polimiositis, y miositis por cuerpos de inclusión.

En un aspecto, los métodos y composiciones de la invención se usan para prevenir o tratar la inflamación generalizada, tal como la que está asociada con la obesidad. En dicha inflamación, los procesos implicados son idénticos a la inflamación tisular, pero la inflamación generalizada no está confinada a un tejido particular, sino que implica el endotelio y otros sistemas orgánicos. La inflamación generalizada puede ser crónica y se observa ampliamente en obesidad, donde se observan muchos marcadores inflamación elevados, que incluyen: IL-6 (interleucina-6), IL-8 (interleucina-8), IL-18 (interleucina-18), TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa), CRP (proteína C-reactiva), insulina, glucosa en sangre y leptina. Las afecciones o enfermedades asociadas con niveles elevados de estos marcadores pueden prevenirse o tratarse como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la inflamación puede clasificarse como "inflamación crónica de bajo grado" en que se observa un aumento de factor dos a tres en las concentraciones sistémicas de citocinas tales como TNF- α , IL-6 y CRP. La circunferencia de la cintura también se correlaciona significativamente con respuesta inflamatorias generalizadas; un factor predominante en esta correlación se debe a la respuesta autoinmunitaria activada por adiposidad, por la que las células inmunitarias "confunden" los depósitos de grasa con agentes infecciosos tales como bacterias y hongos. La inflamación generalizada también puede activarse por sobreingesta. Las comidas con elevado contenido de grasas saturadas, así como las comidas con elevado contenido de calorías, se han asociado con aumentos en los marcadores inflamatorios y la respuesta se puede volver crónica si la sobreingesta es crónica.

Se describe diversas facetas de la invención en el ejemplo a continuación. Sin embargo, la información proporcionada en el ejemplo no debe considerarse limitante del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo

Un novedoso metabolito de colesterol, disulfato de 5-colesten- 3 β - 25-diol (25HCDS), disminuye la biosíntesis de lípidos y suprime las respuestas inflamatorias *in vitro* e *in vivo*

Introducción

Se ha demostrado que hay una regulación incorrecta generalizada del metabolismo de los lípidos en esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y, específicamente, hay alteraciones principales en el metabolismo del colesterol. Los mecanismos potenciales por los que las alteraciones pueden dar lugar a EHNA mediante la señalización del receptor nuclear siguen sin esta claros. En el presente estudio, un novedoso metabolito de colesterol, el disulfato de 5-colesten-3 β , 25-diol (25HCDS) se identificó en hepatocitos primarios de rata. Como se describe en este documento, el 25HCDS ahora se ha sintetizado químicamente y se ha estudiado su función biológica. La administración de 25HCDS (25 μ M) a macrófagos THP-1 humanos y células HepG2, e *in vivo* a modelos animales de EHNA en ratón, aumentó la expresión de PPAR γ y el coactivador 1 alfa de PPAR γ (PGC-1 α) y disminuyó la expresión de proteínas clave implicadas en la biosíntesis de los lípidos y respuesta proinflamatorias. La administración disminuyó notablemente los niveles hepáticos de lípidos y suprimió las respuesta inflamatorias. La RT-PCR cuantitativa y el análisis por transferencia de Western demostraron que 25HCDS disminuía fuertemente los niveles de ARNm de SREBP-1/2 y suprimía la expresión de sus genes de respuesta, incluyendo ACC, FAS y HMG-CoA reductasa, y aumentaba los niveles de ARNm de kB y disminuía los de TNF α e IL β . Estos resultados sugieren que la inhibición de la biosíntesis de los lípidos se producía mediante el bloqueo de la señalización de SREBP, y la supresión de las respuesta inflamatorias mediante el aumento de la expresión de PPAR γ , PGC-1 α y kB. El análisis de los perfiles de lípidos en tejidos hepáticos demostró que la administración de 25HCDS una vez cada tres días durante 6 semanas disminuía significativamente el colesterol total, los ácidos grasos libres y los triglicéridos en un 30, 25 y 20 %, respectivamente. El 25HCDS es, por tanto, un potente regulador del metabolismo de los lípidos y las respuestas inflamatorias.

Materiales y métodos**Materiales:**

5 Los reactivos y suministros de cultivo celular se adquirieron de GIBCO BRL (Grand Island, NY); 25-hidroxicolesterol de New England Nuclear (Boston, MA). Las células THP-1 y HepG2 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Los reactivos para la RT-PCR a tiempo real fueron de AB Applied Biosystems (Warrington WA1 4 SR, RU). Los agentes químicos usados en esta investigación se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) o Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Los anticuerpos policlonales de conejo contra SREBP1, SREBP-2 y HMG-CoA reductasa se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Todos los disolventes se obtuvieron de Fisher (Fair Lawn, NJ) salvo que se indique otra cosa. Los reactivos de quimioluminiscencia potenciada (ECL) se adquirieron de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La testosterona y 27-hidroxicolesterol se obtuvieron de Research Plus Inc. (Bayonne, NJ). Las placas de cromatografía en capa fina (TLC) LK6 de 20 x 20 cm se adquirieron de Whatman Inc. (Clifton, NJ).

Métodos:**Síntesis química de disulfato de 5-colesten-3 β , 25-diol**

20 Procedimiento general: El 25-hidroxicolesterol se preparó a partir de colesterol por el método descrito previamente (Ogawa et al. Steroids 74:81-87). Los espectros de IR se obtuvieron en discos de KBr en un espectrómetro JASCO FT-IR 460 plus (Tokio, Japón). Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un instrumento Varian 500 Inova (AS500) a 499,62 MHz y 125,64 MHz, respectivamente. Los espectros de masa de baja resolución por inyección de flujo (EM-BR) se registraron por un EM Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra equipado con sonda de ionización por electronebulización (IEN) en modo de iones negativos. Los espectros de masa de alta resolución (EM-AR) se midieron usando EM Thermo Scientific LTQ Qbitrap Discovery con sonda IEN en el modo de iones negativos. Se realizó TLC en fase inversa en placas RP-18F254S recubiertas previamente usando mezclas de metanol-agua-ácido acético (90:10:1, v/v/v) como disolvente de desarrollo. Las manchas se visualizaron por H_2SO_4 al 50 % con calentamiento a 110 °C. Se usó un cartucho Bond Elute C18 (10 g; Varian,) para la purificación de muestras. OXONE® (peroximonosulfato de potasio) y acetona se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), y todos los demás reactivos usados fueron de máxima calidad excepto los disolventes orgánicos que fueron de calidad HPLC.

