

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 489**

51 Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2008 PCT/EP2008/059704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2009 WO09013334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008 E 08775321 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2182954**

54 Título: **Uso de ácidos nor-biliares en el tratamiento de arteriosclerosis**

30 Prioridad:

25.07.2007 US 951728 P
25.07.2007 EP 07113107

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TAREK, MOUSTAFA;
TRAUNER, MICHAEL y
FICKERT, PETER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 709 489 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de ácidos nor-biliares en el tratamiento de arteriosclerosis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis. En particular, la invención se refiere a ácido nor-ursodesoxicólico para su uso en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

10 **Antecedentes de la invención**

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos, elementos fibrosos y células en las arterias grandes, lo que puede conducir en última instancia a la formación de placas ateroscleróticas.

15 La formación de placas en la aterosclerosis tiene dos implicaciones. En primer lugar, las placas ateromatosas pueden a la larga romperse y conducir a estenosis de la arteria y, por tanto, a un suministro insuficiente de sangre en el órgano que lo necesita. Las consecuencias pueden ser, por ejemplo, un infarto de diversos órganos, de la manera más importante del corazón (infarto de miocardio) y el cerebro (accidente cerebrovascular). En segundo lugar, el proceso de agrandamiento de la arteria, que es una respuesta a la formación de placas, puede volverse
20 excesivo y dar como resultado un aneurisma.

Se sabe que la aterosclerosis es un caso de un tipo de enfermedad comúnmente denominada arteriosclerosis, es decir, el endurecimiento de las arterias como resultado de deposiciones de lípidos, colágeno y otros elementos fibrosos. Otro subtipo del estado general, arteriosclerosis, es la enfermedad arteriolosclerosis en la que se observa
25 un endurecimiento de las arterias pequeñas como resultado de, entre otros, deposición de colágeno, engrosamiento de la pared muscular y deposición de proteínas.

La arteriosclerosis y particularmente la aterosclerosis son una de las principales causas de muerte, al menos en el hemisferio occidental. En Europa Occidental y los Estados Unidos, se reconoce como la enfermedad más común y
30 más letal aparte del cáncer. Los mecanismos patológicos que subyacen a la arteriosclerosis y particularmente a la aterosclerosis han sido el foco de una investigación intensa a lo largo de las últimas décadas, y se revisan constantemente en diversas publicaciones. Pueden encontrarse descripciones generales representativas sobre la comprensión actual de los mecanismos moleculares que subyacen y contribuyen a la aterosclerosis, por ejemplo, en Libby *et. al.* (Nature, 2002, 420, 868-874), Lusis *et. al.* (Nature, 2000, 407, 233-241) y Ross *et. al.* (New England
35 Journal of Medicine, 1999, 340(2) 115-126).

El tratamiento y/o la prevención de la aterosclerosis, al ser el ejemplo más prominente de arteriosclerosis, incluyen evitar factores de riesgo ambientales y tratamientos médicos.

40 Los factores de riesgo típicos para la aterosclerosis incluyen niveles altos de colesterol en la sangre, tensión arterial alta, diabetes, obesidad e inactividad física.

Además, se ha sugerido recientemente (véase, por ejemplo, Targher G. et Arcaro G. en Atherosclerosis, 2007, 191, 235-240) que la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) está probablemente asociada con riesgo de
45 enfermedad cardiovascular (ECV) aumentado que surge de la posibilidad de que EHGNA pueda ser un mediador temprano de aterosclerosis. EHGNA está presente en hasta un tercio de la población general y en la mayoría de los pacientes con factores de riesgo cardiometabólicos. Parece que la gravedad de la histología hepática en pacientes con EHGNA está estrechamente asociada con marcadores de aterosclerosis temprana.

50 Por tanto, parece que EHGNA representa otro factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis.

Estos factores de riesgo pueden abordarse mediante un estilo de vida diferente, que incluye una modificación de la dieta, un aumento de la actividad deportiva y una reducción del consumo de tabaco.

55 La segunda línea de tratamiento para la aterosclerosis incluye el uso de medicamentos, siendo el tratamiento con estatinas el más destacado. Las estatinas tienen como objetivo principalmente reducir los niveles elevados de colesterol en sangre y, por tanto, tienen un efecto más bien profiláctico. La mayoría de las estatinas disponibles en la actualidad no son adecuadas, por ejemplo, para reducir las lesiones y/o placas ateroscleróticas.

60 Además, algunos de los medicamentos que se usan actualmente para el tratamiento de la aterosclerosis tienen efectos secundarios considerables.

El documento WO 2007/061820 titulado "Dissolution of arterial cholesterol plaques by a class of pharmacological compounds" se refiere, entre otros, a una sustancia farmacológica, concretamente una sal biliar o ácido o precursor
65 o derivado con propiedades emulsionantes administrada a la circulación sistémica de un paciente por medio de una variedad de vías de administración incluyendo administración oral.

Existe, por tanto, la necesidad continua de fármacos que puedan usarse en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y particularmente de aterosclerosis.

- 5 Además, con respecto a la correlación de factores de riesgo (particularmente EHGNA) y aterosclerosis, existe la necesidad de fármacos que puedan usarse en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y particularmente aterosclerosis y al mismo tiempo en el tratamiento y/o la prevención de dichos factores de riesgo (particularmente EHGNA).

10 **Sumario de la invención**

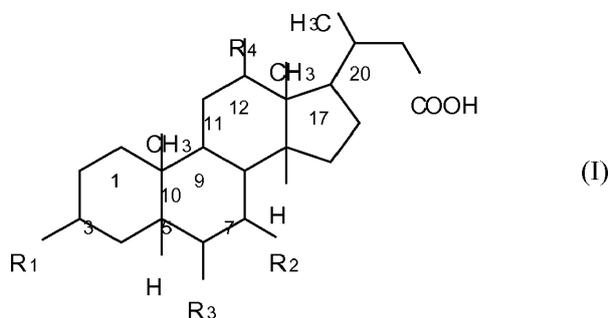
El objetivo de la presente invención es proporcionar ácido nor-ursodesoxicólico y/o al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de arteriosclerosis y particularmente aterosclerosis tal como se reivindica en la reivindicación independiente 1.

- 15 Según la divulgación, un aspecto se refiere a al menos un ácido nor-biliar y/o al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

- 20 Según la divulgación, un aspecto se refiere a composiciones farmacéuticas que comprende al menos un ácido nor-biliar y/o al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

- 25 Según la divulgación, un aspecto se refiere al uso de al menos un ácido nor-biliar y/o al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

- 30 Según la divulgación, un aspecto se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de arteriosclerosis en un sujeto humano o animal que comprende la etapa de administrar al menos un ácido nor-biliar y/o al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, los ácidos nor-biliares pueden tener la siguiente fórmula (I):



35 siendo R₁ -OH o -H,

siendo R₂ -OH o -H,

siendo R₃ - OH o -H, y

- 40 siendo R₄ - OH o -H,

en la que los grupos OH de R₁, R₂, R₃ o R₄ están en conformación α o β.

- 45 Según la divulgación en un aspecto, el ácido nor-biliar se selecciona del grupo que consiste en: ácido 24-nor[3α, 7α-dihidroxi-5β-colan-23-oico] (que también se designa ácido nor-quenodesoxicólico), ácido 24-nor[3α, 7β-dihidroxi-5β-colan-23-oico] (que también se designa ácido nor-ursodesoxicólico (nor-UDCA), ácido 24-nor[3α, 12α-dihidroxi-5β-colan-23-oico] (que también se designa ácido nor-desoxicólico, ácido 24-nor[3α-hidroxi-5β-colan-23-oico] (que también se designa ácido nor-litocólico), ácido 24-nor[3α, 7α, 12α-trihidroxi-5β-colan-23-oico] (que también se designa ácido nor-cólico), ácido 24-nor[3α, 12β-dihidroxi-5β-colan-23-oico] y ácido 24-nor[3α, 6β-dihidroxi-5β-colan-23-oico].

La numeración se basa en los números proporcionados para la fórmula (I).

- 55 Según la invención el al menos un ácido nor-biliar es ácido nor-ursodesoxicólico, es decir nor-UDCA. Se considerará usar de aproximadamente 10 a aproximadamente 8.000 mg, de aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000 mg,

de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mg o de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg de al menos nor-UDCA o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo para las composiciones farmacéuticas, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis tal como se mencionó anteriormente.

5 El tratamiento y/o la prevención de aterosclerosis constituyen una realización preferida del cuadro de la enfermedad resumido por el término arteriosclerosis en el contexto de la presente invención.

10 Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden nor-UDCA y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento y/o la prevención de aterosclerosis. Otra realización particularmente preferida se refiere al uso de nor-UDCA y al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de aterosclerosis.

15 Puede aplicarse nor-UDCA y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo en las cantidades mencionadas anteriormente.

20 Según la invención, se formula nor-UDCA en una forma de dosificación oral. Se considerará usar de aproximadamente 10 a aproximadamente 8.000 mg, de aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mg o de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg de nor-UDCA o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo para las composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis tal como se mencionó anteriormente.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Configuración experimental para los datos de los estudios de tratamiento descritos en el experimento 1 y tal como se muestra en las figuras 2 y 3.

30 Figura 2: Nor-UDCA reduce la aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} en un estudio de tratamiento.

A): análisis histológico de secciones de aorta teñidas con aceite rojo de ratones ApoE^{-/-} criados con una dieta de comida occidental (el 21% p/p de grasa, el 1,5% p/p de colesterol). B): análisis histológico de secciones de aorta teñidas con aceite rojo de ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta de comida occidental que contiene el 0,5% p/p de nor-UDCA. Las flechas indican regiones de tamaño reducido de placa.

35 Figura 3: Nor-UDCA reduce la aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} en un estudio de tratamiento, análisis morfométrico del área esclerótica en ratones ApoE^{-/-} que se alimentaron con una dieta de comida occidental durante 8 semanas más 4 semanas o bien sin nor-UDCA (12 semanas en total) (barra izquierda) o bien con el 0,5% p/p de nor-UDCA (barra derecha).

40 Figura 4: Configuración experimental para los datos del estudio de tratamiento descrito en el ejemplo 2 y tal como se representa en la figura 5.

45 Figura 5: Nor-UDCA reduce la aterosclerosis en ratones LDLR^{-/-} en un estudio de tratamiento.

A): análisis histológico (*en face*) en arterias de ratones LDLR^{-/-}. La aorta de los ratones LDLR^{-/-} se cortó longitudinalmente y posteriormente se teñó *en face* con aceite rojo. Las imágenes muestran la aorta teñida con aceite rojo *en face* de ratones LDLR^{-/-} alimentados con una dieta de comida occidental. bB): muestra aortas de ratones LDLR^{-/-} alimentados con una dieta de comida occidental y el 0,5% p/p de nor-UDCA (el aumento para el panel superior e inferior es de 40 veces). Las flechas indican regiones de tamaño reducido de placa.

50 Figura 6: configuración experimental para los datos de estudios de tratamiento descritos en el experimento 3 y tal como se representa en las figuras 7 a 13.

55 Figura 7: Nor-UDCA reduce el número de granulocitos neutrófilos hepáticos en un estudio de tratamiento.

Parte superior: análisis inmunohistoquímico para el número de células positivas para CD11b (correspondientes a granulocitos neutrófilos) en preparaciones hepáticas; parte inferior: análisis cuantitativo de células positivas para CD11b en el hígado mediante recuento de dichas células en 5 ratones de cada grupo.

60 Figura 8: Nor-UDCA reduce los niveles de p-JNK en el hígado en un estudio de tratamiento.

65 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de diferentes homogeneizados hepáticos tal como se indica a partir de o bien ratones ApoE^{-/-} alimentados normalmente, ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta occidental, ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta occidental y UDCA o ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta occidental y nor-UDCA (véase también la figura 6) para p-JNK.

Figura 9: Nor-UDCA reduce los niveles de triglicéridos hepáticos en un estudio de tratamiento

5 Se determinaron los niveles de triglicéridos hepáticos para 5 ratones de cada grupo tal como se explica resumidamente en la figura 6.

Figura 10: Nor-UDCA reduce ligeramente los niveles de ALT en un estudio de tratamiento.

10 Se determinaron los niveles de alanina-amino-transferasa en suero para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental sólo y para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental que comprende además nor-UDCA.

Figura 11: Nor-UDCA reduce ligeramente los niveles de colesterol en suero en un estudio de tratamiento.