35 Síntesis de disulfato de 5-colesten-3 β ,25-diol (25HCDS): A una solución de 25-hidroxicolesterol (30 mg, 0,07 mmol) en piridina anhidra (300 μl), se añadió complejo de trióxido de azufre-trimetilamina (45 mg) y la suspensión se agitó a 50 °C durante 1 h. A la mezcla de reacción, se añadió NaOH metanólico 0,1 N (100 μl) y la mezcla se aplicó a un cartucho Sep Pak C18, que se había cebado con metanol (10 ml) y agua (10 ml). El cartucho se lavó sucesivamente con PBS (25 ml) y agua (25 ml), y después el 25HCDS retenido se eluyó con metanol al 60 % (10 ml). Después de dilución 10X con acetonitrilo, los disolventes se evaporaron a sequedad bajo una corriente de N_2 por debajo de 40 °C, y el 25HCDS se obtuvo en forma pulverizada. Rendimiento, 25 mg (60 %).

Cultivo celular

45 Los monocitos THP-1 humanos y las células HepG2 se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvieron de acuerdo con los protocolos del proveedor. Los monocitos THP-1 se diferenciaron en macrófagos añadiendo 100 nM de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). Cuando las células alcanzaron ~90 % de confluencia, se añadió 25HCDS en etanol (la concentración final de etanol en el medio fue de un 0,1 %). Las células se recogieron en los momentos indicados para el análisis de proteínas, ARNm y lípidos.

50 Para el estudio de la regulación de la expresión de HMG CoA, se cultivaron HepG2 o PHH en el medio como se describe anteriormente en presencia o ausencia de mevinolina (50 μM) y mevalonato (0,5 μM). Después de cultivar durante 48 h, se añadieron oxisteroles y se cultivaron durante otras 6 h, y después las células se recogieron para determinar los niveles de ARNm y proteínas.

Determinación de la biosíntesis de colesterol por TLC y HPLC

55 Después de incubación de macrófagos THP-1 o células HepG2 en medio que contenía diferentes concentraciones de 25HCDS como se indica durante 6 h, a las células en placas de 60 mm se les administró 3 ml del mismo medio fresco que contenía 5 μCi de [^{14}C] acetato. Después de 2 h de incubación a 37 °C, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se recogieron con agente de caucho como se describe, y se reunieron en tubos de microcentrífuga. Las células se sedimentaron por centrifugación y los sedimentos se lavaron tres veces por resuspensión y sedimentación. Las fracciones subcelulares (microsómica, citosólica y nuclear) se aislaron como se describe previamente (2). Los sedimentos celulares o subcelulares se resuspendieron en 0,3 ml de PBS. A cada muestra, se añadieron 1,5 μg de testosterona como un patrón interno. Los lípidos totales se extrajeron y separaron añadiendo 3 volúmenes de cloroformo:metanol (1:1). Se aisló el [^{14}C] colesterol y los hidroxicolesterol en la fase de cloroformo y se separaron en TLC (tolueno:acetato de acetilo, 2/3, v/v). Los derivados de [^{14}C] acetato se visualizaron por el lector de imágenes, Fujifilm BAS-1800 II como se describe previamente (1).

Para el análisis de productos de esteroles no marcados, los lípidos extraídos se incubaron con 2 unidades de colesterol oxidasa a 37 °C durante 20 min. La reacción de oxidación se terminó añadiendo 1,5 ml de metanol seguido de 0,5 ml de KCl saturado. Los esteroides se extrajeron dos veces usando 3 ml de hexano. La fase de hexano se recogió y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. Los residuos se disolvieron en los disolventes de la fase móvil para el análisis por HPLC como se describe previamente (3).

Los derivados de [^{14}C] acetato en la fase de cloroformo se analizaron por HPLC en una columna de sílice (5 μ x 4,6 mm x 25 cm; Beckman, EE.UU.) usando el sistema de suministro de disolvente HP Series 1100 (Hewlett Packard) a 1,3 ml/min de caudal. La columna se equilibró y se ejecutó en un sistema de disolvente de hexano:isopropanol:ácido acético glacial (965:25:10, v/v/v), como fase móvil. Los efluentes se recogieron cada 0,5 min (0,65 ml por fracción) excepto cuando se indica. Los recuentos en los derivados de [^{14}C] acetato se determinaron por recuento de centelleo. La columna se calibró con [^{14}C] colesterol, [^3H] 25-hidroxicolesterol y [^{14}C] 27-hidroxicolesterol.

Determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR a tiempo real

Se aisló el ARN total con el kit de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI), que incluía tratamiento con DNasa. El ARN total, 2 μg , se usó para la síntesis de ADNc de primer hebra como se recomienda por el fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La RT-PCR a tiempo real se realizó usando un colorante adecuado como indicador en el sistema de PCR a tiempo real ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todos los conjuntos de cebador/sonda para la PCR a tiempo real fueron ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las amplificaciones de β -actina y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usaron como controles internos. La expresión relativa de ARN mensajero (ARNm) se cuantificó con el método del umbral de ciclo comparativo (Ct) y se expresó como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Las secuencias de los cebadores adecuados para la amplificación se describen, por ejemplo, en Ren et al., 2007 (1).

Análisis de transferencia de Western

Se aislaron las fracciones microsómicas como se describe previamente (4). Las proteínas extraídas microsómicas o totales de las células tratadas se separaron en un gel desnaturante de SDS al 7,5 %-poliacrilamida. Después de la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). Las membranas entonces se bloquearon a 25 °C durante 60 minutos en tampón de bloqueo [PBS, pH 7,4, TWEEN® 20 al 0,1 % (tensoactivo no iónico solubilizante de proteínas de membrana, $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$), leche en polvo desnatada al 5 %]. Las proteínas entonces se incubaron a 4 °C durante una noche con una IgG policlonal de conejo contra SREBP1, SREBP-2 o HMG-CoA reductasa humana. Después de lavar con PBS, pH 7,4, que contenía un 0,05 % de TWEEN® 20, se añadió conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo con peroxidasa de rábano rusticano, 1:2500, en solución de lavado y se incubó durante 60 minutos. Las bandas de proteínas se detectaron usando el kit Amersham ECL plus. Las bandas positivas se cuantificaron por el analizador de datos de imagen avanzado (Aida Inc., Straubenhardt, Alemania).

Estudios en animales

Los estudios en animales lo aprobó el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del McGuire Veterans Affairs Medical Center y se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki, la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y todas las regulaciones aplicables. Para examinar el efecto de 25HCDS sobre la acumulación de lípidos inducida por la alimentación en suero e hígado, ratones C57BL/6J hembra de 8 semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA) se alimentaron con una dieta alta en grasas (HFD) (Harlan Teklad, Madison, WI) que contenía un 42 % de kcal de grasas, un 43 % de kcal de carbohidratos, un 15 % de kcal de proteínas y un 0,2 % de colesterol durante 10 semanas. Todos los ratones se alojaron en condiciones idénticas en una instalación aséptica y se les dio acceso libre al agua y el alimento. Al final de cada periodo, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal solución de vehículo (etanol/PBS; vehículo) o 25HCDS (25 mg/kg) una vez cada tres días durante 6 semanas y se dejaron en ayunas durante una noche; y se recogieron muestras de sangre. Se midieron los triglicéridos en suero, el colesterol total, la lipoproteína de alta densidad, la glucosa, la fosfatasa alcalina (ALK), la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) usando técnicas enzimáticas convencionales en el laboratorio clínico en el McGuire Veterans Affairs Medical Center. Los perfiles de lipoproteínas en los sueros se analizaron por HPLC como se describe a continuación.

Cuantificación de lípidos hepáticos

Los tejidos hepáticos se homogeneizaron y se extrajeron los lípidos con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) y se filtraron. Los extractos, 0,2 ml, se evaporaron a sequedad y se disolvieron en 100 μl de isopropanol que contenía un 10 % de TRITON™ X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), un tensoactivo no iónico) para el ensayo de colesterol (Wako Chemicals USA, Richmond, VA), la solución de NEFA (0,5 g de EDTA- Na_2 , 2 g de TRITON™ X-100, 0,76 ml de NaOH 1 N y 0,5 g de azida sódica/1, pH 6,5) para el ensayo de ácidos grasos libres (Wako Chemicals USA, Richmond, VA) o isopropanol solamente para el ensayo de triglicéridos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, respectivamente. Cada concentración de lípidos se normalizó al peso del hígado.

respectivamente (tabla 2). Estos resultados son coherentes con los ensayos de función hepática que demostraron que 25HC3S suprime las respuestas inflamatorias de hígado, disminuyendo el daño hepático y la actividad fosfatasa alcalina en suero (datos no mostrados). De manera interesante, el 25HCDS aumentaba la expresión de PGC-1 α en 2 veces en el hígado. Por lo tanto, parece que el 25HCDS regula el metabolismo de los lípidos y las respuestas inflamatorias mediante la señalización de LXR, PPAR γ y PGC-1 α .

5

Tabla 1. Expresión relativa de ARNm hepático implicada en el metabolismo de los lípidos en los ratones alimentados con HFD con o sin 25HCDS

Nombre del gen	Descripción del gen	HFD (n = 6)	HFD + 25HCDS (n = 7)
Biosíntesis de ácidos grasos			
SREBP-1c	Proteína-1c de unión al elemento regulador de esterol	1,0 \pm 0,36	0,64 \pm 0,14 *
ACC1	Acetil-CoA carboxilasa 1	1,0 \pm 0,31	0,86 \pm 0,18
FAS	Ácido graso sintasa	1,0 \pm 0,27	0,68 \pm 0,17 *
Metabolismo de triglicéridos			
GPAM	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	1,0 \pm 0,10	0,74 \pm 0,18 *
MTTP	Proteína de transferencia de triglicéridos microsómicos	1,0 \pm 0,11	0,94 \pm 0,17
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos	1,0 \pm 0,3	0,68 \pm 0,21 *
Metabolismo del colesterol			
SREBP-2	Proteína-2 de unión al elemento regulador de esterol	1,0 \pm 0,18	1,12 \pm 0,25
HMGR	Hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa	1,0 \pm 0,16	0,84 \pm 0,07 *
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad	1,0 \pm 0,43	0,62 \pm 0,08 *
CD36	Receptor de trombospondina	1,0 \pm 0,52	0,69 \pm 0,29
Los animales se trataron como se describe anteriormente. Todos los valores se expresan como la media \pm DT; n = 6-7.			
* p < 0,05 en comparación con ratones HFD. Abreviaturas: HFD, dieta alta en grasas.			

10

Tabla 2. Expresión relativa de ARNm hepático implicada en las respuestas inflamatorias en los ratones alimentados con HFD con o sin 25HCDS

Nombre del gen	Descripción del gen	HFD (n = 6)	HFD + 25HCDS (n = 7)
PGC-1 α	Coactivador-1a del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	1,0 \pm 0,27	2,11 \pm 0,82*
PPAR α	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	1,0 \pm 0,42	1,27 \pm 0,52
I κ B α	Inhibidor a del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en linfocitos B	1,0 \pm 0,25	1,35 \pm 0,27 *
Nombre del gen			
Descripción del gen			
TNFV γ	Factor de necrosis tumoral a	1,0 \pm 0,28	0,50 \pm 0,21 **
IL1 α	Interleucina 1a	1,0 \pm 0,35	1,02 \pm 0,20
IL1 β	Interleucina 1b	1,0 \pm 0,21	0,64 \pm 0,16 **
Los animales se trataron como se describe anteriormente. Todos los valores se expresan como la media \pm DT; * p < 0,05, ** p < 0,01 en comparación con ratones HFD. Abreviaturas: HFD, dieta alta en grasas.			

DISCUSIÓN

- 15 El metabolismo del colesterol y los triglicéridos están muy asociados. Los receptores nucleares huérfanos son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de genes diana clave que son reguladores importantes de muchos eventos biológicos. Los receptores para ácidos grasos (PPAR), oxisteroles (LXR), ácidos retinoicos (RXR) y SREBP funcionan como detectores de los niveles celulares de lípidos, provocando cambios en la expresión génica para mantener la homeostasis de los lípidos y proteger las células de los daños por la acumulación de lípidos.
- 20 Sin embargo, la interacción entre las actividades de los receptores sigue siendo desconocida. Como se muestra en este documento, el metabolito de colesterol, 25HCDS, inhibe la expresión, procesamiento y actividad de SREBP-1c in vitro e in vivo y aumenta la expresión de PPAR γ y PGC-1 α . Está bien documentado que las SREBP controlan la biosíntesis de los lípidos, el PPAR γ regula las respuestas inflamatorias, y PGC-1 α controla la homeostasis de la energía. Por lo tanto, los resultados muestran que el 25HCDS es un potente regulador de estos procesos, y
- 25 desempeña una función importante en el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos hepáticos y las respuestas inflamatorias. La administración de 25HC3S aumenta los niveles de proteína PPAR γ nuclear y suprime las respuestas inflamatorias, pero aumenta solo ligeramente el ARNm de PPAR γ . Por el contrario, el 25HCDS aumenta significativamente la expresión del ARNm de PPAR γ y PGC-1 α , de una manera dependiente del tiempo y la concentración, lo que indica que 25HCDS es más potente que 25HC3S en la regulación del metabolismo de los lípidos
- 30 y las respuestas inflamatorias.