15 Se determinaron los niveles de colesterol en suero para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental sólo y para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental que comprende además nor-UDCA.

Figura 12: Nor-UDCA reduce las placas en el arco aórtico en un estudio de tratamiento.

20 Se tiñeron *en face* secciones longitudinales de la aorta con aceite rojo y se determinó el área que comprende placas y se expresó como % de placas del área total. Se realizó el análisis para 5 ratones en cada grupo tal como se representa.

25 Figura 13: Nor-UDCA reduce las placas en la válvula aórtica en un estudio de tratamiento. Se tiñeron secciones transversales de la válvula aórtica con aceite rojo y se determinó el área que comprende placas y se expresó como % de placas del área de superficie total. Se realizó el análisis para 5 ratones en cada grupo tal como se representa.

Figura 14: configuración experimental para los datos de estudios de prevención descritos en el experimento 4 y tal como se representa en las figuras 15 a 20.

30 A: configuración experimental; B: pesos corporales de ratones de los tres grupos diferentes a lo largo de las semanas de tratamiento.

Figura 15: Nor-UDCA reduce los niveles de triglicéridos hepáticos en un estudio de prevención.

35 Parte superior: Preparaciones histológicas del hígado de ratones de grupos tal como se indica en las que se tiñeron ácidos grasos neutros con aceite rojo; parte inferior: se determinaron los niveles de triglicéridos hepáticos para 5 ratones de cada grupo tal como se señala en figura 14.

Figura 16: Nor-UDCA reduce los niveles de ALT en un estudio de prevención.

40 Parte superior: Preparaciones histológicas del hígado de ratones de grupos tal como se indica en las que se tiñeron núcleos celulares y citosol con H&E; parte inferior: se determinaron los niveles de alanina-amino-transferasa en suero para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental solamente, para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental que comprende además nor-UDCA y para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental que comprende además UDCA.

50 Figura 17: Nor-UDCA no parece reducir los niveles de colesterol en suero en un estudio de prevención. Los niveles de colesterol en suero se determinaron para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental sólo y para 5 ratones del grupo alimentado con dieta occidental que comprende además nor-UDCA.

Figura 18: Nor-UDCA reduce la cantidad de tejido adiposo blanco en un estudio de prevención. Se determinaron los pesos de o bien el tejido adiposo marrón (BAT) o bien el tejido adiposo blanco (WAT) para 5 ratones de cada grupo y se representan como peso de grasa en gramos.

55 Figura 19: Nor-UDCA reduce UDCA reduce las placas en la aorta en un estudio de prevención. Se tiñeron *en face* secciones longitudinales de la aorta con aceite rojo para el grupo de control (a) y para el grupo alimentado además con nor-UDCA para prevención (b). Además, se determinó el área que comprende placas y se expresó como % de placas del área total. Se realizó el análisis para 10 ratones en cada grupo tal como se representa.

60 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que puede usarse ácido nor-ursodeoxicólico y/o sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

65 En el contexto de la presente divulgación, debe entenderse que el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis pueden comprender el tratamiento y/o la prevención de factores de riesgo para la arteriosclerosis y también

particularmente aterosclerosis. En este aspecto, se prefiere el tratamiento y/o la prevención de EHGNA como factor de riesgo.

5 Antes de que algunas de las realizaciones de la presente invención se describan con más detalle, se introducen las siguientes definiciones.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares de “un” y “una” también incluyen los respectivos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

10 Los términos “sobre” y “aproximadamente” en el contexto de la presente invención, indican generalmente un nivel o intervalo de exactitud que un experto en la técnica entenderá que todavía garantiza el efecto técnico de la característica en cuestión. Respecto a valores numéricos, estos términos indican normalmente una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$ y preferiblemente de $\pm 5\%$.

15 Debe entenderse que el término “que comprende” no es limitativo. Para los fines de la presente invención, el término “que consiste en” se considera que es una realización preferida del término “compuesto por”. Si a continuación en el presente documento se define que un grupo comprende al menos un número determinado de realizaciones, esto también significa dar a conocer un grupo, que consiste preferiblemente en estas realizaciones únicamente.

20 De manera similar, si en el contexto de la presente invención, se menciona que un grupo comprende “al menos una” realización, también significa dar a conocer un grupo, que preferiblemente consiste en la única realización que se menciona específicamente.

Se proporcionarán definiciones adicionales de términos en el contexto de las cuales se usan estos términos.

25 Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se basa en el hallazgo de que puede usarse al menos ácido nor-ursodesoxicólico y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

30 El término “sal farmacéutica aceptable” tal como se usa en el presente documento, incluye sales de adición de ácido así como sales de adición de base.

35 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales elaboradas a partir de ácidos inorgánicos tales como la sal de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, nitrato. Las sales de adición de ácido también pueden incluir sales de ácidos orgánicos tales como la sal de citrato, oxalato, isonicotinato, lactato, salicilato, tartrato, oleato, fumarato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucoronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, aspartato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y parmoato.

40 Otros ácidos orgánicos que incluyen clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos a partir de los cuales pueden elaborarse sales de ácidos nor-biliares farmacéuticamente aceptables incluyen ácido propiónico, glicólico, pirúvico, antranílico, mandélico, mesílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, 2-hidroxietanosulfónico, algínico, sulfanílico, esteárico, p-hidroxibutírico, ciclohexilaminosulfónico, galactárico y galacturónico y similares.

45 Las bases adecuadas para formación de sales de adición de base incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales tales como aluminio y zinc, amoniaco y aminos orgánicas tales como mono, di o trialquilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxilo; dicitlohexilamina; tributilamina; piridina; N-metil, N-etilamina; dietilamina, trietilamina; mono-, bis- o tris-(2-hidroxialquil inferior-aminas) tales como mono-, bis- o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxiterc-butilamina o tris-(hidroximetil)metilamina; N,N-di-alkil inferior-N(hidroxialquil inferior)-aminas tales como N,N-dimetil-N(2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina y N-metil-D-glucamina. Otras bases, que pueden usarse para formar sales de adición de base son, por ejemplo, aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

55 En el contexto de la presente invención, el término “ésteres farmacéuticamente aceptables” son ésteres no tóxicos de ácidos nor-biliares tal como se mencionó anteriormente y preferiblemente ésteres alquílicos tales como ésteres metílico, etílico, propílico, isopropílico, butílico, isobutílico o pentílico, así como ésteres arílicos. La esterificación de ácidos carboxílicos tales como nor-UDCA puede realizarse mediante procedimientos, tal como se conoce comúnmente en la técnica. Los ésteres típicos de nor-UDCA comprenden, por ejemplo, un éster acetatometílico de nor-UDCA (ID de sustancia de PubChem (SID) 10543236) o un éster trimetilsililetermetílico de nor-UDCA (SID de PubChem 10492328). La base de datos pública de PubChem puede encontrarse en <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

65 El término “derivado farmacéuticamente aceptable” se refiere a los ésteres de taurina y glicina de ácidos nor-biliares tales como nor-UDCA. Otros derivados de ácidos nor-biliares incluyen las formas de sulfato o glucorónido de ácidos

nor-biliares, tales como nor-UDCA.

En el contexto de la presente invención, las sales, ésteres y/o derivados farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente se refieren a nor-UDCA. Nor-UDCA puede administrarse preferiblemente como ácido libre.

Nor-UDCA y/o una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo puede usarse en una cantidad de 10 a 8.000 mg, de 25 a 5.000 mg, de 50 a 1.500 mg o de 250 a 500 mg.

Respecto a pacientes humanos, pueden administrarse nor-UDCA y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo a un paciente en una cantidad de aproximadamente 25 mg a 5.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2.500 mg al día. Un paciente humano puede tratarse en particular con de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1.500 mg y más específicamente con de aproximadamente 1.000 mg al día de nor-UDCA y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otro criterio adecuado para seleccionar una cantidad apropiada de nor-UDCA y/o de una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo es que pueden administrarse nor-UDCA y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo a un individuo en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg/d, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/kg/d, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mg/kg/d y en particular en una cantidad de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/kg/d.

Estas cantidades pueden administrarse de una vez o como múltiples dosis (al menos 2, 3, 4, 5 ó 10 dosis) al día.

El término "arteriosclerosis" se usa en el contexto de la presente invención por su significado habitual, es decir, estados que implican el endurecimiento de las arterias.

Un estado específico que se encuentra bajo la definición común "arteriosclerosis" es el tratamiento y/o la prevención de arteriolosclerosis, que se refiere a estados en los que se ven afectados las arterias pequeñas. El término "arteriolosclerosis" también se usa tal como se aplica comúnmente en la técnica.

La invención se refiere a la aplicación de nor-UDCA y/o sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo en el tratamiento de aterosclerosis.

El término "aterosclerosis" se usa en el contexto de la presente invención teniendo el mismo significado que se usa comúnmente en la técnica. Por tanto, el término "aterosclerosis" describe la serie completa de etapas que incluyen la deposición de lípidos, glóbulos blancos tales como leucocitos, monocitos y macrófagos en arterias, lo que conduce en última instancia a formaciones de placas ateromatosas en las paredes de los vasos de las arterias.

Los términos "tratamiento de arteriosclerosis" y preferiblemente "aterosclerosis" indican que puede mejorarse la arteriosclerosis y/o aterosclerosis existentes mediante la aplicación de nor-UDCA y/o sales, ésteres o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo. Mejora en el contexto de la presente invención puede significar que, por ejemplo, se reduce el tamaño y/o la frecuencia de placas ateromatosas. Las mejoras también pueden referirse a una reducción de granulocitos neutrófilos hepáticos, una reducción de niveles de triglicéridos hepáticos, una reducción de niveles de colesterol en suero y una reducción de tejido adiposo blanco.

Los términos "tratamiento de arteriosclerosis" y preferiblemente "aterosclerosis" también se refieren a una mejora de manifestaciones clave de los mismos tales como arteriopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.

Los términos "prevención de arteriosclerosis" y preferiblemente "de aterosclerosis" significan que la administración de nor-UDCA y/o sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo reduce la probabilidad de desarrollo de estos estados o al menos alivia el grado y/o la frecuencia con la que estas enfermedades se desarrollan.

Los términos "prevención de arteriosclerosis" y preferiblemente "de aterosclerosis" también significan que la administración de nor-UDCA y/o sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo reduce la probabilidad de desarrollo de manifestaciones clave de los mismos tales como arteriopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.

Tal como se estableció anteriormente, la divulgación también se refiere al tratamiento y/o la prevención de factores de riesgo para la arteriosclerosis. En un aspecto, la divulgación se refiere al tratamiento y/o la prevención de EHGNA como factor de riesgo.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y particularmente aterosclerosis en combinación con el tratamiento y/o la prevención de EHGNA mediante una única clase de compuestos, concretamente ácidos nor-biliares prefiriéndose nor-UDCA. Por tanto, la EHGNA y

aterosclerosis pueden tratarse mediante una única clase de compuestos, preferiblemente mediante nor-UDCA.

El término “EHGNA” se usa en el contexto de la presente divulgación con su significado habitual, es decir, la esteatosis hepática no alcohólica con un amplio espectro de manifestaciones y estados clínicos y patológicos tales como obesidad abdominal, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, hipertensión y dislipidemia.

El término “tratamiento de EHGNA” indica que parámetros de EHGNA tales como altas concentraciones de ácidos grasos en el hígado (por ejemplo, triglicéridos) o altos niveles de transaminasa en suero (por ejemplo, alanina-amino-transferasa) mejoran mediante la aplicación de ácidos nor-biliares y/o sales, ésteres y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos y preferiblemente de nor-UDCA y/o sales, ésteres y derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

El término “prevención de EHGNA” significa que la probabilidad de desarrollo de manifestaciones típicas de EHGNA tal como se estableció anteriormente se reduce mediante la administración de ácidos nor-biliares y/o sales, ésteres y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos y preferiblemente de nor-UDCA y/o sales, ésteres y derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

Con el fin de determinar si se logra una mejora en, por ejemplo, aterosclerosis o un efecto preventivo en la aterosclerosis mediante la aplicación de nor-UDCA y/o sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo, se hará una comparación con un control que puede, por ejemplo, ser un sujeto humano para el que el diagnóstico indica que no padece, por ejemplo, aterosclerosis. En una realización preferida, los efectos mejorados durante el tratamiento y/o el efecto preventivo mejorado se determinarán con respecto a un grupo de control que está bajo tratamiento médico con uno de los medicamentos que se usan en la actualidad, por ejemplo, para el tratamiento de aterosclerosis tales como estatinas.

Con el fin de determinar, por ejemplo, si se ha visto afectada la formación de placas en la aterosclerosis mediante la aplicación de nor-UDCA y/o sales y ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo, uno puede basarse en los métodos de diagnóstico comunes conocidos en la técnica, tales como por ejemplo exámenes histopatológicos.

Los medicamentos o formas de dosificación farmacéuticas que comprenden al menos nor-UDCA y o al menos una sal y éster farmacéuticamente aceptables del mismo se formulan para aplicación oral.

Las formas de dosificación farmacéuticas pueden ser formas de dosificación sólidas o líquidas o pueden tener un carácter intermedio, por ejemplo, de tipo gel según la vía de administración y otros objetivos.

Según la invención, se usan formas de dosificación oral, en las que la forma de dosificación oral es una forma de dosificación de liberación controlada que libera al menos nor-UDCA y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo sólo después de que la forma de dosificación oral haya alcanzado el estómago o el tubo digestivo. Se usan formas de dosificación orales en vista de la aceptación global de los pacientes de este tipo de formas de dosificación.

Las formas de dosificación orales pueden ser líquidas o sólidas.

Las formas de dosificación orales sólidas pueden incluir, por ejemplo comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas, polvos y gránulos.

En una realización, las formas de dosificación orales pueden formularse para garantizar una liberación controlada de nor-UDCA y/o sus sales, ésteres y/o derivados farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación pueden, por tanto, designarse como formas de dosificación farmacéuticas de liberación controlada (LC).

El término “forma de dosificación de liberación controlada” en el contexto de la presente invención se usa para resaltar que una forma de dosificación farmacéutica no es una forma de dosificación farmacéutica de liberación inmediata (LI). Una forma de dosificación farmacéutica de liberación oral inmediata liberará normalmente de manera sustancial todo del al menos un ácido nor-biliar y/o sus sales, ésteres y/o derivado farmacéuticamente aceptables del mismo en el plazo de un corto periodo de tiempo tras la administración. Normalmente, una forma de dosificación de LI habrá liberado el 70% en peso de los agentes farmacéuticamente activos en el plazo de treinta minutos de la administración. Estas tasas de liberación pueden determinarse usando el método de paletas de la Farmacopea Europea.

Una forma de dosificación de liberación controlada puede designar una forma de dosificación farmacéutica que libera el agente activo sólo después de que la forma de dosificación haya alcanzado un determinado sitio del cuerpo, es decir el estómago o el tubo digestivo. Adicional o alternativamente, puede designarse una forma de dosificación, que libera el agente activo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. En este último caso, una forma de dosificación de liberación controlada puede designarse como una forma de dosificación de liberación sostenida.

Puede, por ejemplo, lograrse una liberación controlada específica de sitio del agente farmacéuticamente activo,

siendo en el caso presente nor-UDCA o sales, ésteres y/o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que la liberación se hace dependiente del valor de pH de los líquidos que la forma de dosificación se encuentra cuando pasa a través del cuerpo humano. Una liberación dependiente del pH de este tipo puede permitir que una forma de dosificación libere el agente activo no en el estómago, sino sólo en el tubo digestivo. Otro aspecto sería que una forma de dosificación de liberación controlada de este tipo libera el agente activo una vez entra en el cuerpo. Un ejemplo típico de forma de dosificación de liberación controlada que libera de manera independiente del pH el agente activo son formas de dosificación que comprenden un recubrimiento entérico.

El término "liberación sostenida", en cambio, se refiere a la liberación de los compuestos farmacéuticamente activos de la forma de dosificación a lo largo de un periodo de tiempo prolongado pero no necesariamente a la liberación en un sitio definido. En general, liberación sostenida en el contexto de la presente invención significa que un agente farmacéuticamente activo tal como nor-UDCA y sus sales, ésteres y/o derivados farmacéuticamente aceptables se liberan de la forma de dosificación farmacéutica a lo largo de un periodo de tiempo de al menos 2 horas. Por supuesto, la liberación del agente farmacéuticamente activo de la forma de dosificación puede tener lugar a lo largo de periodos de tiempo de al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas o al menos 14 horas.

Las características de liberación sostenida de una forma de dosificación pueden adaptarse de modo que se logra un efecto terapéutico durante al menos 8 horas, durante al menos 12 horas o durante al menos 24 horas. Tales formas de dosificación farmacéuticas tienen la ventaja de que pueden administrarse en una base de 3 veces, 2 veces o una vez al día al paciente.

Por supuesto, los principios anteriores pueden combinarse. Por ejemplo, una forma de dosificación farmacéutica puede comprender un recubrimiento entérico con el fin de garantizar que el agente activo se libera sólo en el tubo digestivo. La liberación durante el paso gastrointestinal puede, sin embargo, presentar las características de liberación sostenida.

Según la divulgación, pueden combinarse adicional y/o alternativamente los principios de liberación inmediata y liberación sostenida. Por tanto, según la divulgación, una forma de dosificación puede comprender una fase de liberación inmediata que garantiza un rápido comienzo de la acción terapéutica que entonces se prolonga por una segunda fase de la forma de dosificación farmacéutica garantizando las características de liberación sostenida.

Pueden lograrse las características de liberación sostenida mediante diferentes enfoques de formulación. Por ejemplo, una forma de dosificación farmacéutica puede comprender una matriz de liberación sostenida en la que el agente farmacéuticamente activo tal como nor-UDCA se incrusta con el fin de lograr las propiedades de liberación sostenida de la forma de dosificación.

En otra realización, puede usarse un recubrimiento de liberación sostenida para garantizar las características de liberación sostenida de la forma de dosificación. En tal caso, el agente farmacéuticamente activo tal como nor-UDCA puede aplicarse sobre/o dentro de, por ejemplo, un portador, que no tiene influencia sustancial sobre la liberación del agente activo. Este portador cargado con fármaco puede entonces recubrirse por encima con un recubrimiento de liberación sostenida correspondiente.

Estos enfoques para lograr la liberación sostenida de un agente farmacéuticamente activo, es decir, uso de una matriz o un recubrimiento, pueden, por supuesto, combinarse. El experto en la técnica es consciente además de otros enfoques técnicos para lograr una liberación sostenida de la forma de dosificación que incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sostenida impulsadas de manera osmótica.

Normalmente, si se usa un sistema de matriz de liberación sostenida, el agente farmacéuticamente activo tal como nor-UDCA se dispersará por todo un material formador de matriz. Los materiales formadores de matriz pueden escogerse para lograr una matriz erosiva, una matriz de difusión o un sistema de matriz, que combina las características de una matriz erosiva y una de difusión. Los materiales adecuados para su inclusión en una matriz de liberación sostenida incluyen polímeros hidrófilos o hidrófobos incluyendo éteres de celulosa y preferiblemente alquilcelulosas e hidroxilalquilcelulosas así como resinas acrílicas. Otros materiales que pueden usarse en una matriz de liberación sostenida pueden ser alcoholes grasos, ácidos grasos o polietilenglicoles. El experto en la técnica será consciente de cómo construir tales formas de dosificación farmacéuticas.

En general, las formas de dosificación sólidas comprenderán diversos excipientes farmacéuticos aceptables que se seleccionarán según qué funcionalidad va a lograrse para la forma de dosificación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables típicos incluyen sustancias como sacarosa, manitol, sorbitol, almidón y derivados de almidón, lactosa y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, agentes disgregantes y tamponantes.

En el caso de que se consideren formas de dosificación líquidas para la presente invención, estas pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones y jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como agua. Estas formas de dosificación pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para conferir volumen, ácido algínico o alginato de sodio como agente de suspensión,

metilcelulosa como potenciador de la viscosidad y agentes edulcorantes/aromatizantes.

Los excipientes convencionales adicionales, que pueden usarse en las formas de dosificación mencionadas anteriormente según la funcionalidad que va a lograrse para la forma de dosificación, incluyen sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables que no reaccionan con el compuesto activo. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones de sal, alcohol, aceites, preferiblemente aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, tensioactivos, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petrotral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias, aromatizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas u acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes.

El experto en la técnica es consciente de que la biodisponibilidad de nor-UDCA, sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo puede potenciarse mediante micronización de las formulaciones y los compuestos activos usando técnicas convencionales tales como trituración, molienda y secado por pulverización en presencia de excipientes o agentes adecuados tales como fosfolípidos o tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden no sólo comprender nor-UDCA y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo sino también agentes farmacéuticamente activos que se sabe que tienen un efecto positivo sobre el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y preferiblemente de aterosclerosis. Estos agentes farmacéuticamente activos adicionales incluyen, por ejemplo, estatinas así como glitazonas y ácido acético acetílico.

Además, dado que las composiciones farmacéuticas según la divulgación, siendo nor-UDCA un representante preferido de las mismas y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo tienen un efecto positivo sobre EHGNA, también pueden usarse en combinación con agentes farmacéuticamente activos que por un lado se sabe que tienen un efecto positivo sobre el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y preferiblemente de aterosclerosis pero, por otro lado, también se sabe que inducen esteatosis del hígado, tales como por ejemplo antagonistas de LXR o similares.

Sin embargo, tal como se estableció anteriormente, las composiciones farmacéuticas según la divulgación, siendo nor-UDCA un representante preferido de las mismas y/o sales y/o ésteres farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden usarse como único agente activo que tiene un efecto positivo sobre el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y preferiblemente de aterosclerosis por un lado, y sobre el tratamiento y/o la prevención de EHGNA por el otro.

Una composición farmacéutica que comprende al menos nor-UDCA y/o sales, ésteres y/o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo puede usarse especialmente para el tratamiento y/o la prevención de aterosclerosis al menos inhibiendo parcialmente y/o revirtiendo parcialmente de manera activa una formación de placa.

Realizaciones adicionales preferidas de la divulgación se refieren al:

1. Uso de al menos ácido nor-ursodesoxicólico y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis.

2. Uso según 1, en el que el medicamento se usa para el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis y/o preferiblemente de aterosclerosis.

3. Uso según 1 ó 2, en el que se usa al menos ácido nor-ursodesoxicólico o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Uso según 3, en el que el medicamento comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos ácido nor-ursodesoxicólico o al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo y opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. Uso según 4, en el que el medicamento comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 8.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000 mg, más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mg y lo más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg de al menos ácido nor-ursodesoxicólico o de al menos una sal, éster y/o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención se ilustrará ahora con respecto a ejemplos que, sin embargo, no han de interpretarse como

limitativos.

Experimento 1 - Tratamiento de ratones ApoE^{-/-} con nor-UDCA

5 Con el fin de estudiar los efectos de nor-UDCA sobre la aterosclerosis, se trataron ratones deficientes en ApoE. Para este fin, ratones ApoE^{-/-} tal como se describe en Piedrahita *et. al.* (PNAS, 1992, 89, 4471-4475) que llevan la mutación ApoE^{tm1Unc} se sometieron a retrocruzamiento 10 veces en C57BL/6J. También pueden obtenerse ratones deficientes en ApoE del Jackson Laboratory (Maine, EE.UU.) con el nombre de cepa B6.129P2.- ApoE^{tm1Unc}/J(<http://jaxmice.jax.org>).

10 Se alimentaron ratones ApoE^{-/-} (n = 10) con dieta normal durante 8 semanas tras el nacimiento, seguido por dieta de comida occidental durante otras 8 semanas. La dieta de comida occidental consiste en el 21% en peso de grasa, el 1,5% en peso de colesterol y ácido no cólico (“dieta alta en grasas”).

15 Este tipo de dieta de comida occidental se sabe que fuerza la formación de placas ateroscleróticas en la línea temporal indicada en ratones ApoE^{-/-}. Tras ocho semanas de alimentación con dieta de comida occidental, los ratones se segregaron en dos grupos comprendiendo cada grupo cinco ratones. En el grupo de control A, los ratones se alimentaron adicionalmente con la dieta de comida occidental durante cuatro semanas adicionales. En el otro grupo B, los ratones ApoE^{-/-} se alimentaron con una dieta de comida occidental que comprendía el 0,5% p/p de nor-UDCA durante cuatro semanas adicionales. Considerando una ingesta de alimento de 4 g/día de comida por ratón, esto corresponde a 20 mg/día de nor-UDCA por ratón.

La configuración experimental se representa en la figura 1.

25 Posteriormente estos ratones se analizaron 20 semanas tras el nacimiento mediante diferentes medios tal como se muestra en las figuras 2 y 3.