Las reacciones de biosíntesis de 25HCDS y sulfatación de oxisterol representan una novedosa ruta reguladora, que media la actividad de los receptores nucleares en hepatocitos. Los componentes clave de esta ruta se resumen del siguiente modo: **1)** cuando aumentan los niveles intracelular de colesterol, la proteína de liberación de colesterol mitocondrial, StAR, libera colesterol en la mitocondria, donde los oxisteroles reguladores, tales como 25HC, se sintetizan por CYP27A1. Estos oxisteroles, a su vez, activan LXR, y posteriormente regulan por incremento la expresión de sus genes diana implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Además, el 25HC activa LXR, regula por disminución la síntesis de colesterol recién sintetizado inhibiendo la expresión de HMGR y aumenta la secreción de colesterol mediada por ABCA1 desde las células (formación de HDL). **2)** 25HC3S y 25HCDS inactivan los LXR y suprimen el procesamiento de SREBP-1c, lo que indica que estos oxisteroles sulfatados disminuyen los niveles intracelulares de lípidos inhibiendo la síntesis; **3)** los efectos de 25HC sobre el metabolismo de los lípidos son opuestos a los de 25HC3S y 25HCDS. Por lo tanto, la sulfatación intracelular de oxisterol representa un novedoso mecanismo regulador implicado en el metabolismo de los lípidos y en el desarrollo de EHNA.

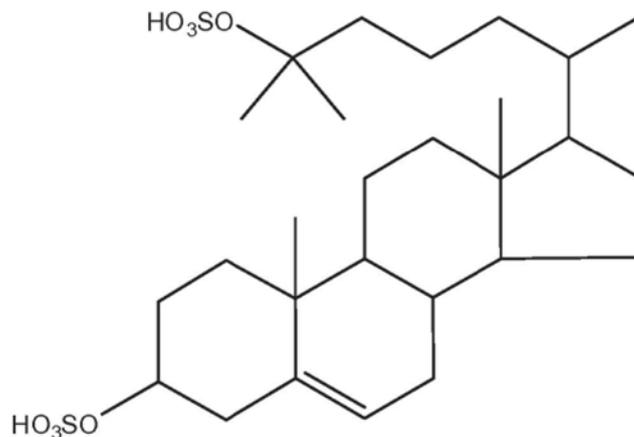
El tratamiento de modelos de EHNA de ratón con 25HCDS disminuyó los niveles hepáticos de lípidos. Se ha estudiado una gran cantidad de tratamientos para EHNA. Aunque puede parecer que mejoran los marcadores bioquímicos tales como los niveles de alanina transaminasa, la mayoría no han demostrado revertir las anomalías histológicas o reducir los criterios de valoración clínicos. El 25HCDS suprime las expresión génicas clave implicadas en la biosíntesis de los lípidos a nivel transcripcional mediante el bloqueo de la activación de los receptores nucleares LXR y las SREBP, que suprimen las citocinas proinflamatorias inducidas por HFD y controlan la homeostasis de la energía mediante PGC1a. Por lo tanto, el 25HCDS sirve como potente regulador para reducir los niveles hepáticos de lípidos de forma eficaz y, por consiguiente, representa un nuevo agente para el tratamiento de EHNA y otras enfermedades asociadas al metabolismo de los lípidos.

Bibliografía

1. Ren,S., Li,X., Rodriguez-Agudo,D., Gil,G., Hylemon,P., y Pandak,W.M. 2007. Sulfated oxysterol, 25HC3S, is a potent regulator of lipid metabolism in human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:802-808.
2. Ren,S., Hylemon, P., Zhang,Z.P., Rodriguez-Agudo,D., Marques,D., Li,X., Zhou,H., Gil,G., y Pandak,W.M. 2006. Identification of a novel sulfonated oxysterol, 5-cholesten-3beta, 25-diol 3-sulfonate, in hepatocyte nuclei and mitochondria. *J. Lipid Res.* 47:1081-1090.
3. Pandak,W.M., Ren,S., Marques,D., Hall,E., Redford,K., Mallonee,D., Bohdan,P., Heuman,D., Gil,G., y Hylemon,P. 2002. Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 277:48158-48164.
4. Ren,S., Hylemon,P., Marques,D., Hall,E., Redford,K., Gil,G., y Pandak,W.M. 2004. Effect of increasing the expression of cholesterol transporters (StAR, MLN64, and SCP-2) on bile acid synthesis. *J. Lipid Res.* 45:2123-2131.

REIVINDICACIONES

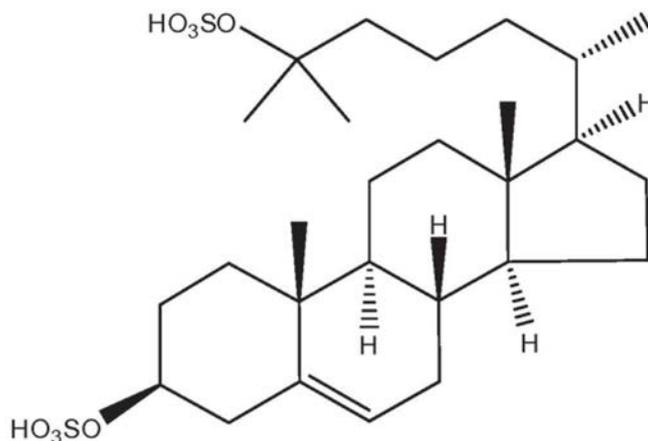
1. Un compuesto que es: (i) disulfato de 5-colesten-3,25-diol (25HCDS) de fórmula



5

o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de mismo; para su uso como medicamento.

10 2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto es



15

3. Un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2, para su uso en un método de: reducción de los lípidos en un sujeto que lo necesita; reducción de la biosíntesis de colesterol y lípidos en un sujeto que lo necesita; reducción de la inflamación en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la diabetes en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la hiperlipidemia en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la aterosclerosis en un sujeto que lo necesita; tratamiento de la esteatosis hepática en un sujeto que lo necesita; o tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto que lo necesita.

20

4. El compuesto para su uso como se define en la reivindicación 3, comprendiendo el método:

25

- administrar el compuesto en una cantidad que varía de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg basada en la masa corporal del sujeto, o administrar el compuesto en una cantidad que varía de 1 mg/kg a 10 mg/kg, basada en la masa corporal del sujeto; y/o
- administrar el compuesto por al menos una de administración oral, administración entérica, administración sublingual, administración transdérmica, administración intravenosa, administración peritoneal, administración parenteral, administración por inyección, inyección subcutánea e inyección intramuscular.

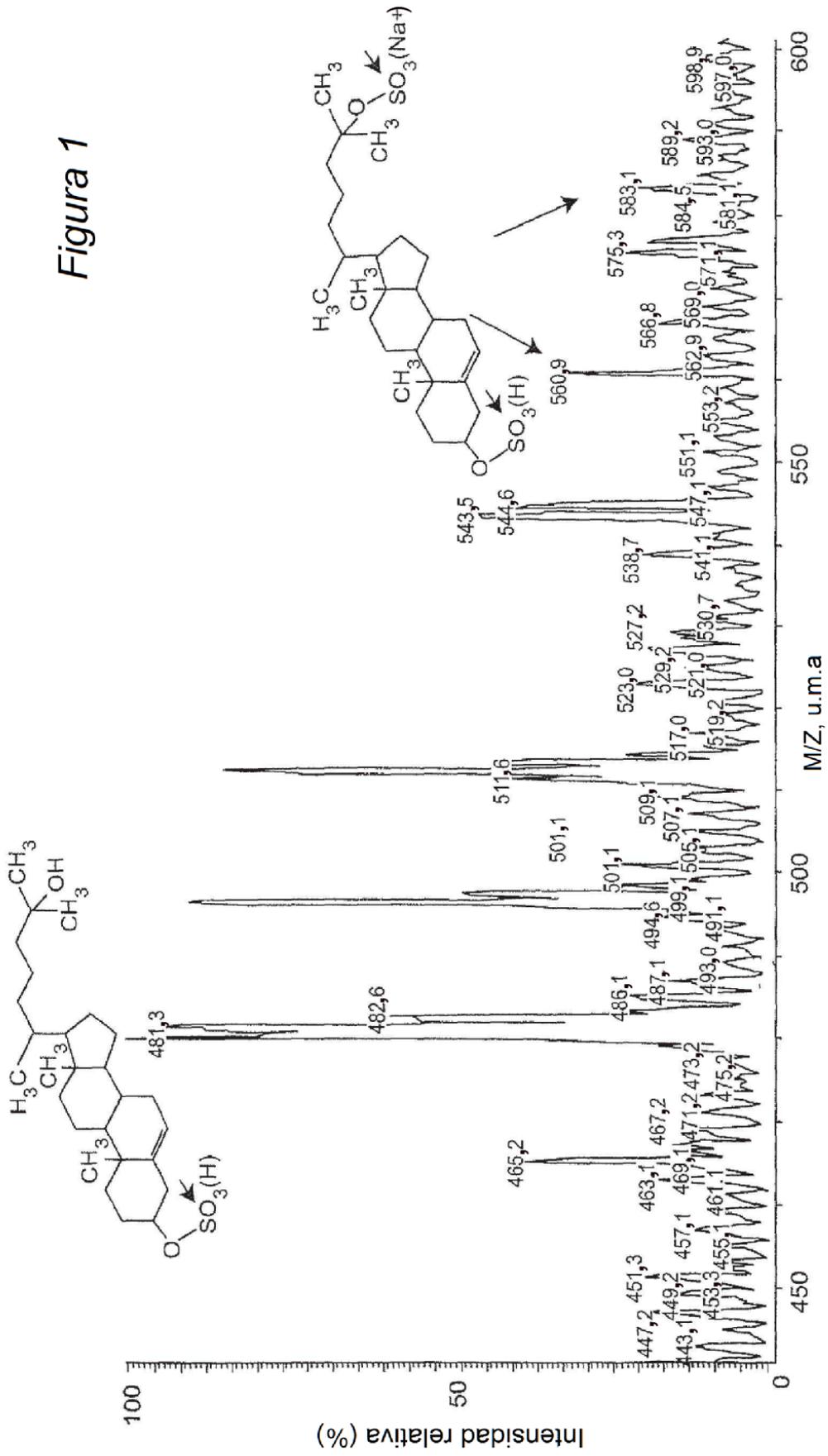
30

5. Un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, que es un compuesto aislado.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, que es sustancialmente puro.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que está en forma sólida.
- 5 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, que está:
- en forma de polvo; y/o
 - en forma liofilizada.
- 10 10. Una composición farmacéutica que comprende: (a) un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2; y (ii) un excipiente, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición se formula en forma de dosificación unitaria.
- 15 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que:
- la composición está en forma sólida; o
 - la composición está en forma sólida y la composición está en forma de un polvo, un comprimido, una cápsula o una pastilla para chupar; o
 - la composición en forma sólida y la composición comprenden el compuesto en forma liofilizada junto con un agente espesante, estando opcionalmente la composición en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa.
- 20
- 25 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprenden un vehículo que es líquido, y opcionalmente en la que:
- el compuesto se solubiliza en dicho líquido o se dispersa en dicho líquido; y/o
 - dicho líquido es acuoso; y/o
 - dicho líquido es agua estéril para inyecciones o solución salina tamponada con fosfato; y/o
 - dicha composición está en un vial precintado, en una ampolla, en una jeringa o en una bolsa.
- 30
14. Un proceso de producción de un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2, comprendiendo dicho proceso hacer reaccionar 25-hidroxicolesterol con una fuente de trióxido de azufre y, opcionalmente, formar una sal farmacéuticamente aceptable a partir del disulfato de 5-colesten-3,25-diol, (25HCDS) resultante, en el que la fuente de trióxido de azufre es opcionalmente un complejo de amina de trióxido de azufre.
- 35
15. Un proceso de producción de una composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, comprendiendo dicho proceso combinar dicho compuesto con dicho excipiente, diluyente o
- 40 vehículo fisiológicamente aceptable.