30 La figura 2 muestra un análisis histológico. Se representan vistas en sección transversal de secciones de aorta teñidas con aceite rojo en ratones ApoE^{-/-}. Puede observarse claramente el desarrollo de placas arterioscleróticas en ratones de control (A) mientras que los ratones alimentados con nor-UDCA muestran un grado significativamente reducido de estas placas (B).

35 La figura 3 representa entonces un análisis morfométrico en el que se determina el área esclerótica frente al área de la aorta. Puede observarse claramente que el área esclerótica es significativamente menor en los ratones ApoE^{-/-} con nor-UDCA (grupo B). El número de ratones analizado fue de 5 para cada grupo.

Experimento 2 - Tratamiento de ratones LDLR^{-/-} con nor-UDCA

40 En un segundo experimento (figura 4 y 5), se investigó el efecto de nor-UDCA en ratones LDLR^{-/-} que se criaron con una dieta de comida occidental.

45 Como los ratones deficientes en ApoE, los ratones deficientes en LDLR se consideran un modelo animal genuino de desarrollo de aterosclerosis. Si estos ratones se crían con una dieta occidental, evolucionan a los síntomas típicos de la aterosclerosis que implica la formación de placas ateroscleróticas en la aorta (figura 5).

50 Se produjeron ratones LDLR^{-/-} tal como se describe en Ishebashi *et. al.* (J. Clin. Invest., 1993, 92, 883-893). Se usó la línea celular AB1 ES derivada de 129. La cepa se sometió a retrocruzamiento con ratones C57BL/6J durante 10 generaciones. Ld1r^{tm1Her}/Ld1r^{tm1Her} implica: 129S7/SvEvBrd * C57BL/6. También pueden obtenerse ratones deficientes en LDLR del Jackson Laboratory (Maine, EE.UU.) con el nombre de cepa B6.129S7-Ld1r^{tm1Her}/J (<http://jaxmice.jax.org>).

Como en el experimento 1, se criaron diez ratones deficientes en LDLR con dieta normal durante las 8 primeras semanas tras el nacimiento seguido por la dieta de comida occidental durante otras ocho semanas.

55 Después de eso, los diez ratones se separaron en dos grupos para los cuales el grupo de control A recibió alimentación adicional con una dieta de comida occidental durante 4 semanas. En el grupo de prueba B, la dieta de comida occidental de las 4 semanas siguientes se complementó con el 0,5% p/p de nor-UDCA. Considerando una ingesta de alimento de 4 g/día de comida por ratón, esto corresponde a 20 mg/día de nor-UDCA por ratón.

60 El diseño del estudio se representa en la figura 4.

65 Posteriormente, estos ratones se analizaron 20 semanas tras el nacimiento tal como se muestra en la figura 5: Se realizó un análisis histológico de la aorta de ratones LDLR^{-/-}. Para este fin, se tiñó una sección longitudinal *en face* de la aorta con aceite rojo. A partir de la figura 5, puede observarse claramente que el grado y el tamaño de la placa aterosclerótica se reduce significativamente en los ratones del grupo B.

Puede observarse claramente a partir de los experimentos 1 y 2 que nor-UDCA reduce el tamaño de placas ateroscleróticas en modelos animales, que se considera que son representantes genuinos del desarrollo aterosclerótico.

5 **Experimento 3 - Tratamiento de ratones ApoE^{-/-} con nor-UDCA en comparación con UDCA**

Se usaron ratones deficientes en ApoE tal como se describe en el experimento 1.

10 Se alimentaron ratones ApoE^{-/-} (n = 15) con dieta normal durante 8 semanas tras el nacimiento, seguido por dieta de comida occidental (“dieta alta en grasas”) durante otras 8 semanas. Los ratones se segregaron entonces en tres grupos comprendiendo cada grupo cinco ratones. En el grupo de control, los ratones se alimentaron adicionalmente con la dieta de comida occidental durante cuatro semanas adicionales. En el segundo grupo, los ratones ApoE^{-/-} se alimentaron con una dieta de comida occidental que comprendía el 0,5% p/p de nor-UDCA durante cuatro semanas adicionales. Finalmente, en el tercer grupo, los ratones ApoE^{-/-} se alimentaron con una dieta de comida occidental que comprendía el 0,5% p/p de UDCA durante cuatro semanas adicionales. Considerando una ingesta de alimento de 4 g/día de comida por ratón, esto corresponde a 20 mg/día de nor-UDCA o UDCA, respectivamente, por ratón.

La configuración experimental se representa en la figura 6.

20 Posteriormente estos ratones se analizaron 20 semanas tras el nacimiento mediante diferentes medios tal como se muestra en las figuras 7 a 13.

La figura 7 muestra el efecto de o bien UDCA o bien nor-UDCA sobre el número de granulocitos neutrófilos hepáticos. Dichas células son indicativas de una inflamación en el hígado y, por tanto, de la presencia de señales inflamatorias en general. En la parte superior de la figura 7, se muestra un análisis inmunohistoquímico de tejido hepático de los tres grupos diferentes a-c. En cada caso, se incubaron en primer lugar preparaciones de tejido hepático con un anticuerpo específico para el antígeno de superficie CD11b, que está presente en la superficie de granulocitos neutrófilos sólo. Tras dicha incubación, se detectó el anticuerpo anti-CD11b con un conjugado de anticuerpo secundario, lo que da como resultado la tinción de células positivas para CD11b (véanse las flechas). Claramente, el número de granulocitos neutrófilos hepáticos se reduce en ratones alimentados con nor-UDCA (c). Debajo de las tinciones, se muestra un análisis cuantitativo. Para este fin, se analizaron preparaciones hepáticas teñidas con CD11b de 5 ratones de cada grupo: En cada preparación, se contaron células positivas para CD11b en 30 áreas diferentes de la preparación usando un microscopio con un aumento de x20. Entonces se calculó el promedio del número de células para una única área en cada preparación y posteriormente para una única área de las 5 preparaciones / grupo. De nuevo, el número de granulocitos neutrófilos hepáticos está claramente reducido en ratones alimentados con nor-UDCA. Por tanto, nor-UDCA presenta un efecto antiinflamatorio.

La figura 8 muestra un análisis del nivel de expresión de p-JNK en tejido hepático. El nivel de expresión de la p-JNK-cinasa es indicativo de la presencia de señales inflamatorias puesto que p-JNK es parte de la señalización inflamatoria en células. Para este fin, se homogeneizó una cantidad idéntica de tejido hepático de tres ratones (correspondientes a diferentes carriles en el WB) de o bien ratones alimentados normalmente deficientes en ApoE (ApoE) o bien de los tres grupos tal como se señaló anteriormente (ApoE + WD, ApoE + WD + UDCA, ApoE + WD + nor-UDCA) y se prepararon lisados celulares según métodos convencionales. Se normalizaron dichos lisados para la cantidad de proteína presente según métodos convencionales. Entonces se analizaron fracciones que contenían cantidades idénticas de proteína mediante técnicas de inmunotransferencia de tipo Western convencionales (desnaturalización de las muestras añadiendo tampón SDS y sometiendo a ebullición seguido por SDS-PAGE y transferencia a una membrana; análisis cuantitativo de las proteínas unidas a la membrana mediante incubación con un primer anticuerpo (anti-p-JNK 1/2) y un segundo anticuerpo (dirigido contra el primer anticuerpo, usado como conjugado) seguido por detección quimioluminiscente del conjugado del segundo anticuerpo) para determinar la cantidad de p-JNK. Claramente, nor-UDCA puede regular por disminución la expresión de p-JNK (para niveles “normales”, véase control de ApoE en los carriles de la izquierda) a diferencia de UDCA.

La figura 9 muestra los niveles de triglicéridos hepáticos de las tres poblaciones diferentes. Para cada población, se analizaron 5 ratones y los valores representados representan las cantidades de triglicéridos promediadas. Se homogeneizó una cantidad idéntica de tejido hepático de cada ratón y se determinó la cantidad de triglicéridos presente en cada homogeneizado mediante métodos convencionales. Claramente, nor-UDCA puede reducir significativamente la cantidad de triglicéridos en el hígado en comparación con el control o con los ratones tratados con UDCA.

60 La figura 10 muestra los niveles de transaminasa en suero (en este caso alanina-amino-transferasa) como indicadores del estado de células hepáticas (cuantas más células hepáticas mueran, mayores serán los niveles de transaminasa en suero). Para este fin, se determinó la actividad de la alanina-amino-transferasa presente en un volumen definido de una muestra de sangre mediante métodos de laboratorio de diagnóstico convencionales y se proporcionó como actividad enzimática de unidades/litro. Se usaron 5 ratones o bien en el control o bien la población tratada con nor-UDCA y los valores representados representan las actividades de ALT promediadas.

Nor-UDCA muestra una tendencia de reducción de los niveles de transaminasa en suero en comparación con el control y, por tanto, parece tener un impacto positivo sobre células hepáticas.

La figura 11 muestra los niveles totales de colesterol en suero. Para este fin, se determinó la cantidad de colesterol en suero en un volumen definido de una muestra de sangre mediante métodos de laboratorio de diagnóstico convencionales y se muestra en mg/dl. Se usaron 5 ratones o bien en el control o bien la población tratada con nor-UDCA y los valores representados representan las cantidades de colesterol promediadas. Nor-UDCA parece poder reducir el colesterol total en comparación con el control. Los efectos positivos de nor-UDCA sobre la aterosclerosis, sin embargo, parecen ser principalmente independientes de los niveles de colesterol en suero globales.

La figura 12 representa un análisis cuantitativo en el que se determina el área que comprende placas frente al área total en el arco aórtico. Para este fin, se realizó un análisis histológico seguido por una cuantificación. En primer lugar, se tiñó *en face* una sección longitudinal de la aorta con aceite rojo (en cada grupo para 5 ratones). En una segunda etapa, se determinó el área que comprendía placas y, usando el área total, se expresó dicha área de placas en % de placas en el arco aórtico (los valores representados representan los recuentos o porcentaje promediados, respectivamente, para 5 ratones en cada grupo). Nor-UDCA parece ser tan eficaz como UDCA disminuyendo ambas sustancias el porcentaje de placas.

La figura 13 muestra un análisis histológico (parte superior). Se representan vistas en sección transversal de válvulas aórticas teñidas con aceite rojo preparadas a partir de ratones tal como se indicó. Claramente, la cantidad de placas se reduce tanto en los ratones tratados con UDCA como los tratados con nor-UDCA. Coherente con este resultado, también una cuantificación del área de placas frente al área de superficie total (expresada como placas en % del área de superficie) muestra una reducción significativa de dicho % de placas en ratones tratados con nor-UDCA. Se usaron 5 muestras de cada población para dicha cuantificación.

Resumiendo los datos obtenidos en los estudios de tratamientos tal como se señaló anteriormente, nor-UDCA da como resultado

1. una reducción del número, el grado y el tamaño de placas ateroscleróticas, lo más probablemente por medio de un efecto directo sobre las placas (y macrófagos, respectivamente) y no por medio de una reducción de los niveles de colesterol en suero

1. una reducción de los niveles de triglicéridos hepáticos y transaminasa en suero

2. una reducción de señales inflamatorias y de células inducidas por tales señales inflamatorias en el hígado.

Por tanto, nor-UDCA reduce las placas ateroscleróticas, tiene efectos positivos sobre el hígado graso no alcohólico durante el tratamiento de la aterosclerosis y actúa como antiinflamatorio.

Experimento 4 -Prevención de aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} mediante nor-UDCA en comparación con UDCA

Se usaron ratones deficientes en ApoE tal como se describe en el experimento 1.

Se alimentaron ratones ApoE^{-/-} (n = 15) con dieta normal durante 8 semanas tras el nacimiento y después se segregaron en tres grupos comprendiendo cada grupo cinco ratones. En el grupo de control, los ratones se alimentaron con la dieta de comida occidental durante 12 semanas adicionales. En el segundo grupo, los ratones ApoE^{-/-} se alimentaron con una dieta de comida occidental que comprendía el 0,5% p/p de nor-UDCA durante 12 semanas adicionales. Finalmente, en el tercer grupo, los ratones ApoE^{-/-} se alimentaron con una dieta de comida occidental que comprendía el 0,5% de p/p UDCA durante 12 semanas adicionales. Considerando una ingesta de alimento de 4 g/día de comida por ratón, esto corresponde a 20 mg/día de nor-UDCA o UDCA, respectivamente, por ratón.