Figura 1



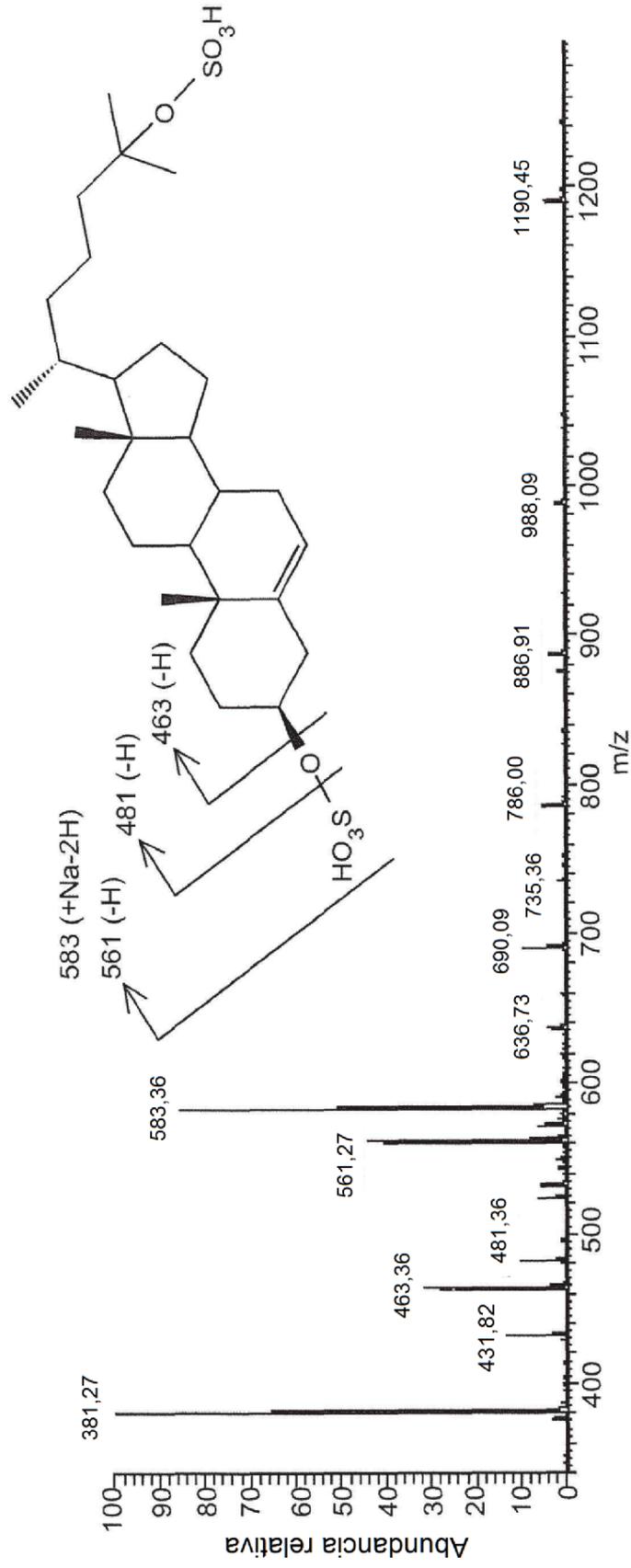
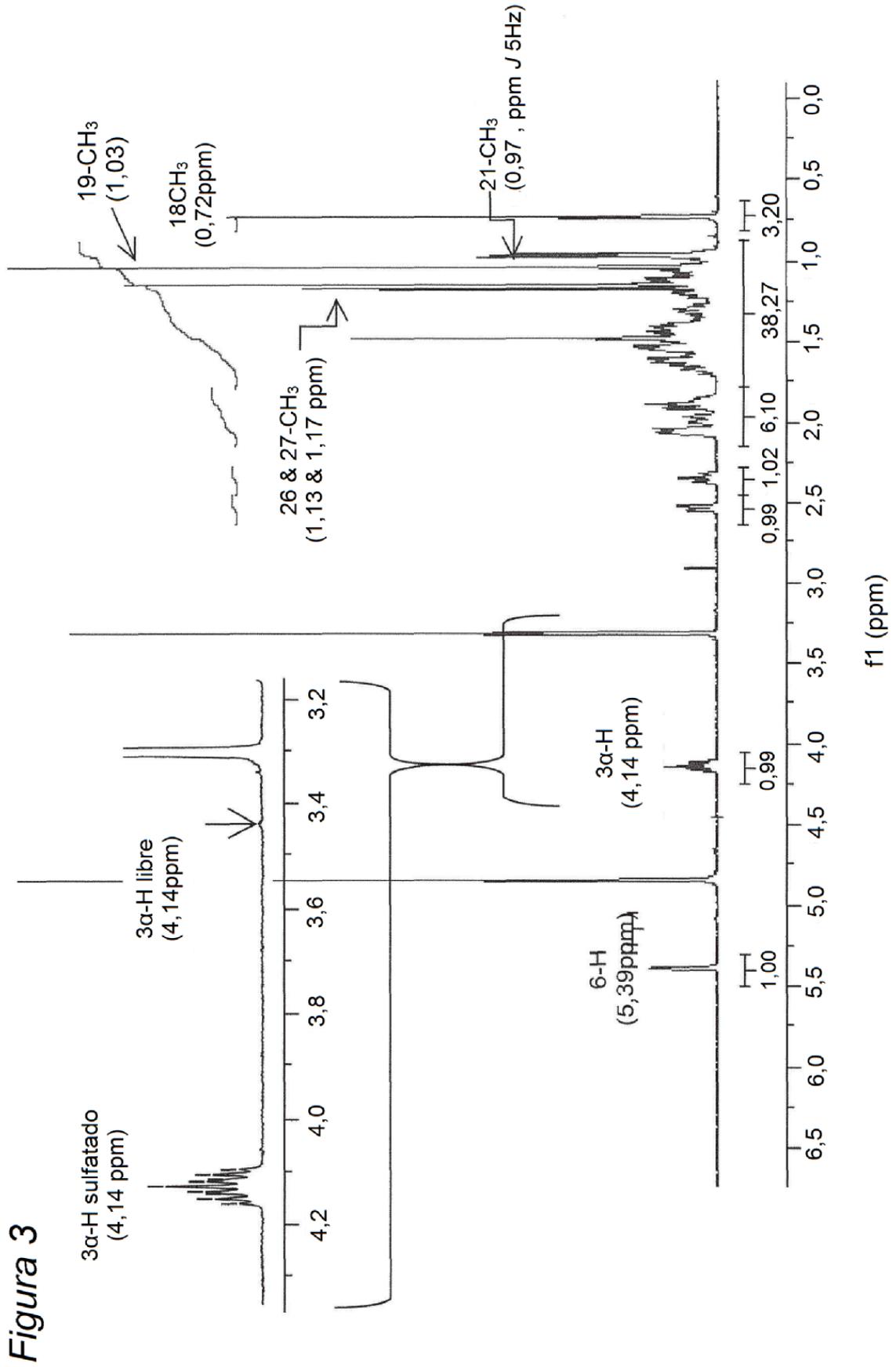


Figura 2



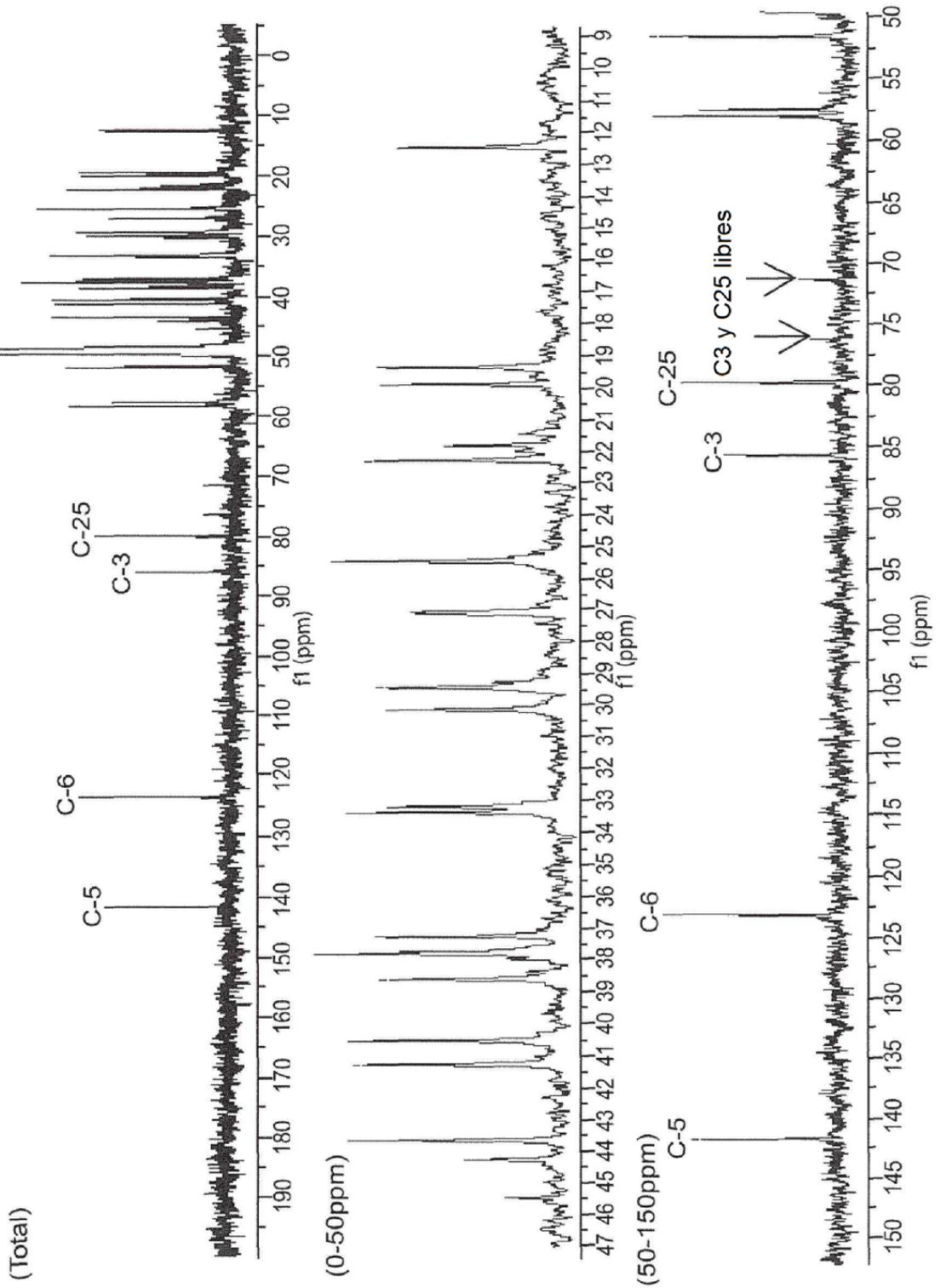


Figura 4

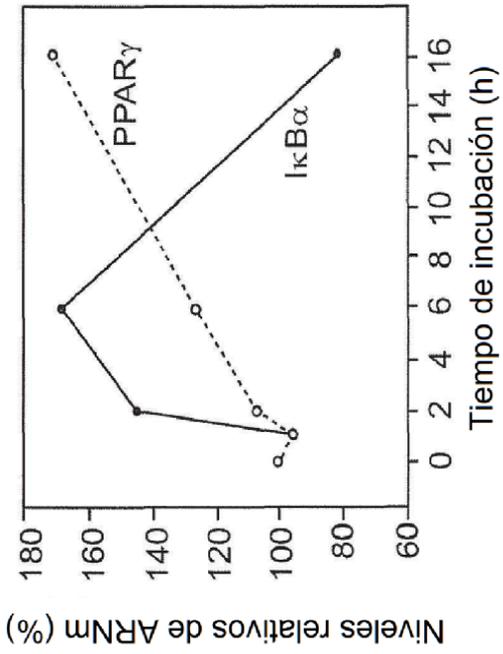


Figura 5C

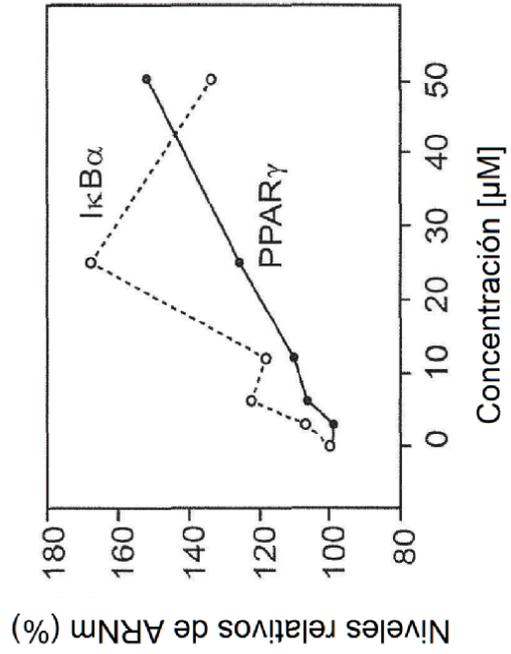