Por tanto, en esta configuración de prevención experimental, los ratones se alimentan con dieta que se sabe que fuerza la formación de placas ateroscleróticas junto con o bien UDCA o bien nor-UDCA (ratones del segundo y tercer grupo) que tienen efectos preventivos sobre la formación de placas. Cuando se comparan con un control alimentado con dieta de comida occidental sólo, pueden estudiarse los efectos preventivos.

La configuración experimental se representa en la figura 14 (a).

La figura 14(b) representa los pesos corporales de los animales de los tres grupos (5 por grupo con grupos tal como se indica en (a)) a lo largo de un periodo del tratamiento tal como se indica. Ninguna de las terapias tal como se representó en a) tuvo una influencia significativa sobre los pesos corporales de los ratones puesto que los pesos corporales no varían significativamente entre los grupos. Por tanto, todos los efectos mostrados a continuación no pueden atribuirse a los pesos corporales de los animales.

Posteriormente estos ratones se analizaron 20 semanas tras el nacimiento mediante diferentes medios tal como se muestra en las figuras 15 a 20.

5 La figura 15 muestra los niveles de triglicéridos hepáticos para las tres poblaciones diferentes. Las figuras a)-c) son preparaciones histológicas del hígado en las que se tiñeron ácidos grasos neutros (principalmente triglicéridos) con aceite rojo. Claramente, las cantidades de triglicéridos hepáticos se reducen en la preparación c) de un ratón alimentado con nor-UDCA adicional. En la cuantificación d) debajo de las preparaciones, se analizaron 10 ratones de cada grupo y los valores representados representan las cantidades de triglicéridos promediadas. Se
10 homogeneizó una cantidad idéntica de tejido hepático de cada ratón y se determinó la cantidad de triglicéridos presente en cada homogeneizado mediante métodos convencionales. Claramente, nor-UDCA puede reducir significativamente la cantidad de triglicéridos en el hígado en comparación con el control o con los ratones tratados con UDCA.

15 La figura 16 muestra una tinción de células hepáticas en general (a) - c)) y los niveles de transaminasa en suero (en este caso alanina-amino-transferasa) como indicadores del estado de células hepáticas (cuantas más células hepáticas mueran, mayores serán los niveles de transaminasa en suero) en d). Las figuras a)- c) son preparaciones histológicas del hígado en las que se tiñen células con tinción de hematoxilina y eosina.

20 Además, se determinó la actividad de la alanina-amino-transferasa presente en un volumen definido de una muestra de sangre mediante métodos de laboratorio de diagnóstico convencionales y se proporciona como actividad enzimática de unidades/litro (d). Se usaron 5 ratones o bien en el control, la población tratada con UDCA o la tratada con nor-UDCA y los valores representados representan las actividades de ALT promediadas. Nor-UDCA reduce significativamente los niveles de transaminasa en suero en comparación con el control y UDCA y, por tanto, parece tener un impacto positivo sobre las células hepáticas. Este resultado está claramente respaldado por el aspecto
25 general de las células hepáticas teñidas con H&E de la figura c).

La figura 17 muestra los niveles totales de colesterol en suero. Para este fin, se determinó la cantidad de colesterol en suero en un volumen definido de una muestra de sangre mediante métodos de laboratorio de diagnóstico convencionales y se muestra en mg/dl. Se usaron 5 ratones o bien en el control o bien en la población tratada con
30 nor-UDCA y los valores representados representan las cantidades de colesterol promediadas. Los efectos positivos de nor-UDCA sobre la aterosclerosis parecen ser independientes de los niveles globales de colesterol en suero.

La figura 18 muestra la influencia de nor-UDCA frente a control y UDCA sobre el peso de tejido adiposo blanco y marrón de los ratones. Para este fin, se determinó el peso del tejido adiposo correspondiente de cada ratón. Se usaron 5 ratones por grupo y se calculó el promedio de los datos obtenidos con respecto a dicha población. Claramente, ni UDCA ni nor-UDCA tuvieron una influencia sobre el peso del tejido adiposo marrón. Nor-UDCA, sin embargo, mostró una fuerte reducción de la cantidad de tejido adiposo blanco en comparación con el control o los ratones tratados con UDCA. Por tanto, nor-UDCA tiene un efecto positivo sobre la reducción de la cantidad de tejido
40 adiposo blanco.

En la figura 19, se muestra un análisis histológico de la aorta en las dos preparaciones en la parte superior. Para este análisis, se tiñó *en face* una sección longitudinal de la aorta con aceite rojo para placas de lípidos. Al comparar dichas dos preparaciones, puede observarse claramente que el grado y el tamaño de placas ateroscleróticas se reduce significativamente en el ratón que se alimenta con nor-UDCA adicional (b). La figura 20 entonces representa un análisis morfométrico en el que el área esclerótica frente al área de aorta total se determina en las preparaciones según la figura 19. En cada grupo, se analizaron 10 ratones y cada punto en la mancha del control o los ratones alimentados con "nor-UDCA complementado" se corresponde con el resultado para un ratón. Puede observarse claramente que el área esclerótica es significativamente menor en los ratones ApoE^{-/-} alimentados con nor-UDCA.
45

50 Resumiendo los datos obtenidos en los estudios de prevención tal como se señaló anteriormente, nor-UDCA da como resultado

1. una reducción del número, el grado y el tamaño de placas ateroscleróticas, lo más probablemente por medio de un efecto directo sobre las placas (y macrófagos, respectivamente) y no por medio de una reducción de niveles de colesterol en suero
55

2. una reducción de niveles de triglicéridos hepáticos y transaminasa en suero así como en la cantidad de tejido adiposo blanco

60 Por tanto, nor-UDCA reduce las placas ateroscleróticas y tiene efectos positivos sobre el hígado grasoso no alcohólico durante la prevención de la aterosclerosis.

Resumiendo los datos obtenidos en los estudios de tratamiento y prevención, parece que nor-UDCA ejerce sus efectos positivos mediante un efecto directo sobre los macrófagos, lo que da como resultado un aumento de la exportación de colesterol a partir de los macrófagos en el suero y, por tanto, una reducción de placas (puesto que los macrófagos son "parte de" las placas en forma de células espumosas) y mediante un efecto positivo sobre las
65

enzimas hepáticas responsables de metabolizar colesterol en suero transportado de manera inversa dando como resultado un mayor metabolismo del colesterol en el hígado mejorando, por tanto, el hígado graso no alcohólico.

REIVINDICACIONES

1. Forma de dosificación oral que comprende al menos ácido nor-ursodesoxicólico y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento y/o la prevención de arteriosclerosis, en la que la forma de dosificación oral comprende de 10 a 8.000 mg o de 1 a 100 mg/kg/d de al menos ácido nor-ursodesoxicólico o de al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la forma de dosificación oral es una forma de dosificación de liberación controlada que libera al menos ácido nor-ursodesoxicólico y/o al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo sólo después de que la forma de dosificación oral haya alcanzado el estómago o el tubo digestivo.
2. Forma de dosificación oral para su uso según la reivindicación 1, en la que la forma de dosificación oral comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Forma de dosificación oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la forma de dosificación oral comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 5.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500 mg y más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg de al menos ácido nor-ursodesoxicólico o de al menos una sal y/o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Forma de dosificación oral para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la forma de dosificación oral se usa para el tratamiento y/o la prevención de arteriolosclerosis y/o preferiblemente de aterosclerosis.

Figura 1: Configuración experimental para datos de estudios de tratamiento representados en las figuras 2 y 3

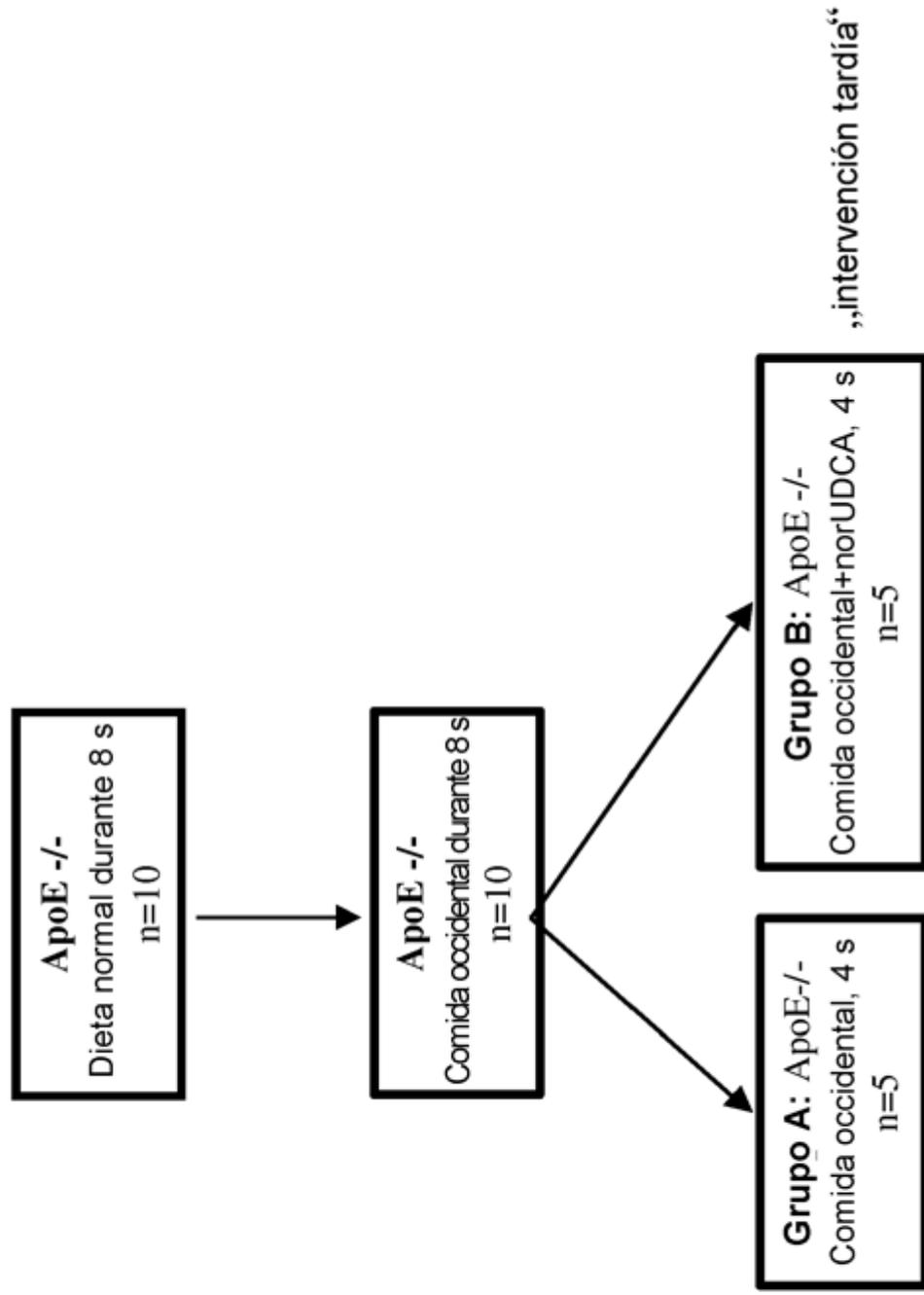
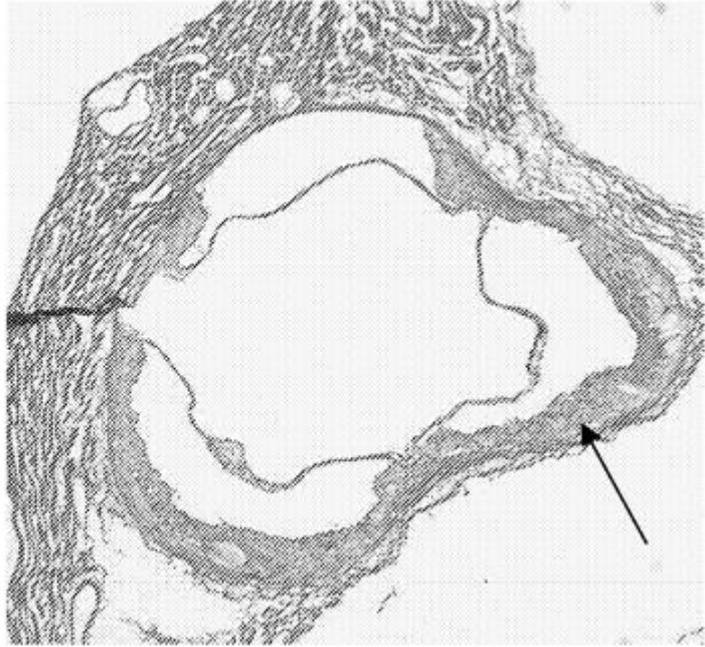