Figura 5D

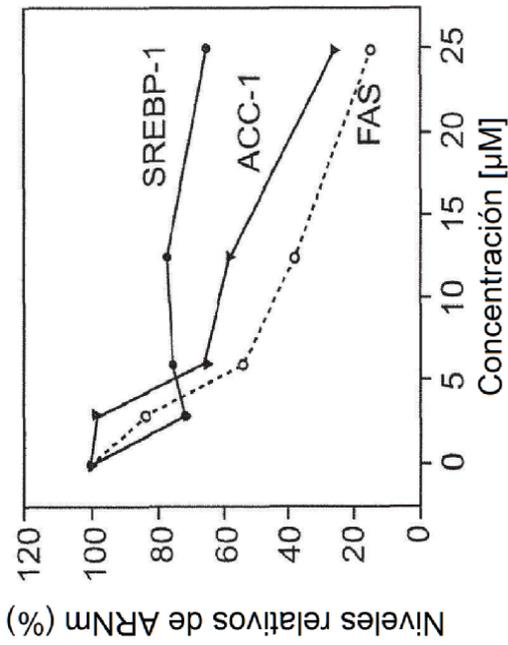


Figura 5A

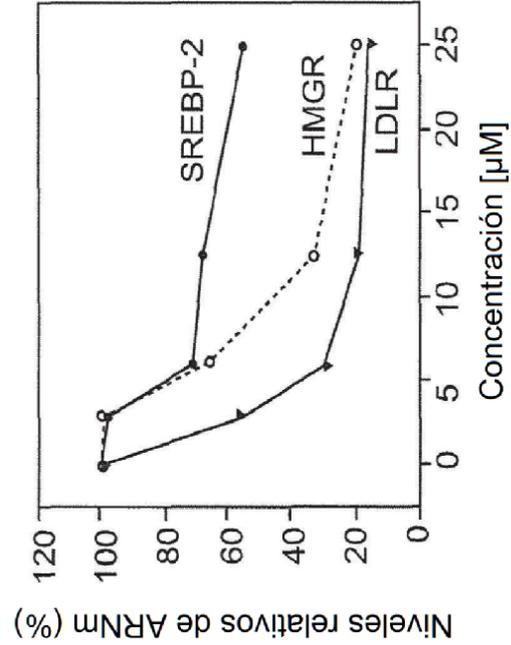


Figura 5B

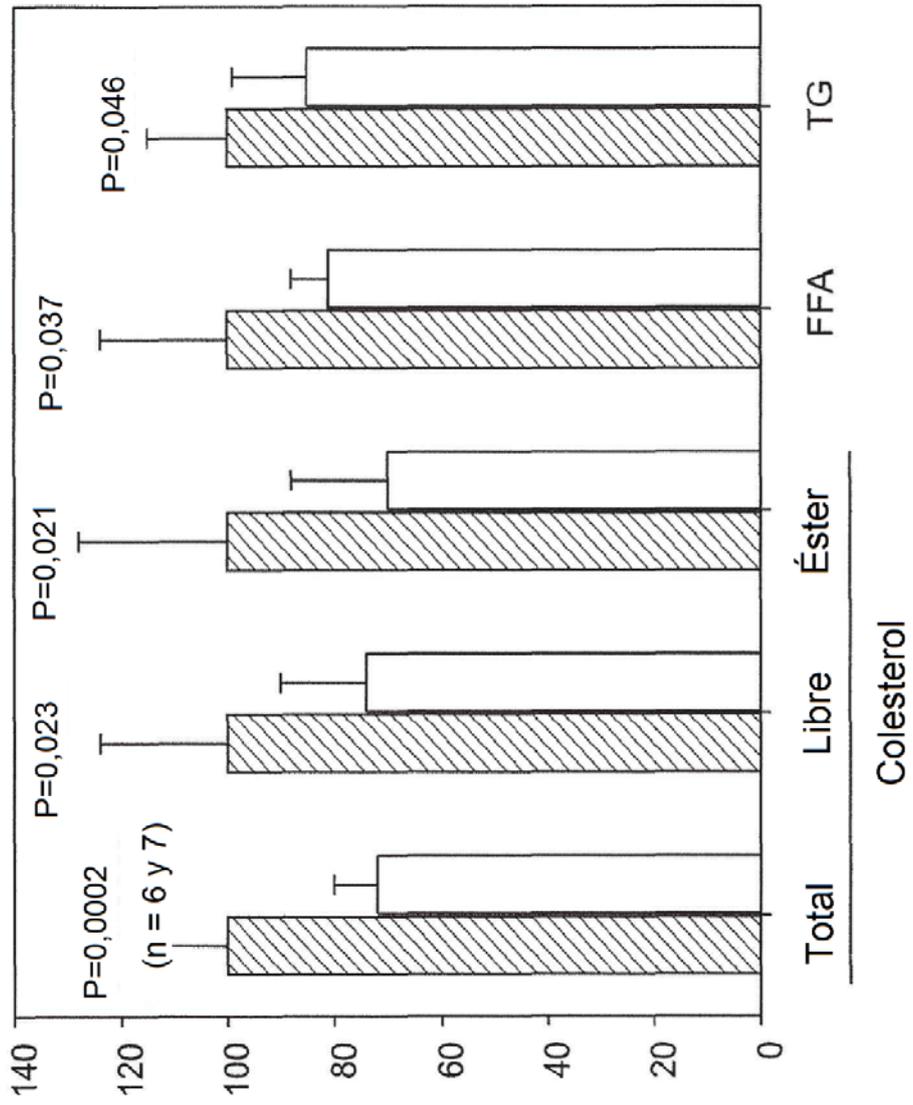


Figura 6