Figura 2: Estudio de tratamiento:
secciones de aorta teñidas con aceite rojo

A: grupo A



B: grupo B

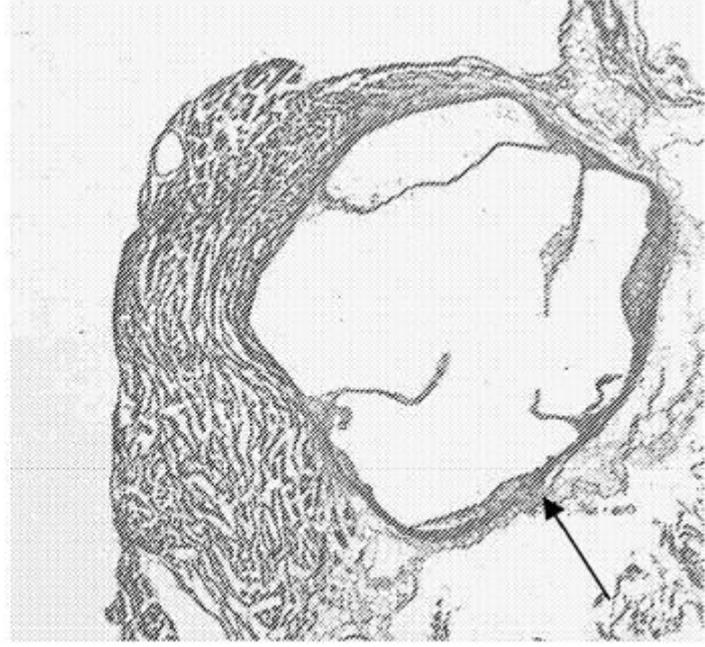


Figura 3: Estudio de tratamiento: análisis morfométrico de área esclerótica

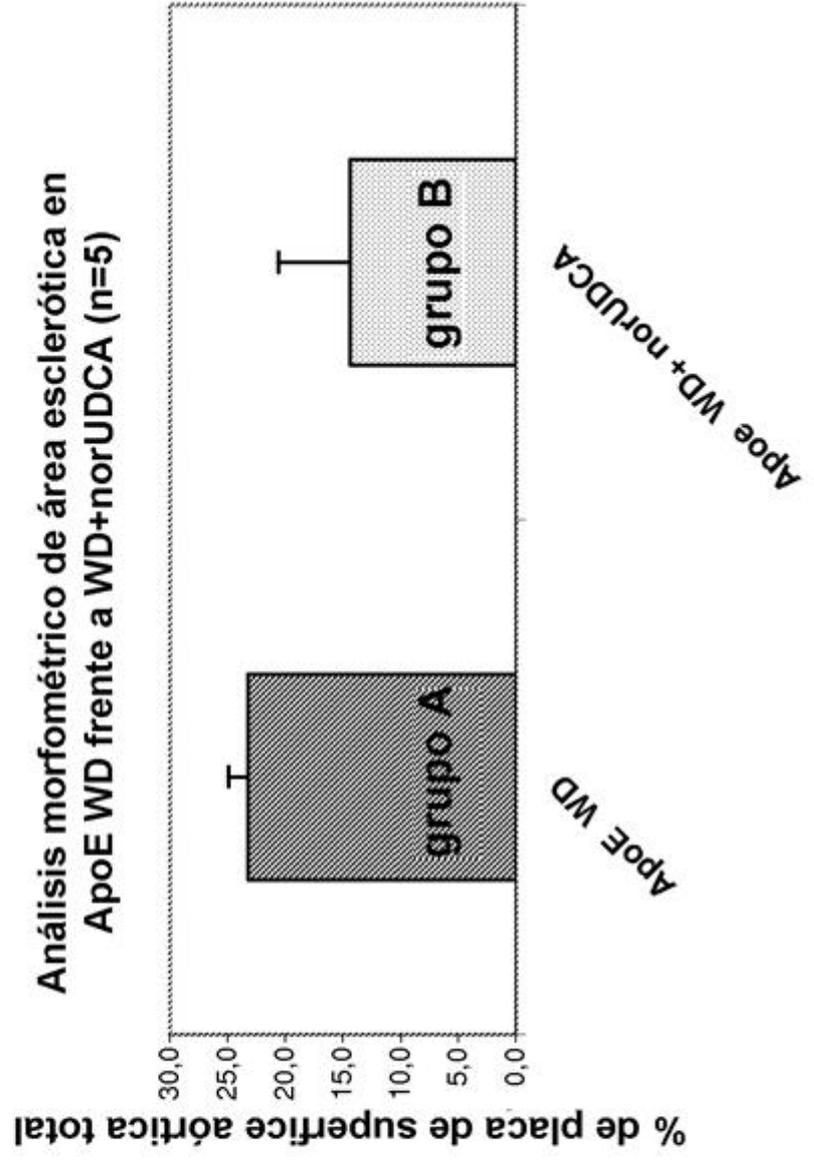


Figura 4: Configuración experimental para datos del estudio de tratamiento representado en la figura 5

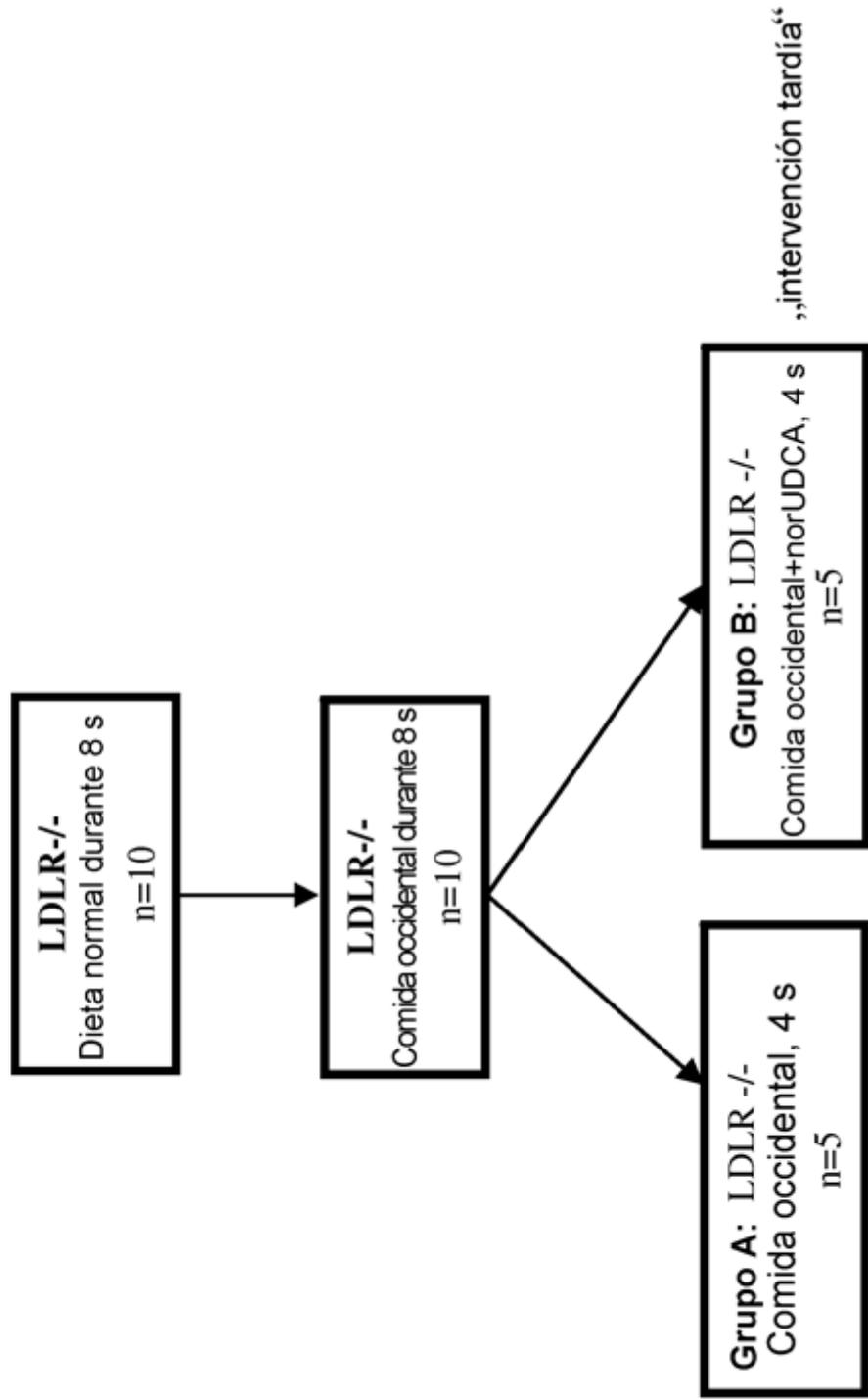
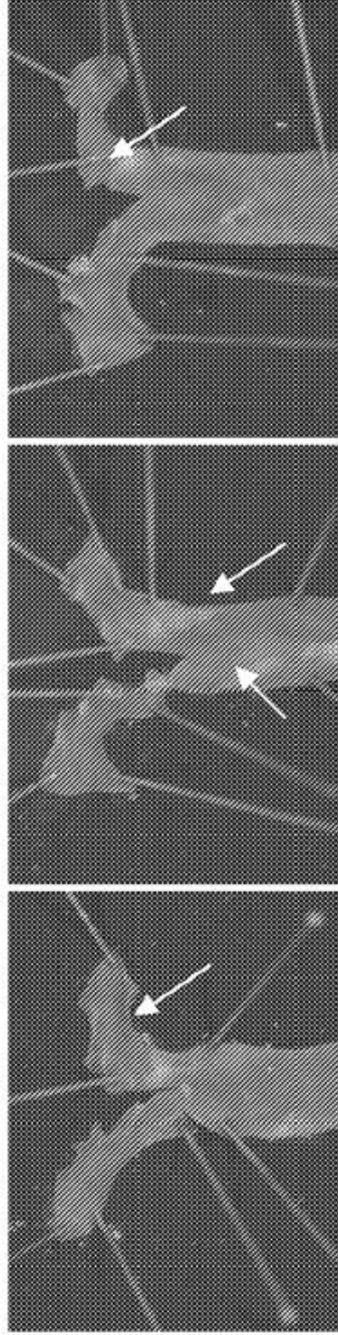


Figura 5: Grupo de tratamiento:
aorta teñida con aceite rojo cortada longitudinalmente
(*en face*)

A: grupo A



B: grupo B

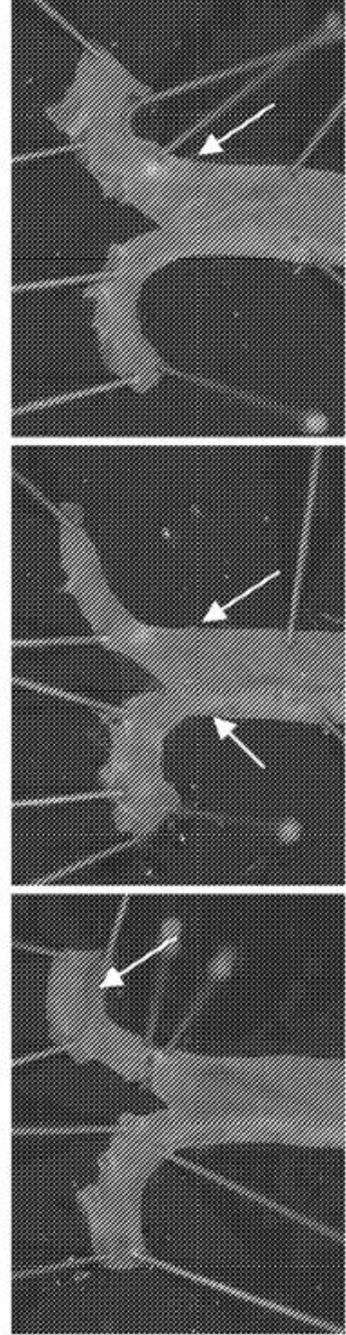


Figura 6: Configuración experimental para datos de estudios de tratamiento representados en las figuras 7 - 13

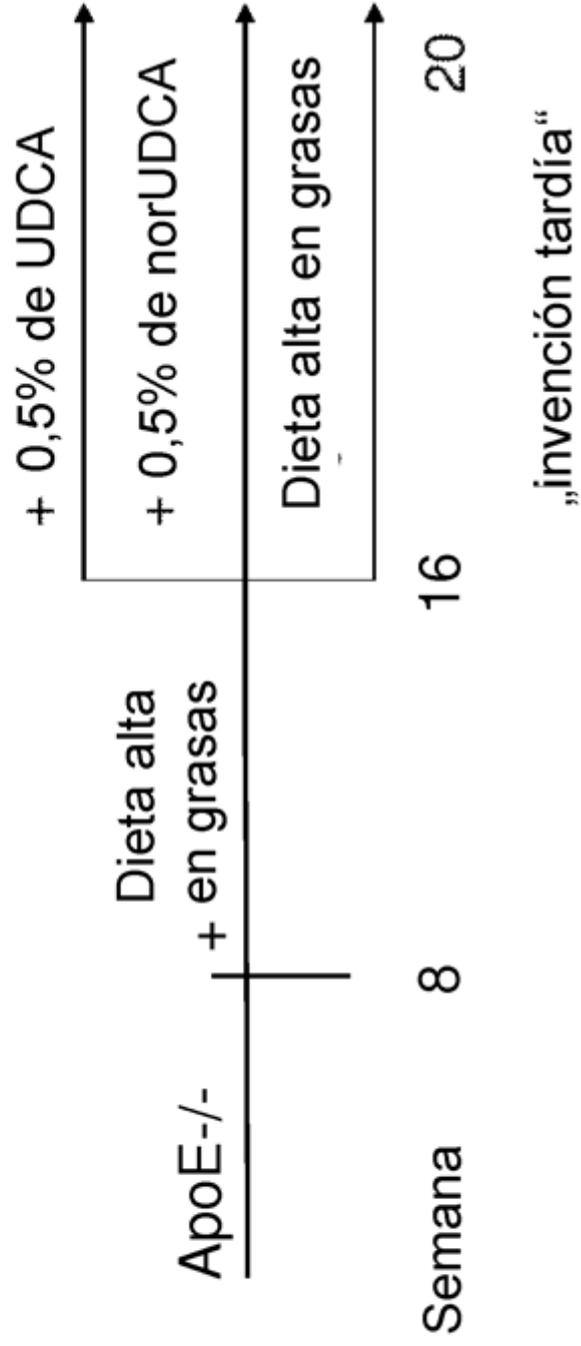


Figura 7: Estudio de tratamiento: número de granulocitos neutrófilos hepáticos

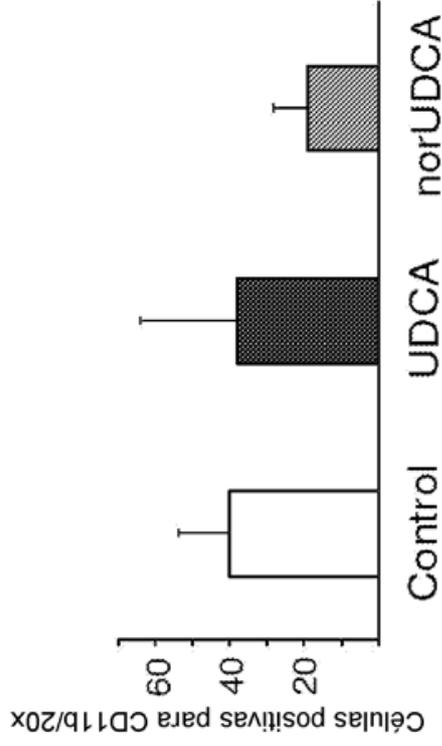
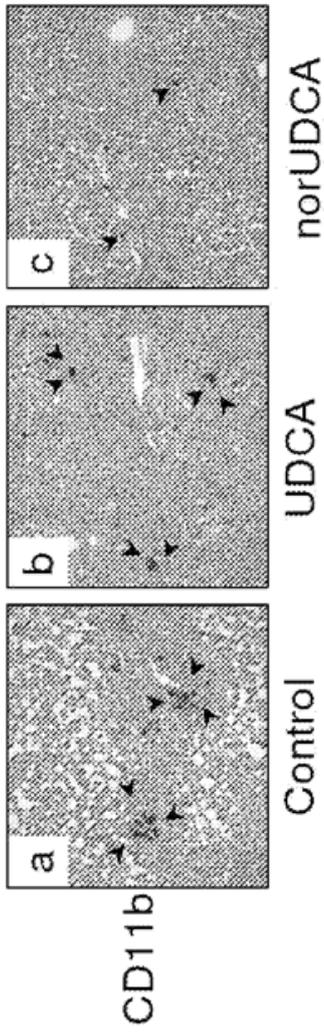


Figura 8: Estudio de tratamiento: señalización de p-JNK en el hígado

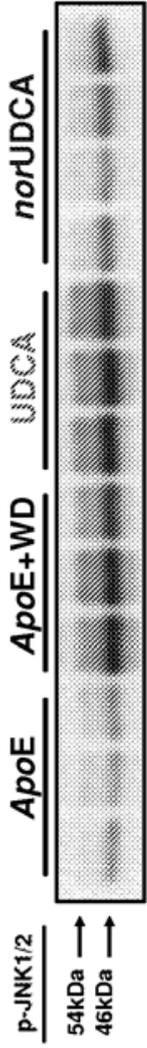


Figura 9:

Estudio de tratamiento:
niveles de triglicéridos hepáticos

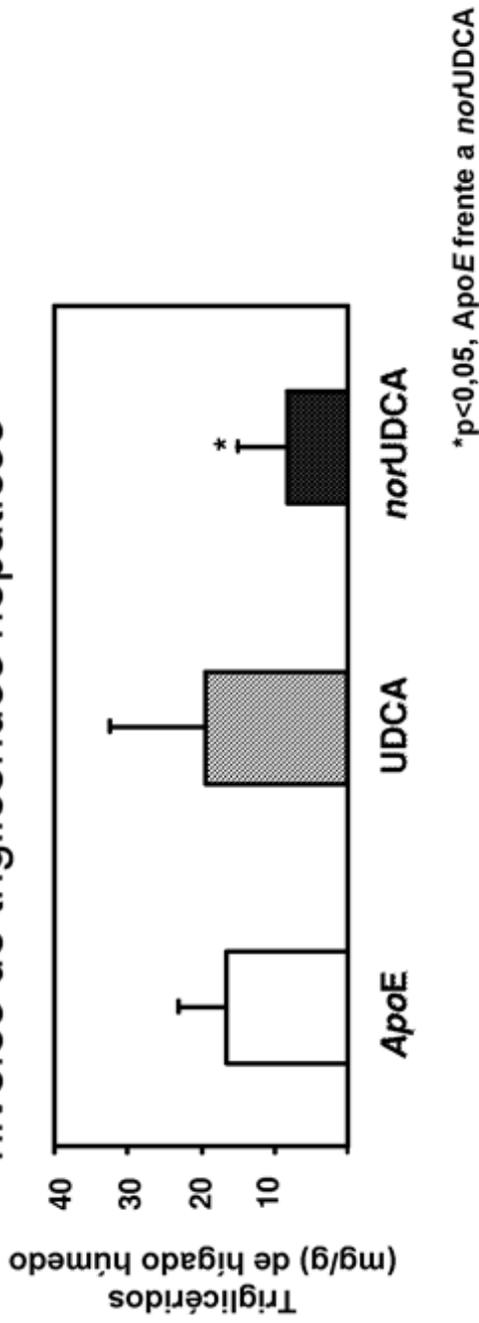


Figura 10:

Estudio de tratamiento:
niveles de transaminasa en suero

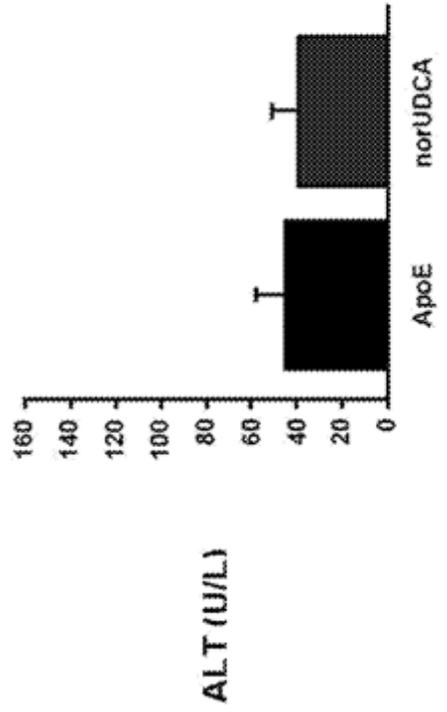


Figura 11:

Estudio de tratamiento:
niveles de colesterol en suero

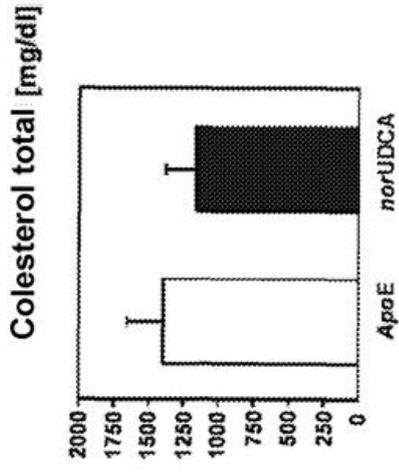


Figura 12:

Estudio de tratamiento:
placas en el arco aórtico (en face)

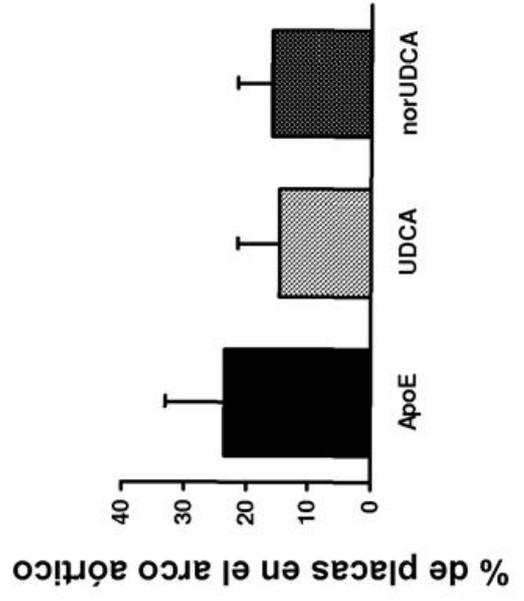


Figura 13: Estudio de tratamiento: secciones teñidas con aceite rojo de la válvula aórtica

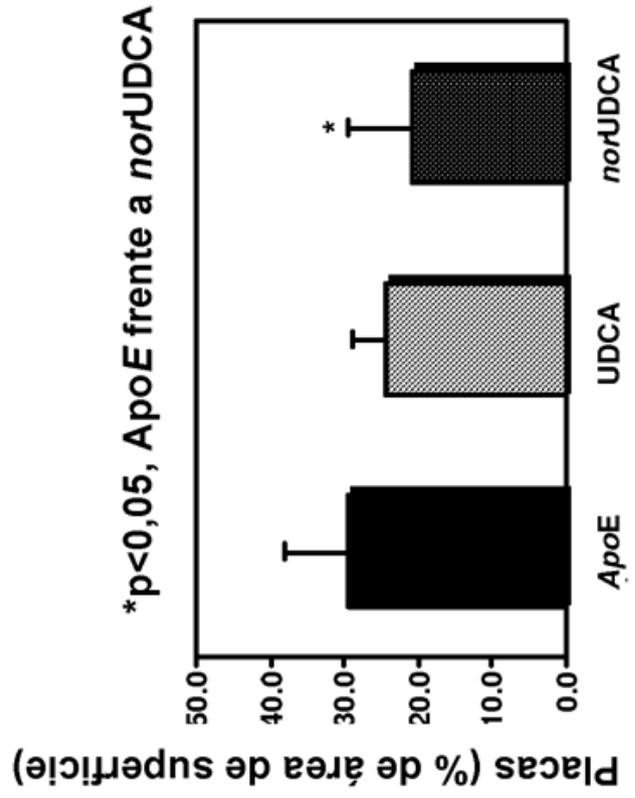


Figura 14: Configuración experimental para datos de estudios de prevención representados en las figuras 15 -20 (a) y pesos corporales (b)

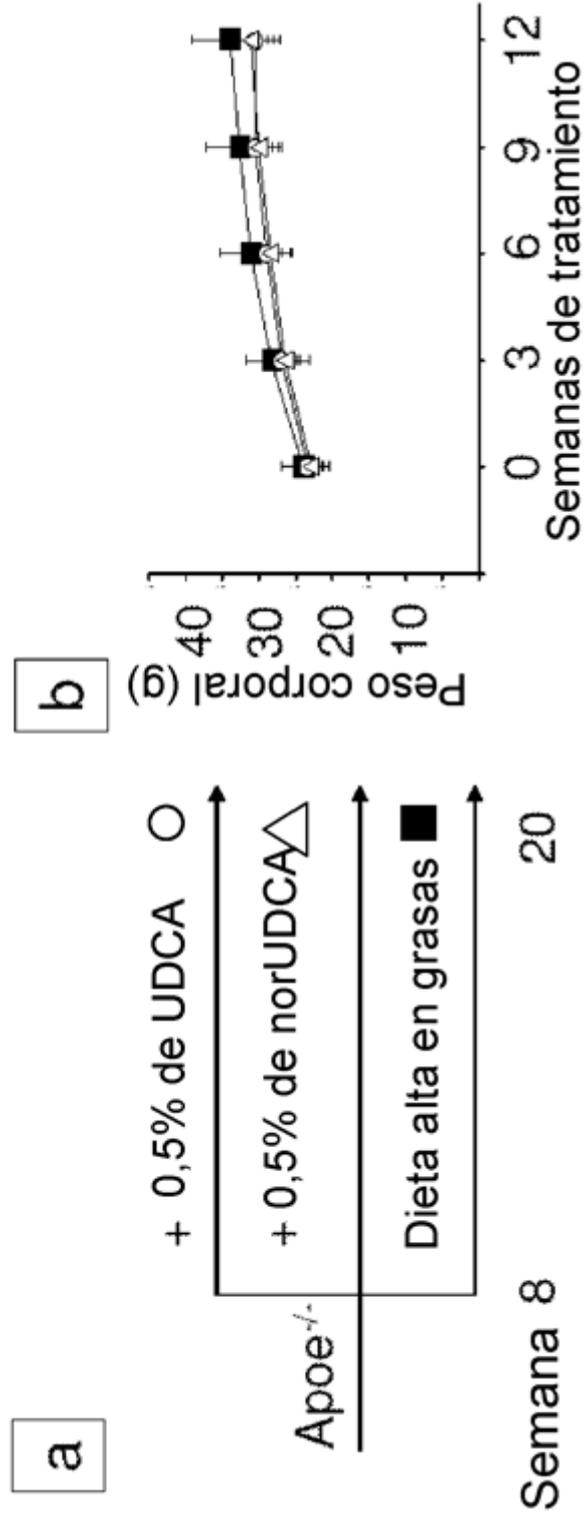


Figura 15: Estudio de prevención: niveles de triglicéridos hepáticos

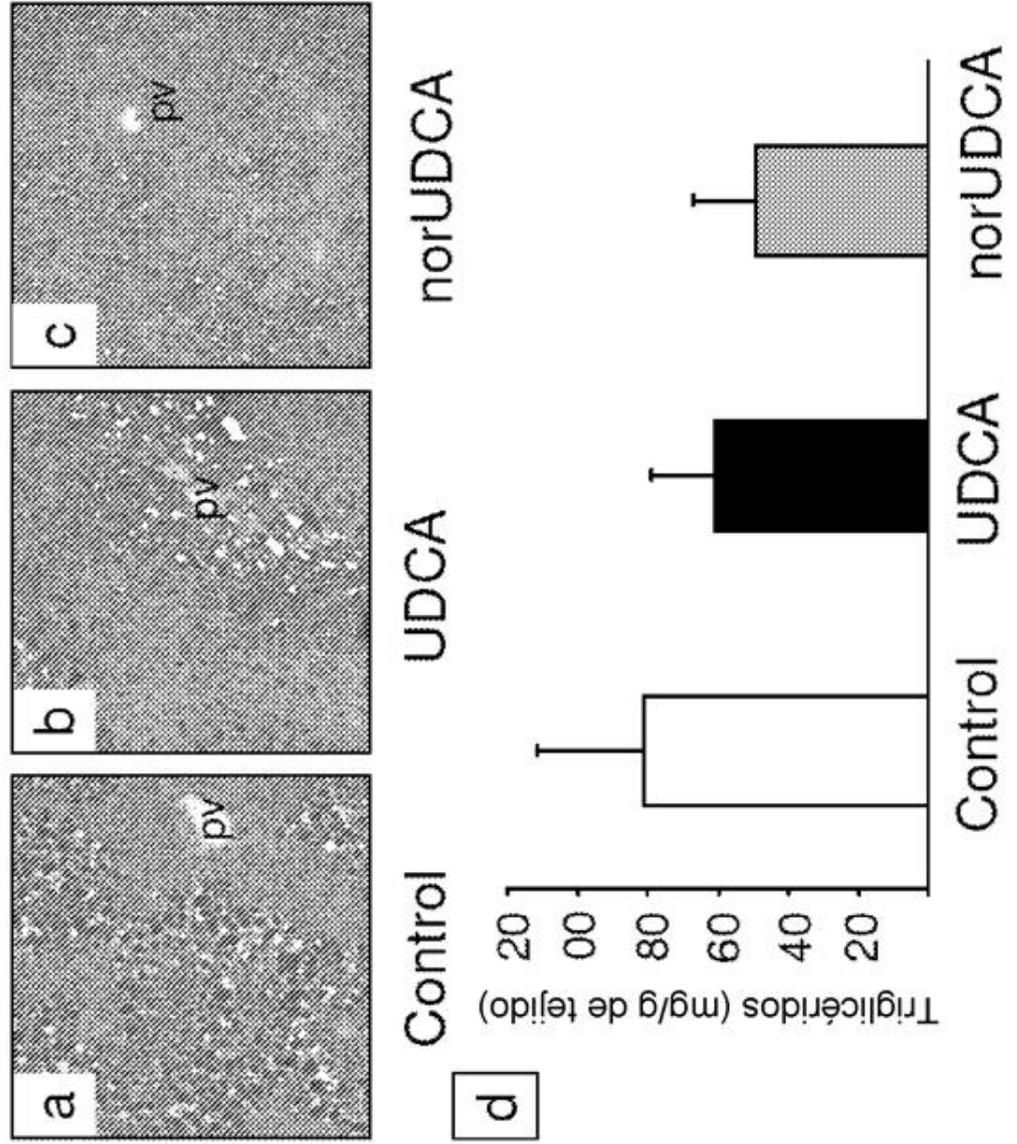


Figura 16: Estudio de prevención: niveles de transaminasa en suero

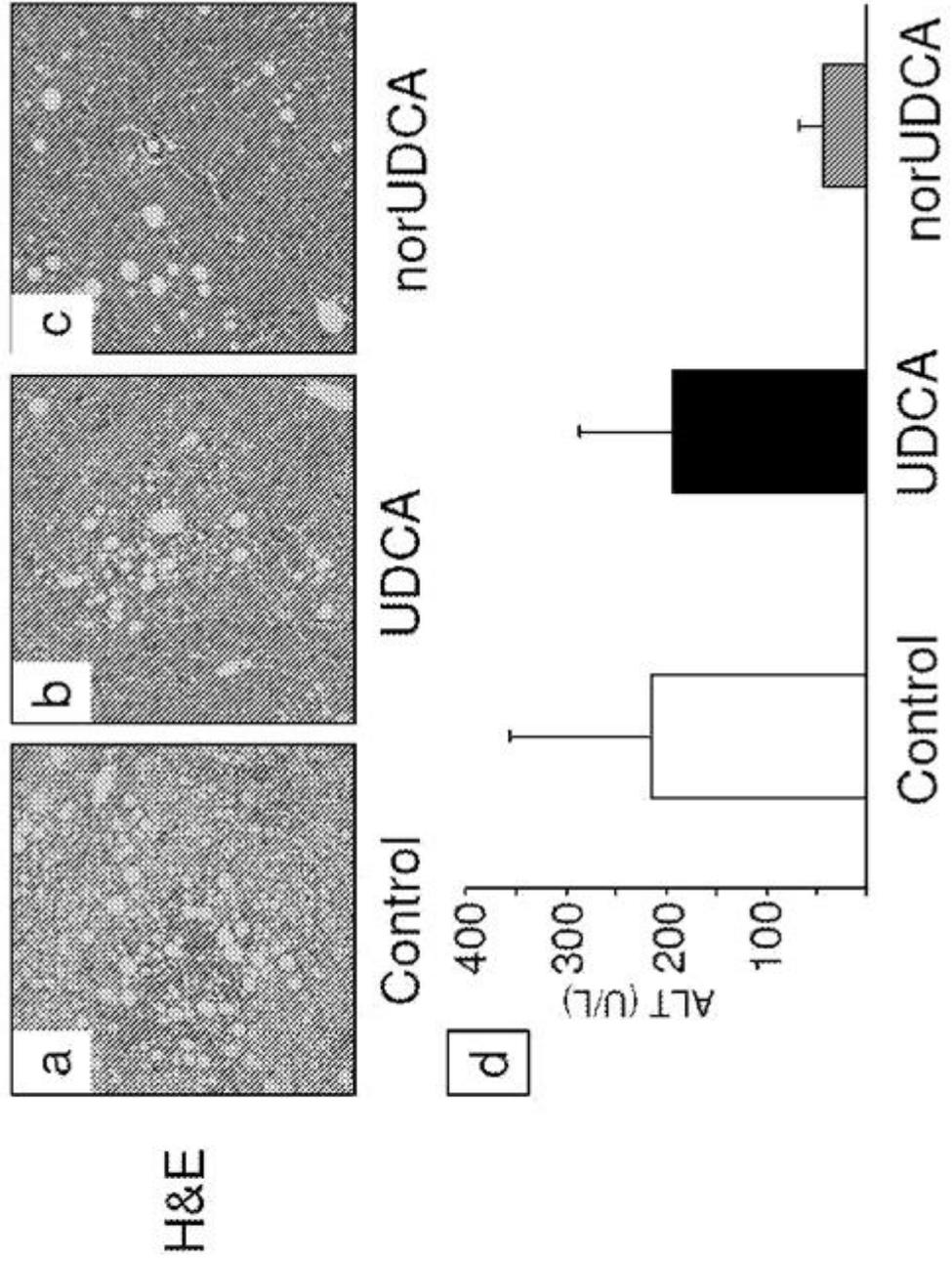


Figura 17: Estudio de prevención: niveles de colesterol en suero

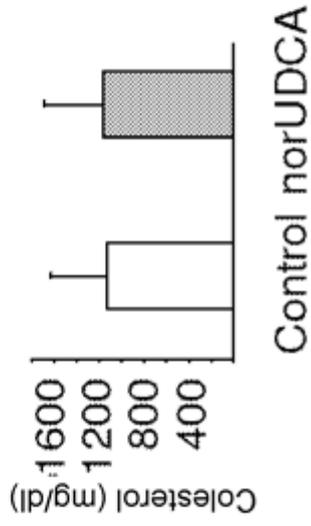


Figura 18: Estudio de prevención: cantidad de WAT (tejido adiposo blanco) y BAT (tejido adiposo marrón)

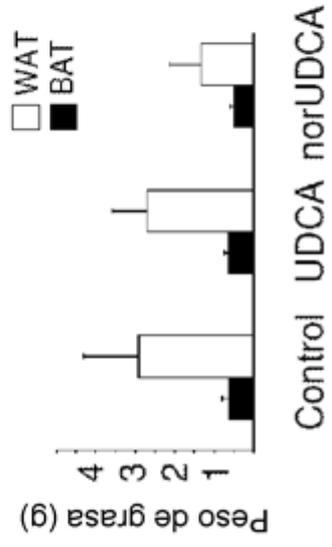


Figura 19: Estudio de prevención: aorta teñida con aceite rojo cortada longitudinalmente (*en face*)

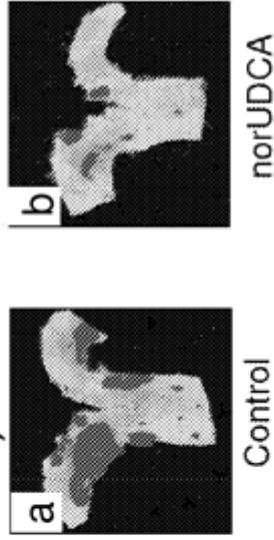


Figura 20: Estudio de prevención: % de placa en aorta teñida con aceite rojo cortada longitudinalmente (*en face*)

