(12) **PATENT**

(19) NO (11) **317063** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61K 31/575

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19982281	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1996.11.19 PCT/US96/18487
(22)	Inng.dag	1998.05.19	(85)	Videreføringsdag	1998.05.19
(24)	Løpedag	1996.11.19	(30)	Prioritet	1995.11.21, US, 560992
(41)	Alm.tilgj	1998.07.08			
(45)	Meddelt:	2004.08.02			

(71) Søker Children's Hospital Medical Center , 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229-3039, US
(72) Oppfinner Kenneth D R Setchell, 3849 Indianview Avenue, OH 45227 Cincinnati, US
(74) Fullmektig Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO

(54) Benevnelse **Anvendelse av UDCA (ursodeoksycholinsyre) for forebyggelse og behandling av leversykdom hos pattedyr**

(56) Anførte publikasjoner
EPA 117570
J Hepatol. 1993, 17,241-246 (N.Sano et al.)
J Hepatol. 1992, 15,77-84 (H. Takikawa et al.)
J Hepatol. 1993, 17,247-252(H. Takikawa et al.)
Arzneimittelforschung, 37(8), 1987,983-987 (N.Pacini et al.)

(57) Sammendrag

Et aspekt av oppfinnelsen er rettet mot en farmakologisk akseptabel sammensetning omfattende et sulfat av 3α,7β-dihydroksy-5β-cholan-24-oinsyre (ursodeoksycholinsyre eller "UDCA") og en farmasøytisk akseptabel bærer. I en foretrukket sammensetning er sulfatet UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat, UDCA-3,7-disulfat, glyco-UDCA-3-sulfat, glyco-UDCA-7-sulfat, glyco-UDCA-3,7-disulfat, tauro-UDCA-3-sulfat, tauro-UDCA-7-sulfat, tauro-UDCA-3,7-disulfat eller en kombinasjon derav. Et andre spektrum finnes en fremgangsmåte for administrasjon av UDCA til et pattedyr for å hemme eller behandle en forstyrrelse som omfatter administrering av et sulfat av UDCA til pattedyret i en mengde som er tilstrekkelig for å hemme eller behandle forstyrrelsen. For eksempel, kan et UDCA-sulfat bli benyttet med fordel for å hemme eller behandle en inflammatorisk tilstand i gastrointestinaltrakten, slik som coloncancer, rectumcancer, et neoplasma i colon, et neoplasma i rectum, karsinogenese i colon, karsinogenese i rectum, ulcerativ colitis, en adenomatøs polypp, familiær polyposis. Et sulfat av UDCA kan også bli administrert for å hemme eller behandle en inflammatorisk forstyrrelse i leveren. Et UDCA-sulfat kan bli benyttet for å forbedre serumbiokjemien i leveren ved sykdom eller leversykdom eller for å øke gallestrøm eller for å redusere biliær sekresjon av fosfolipid eller kolesterol. Ifølge et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en fremgangsmåte for opprettholdelse av et isolert organ ved perfusjon av organet med et sulfat av UDCA.

Oppfinnelsen angår anvendelse av 3α, 7β-dihydroksy-5β-cholan-24-oinsyre for fremstilling av et farmasøytisk preparat for forebyggelse og behandling av leversykdom hos pattedyr.

Bakgrunn for oppfinnelsen

3α,7ß-dihydroksy-5ß-cholan-24-oinsyre ("ursodeoksycholinsyre" eller "UDCA") har blitt benyttet klinisk i mer enn to dekader, initielt da det viste seg effektiv for behandling av pasienter med cholelitiasis og mer nylig for å vise seg lovende i behandling av pasienter med cholestatiske leversykdommer. Det er vel etablert at oral administrasjon av UDCA fører til signifikant forbedring i serumleverenzymer og basert på resultatene fra langtids-kliniske tester, er den generelle konsensus at UDCA er fordelaktig for behandling av tidlig-stadiums primær, biliær cirrhose. I tillegg, har kliniske tester vist at UDCA er fordelaktige ved å forbedre kliniske og biokjemiske indekser for hepatisk funksjon hos pasienter med sklerosing cholangitis, cystisk fibrose og kronisk hepatitis.

Trass de lovende effektene vist av UDCA i leversykdommer, er den eksakte mekanismen for dets virkning uklar. Tidligere spekulasjoner antydet at et skift i den hydrofobisk/hydrofiliske balansen av den biliære gallsyremassen var en viktig determinant for dets effektivitet, men nylige data støtter ikke totalt denne antagelse; og forbedring i leverfunksjonen er nesten helt sikkert resultat av en markert hypercholeresis indusert av UDCA, som muliggjør biliær ekskresjon av potensielt mer toksiske gallesyrer eller andre endogene midler.

I studier som fokuserer på metabolismen av UDCA hos pasienter med forskjellige leversykdommer, har opptreden av betydelige mengder av C-3-sulfatesteren av UDCA i urin konsistent blitt observert og denne spesifikke metabolitten har vist seg å være en nyttig markør for UDCA-ettergivenhet. I tillegg, hadde dyrestudier antydet at sulfatering av gallesyre kan representere en viktig metabolsk vei for forhindring av cholestasis og begrense hepatocellulær skade.

De cytotoksiske eller membran-skadende effektene av gallesyrer er relatert til deres fysikalsk-kjemiske egenskaper. Hydrofobe gallesyrer er markert mer membran-skadende enn hydrofile gallesyrer og relative indekser på cytotoksisitet har blitt etablert basert på retensjonsvolumet av gallesyrer i reversfase-høytrykksvæskekromatografisystemer fra partisjonskoeffisienter i oktanol/vann. Det er paradoksalt at den humane lever syntetiserer chenodeoksycholinsyre, et hydrofobt molekyl som er intrinsisk hepatotoksisk, som en av de primære gallesyrer; i cholestasis, kan den hepatiske akkumuleringen av denne

gallesyren initiere, bidra til eller forverre leverskade. Derimot, er UDCA, en 7ß-epimer av chenodeoksycholinsyre, meget hydrofil og har blitt vist å motvirke den membranskadende effekten til hydrofobe gallesyrer. Dette er et rasjonale for den terapeutiske anvendelsen av UDCA ved behandling av forskjellige leversykdommer. Etter den orale eller intravenøse administrasjon av UDCA, blir denne gallesyren effektivt biotransformert i leveren, hovedsakelig ved konjugering. Neglisjerbare konsentrasjoner og andeler av ikke-konjugert UDCA blir følgelig funnet i human lever, selv etter administrasjon av relativt høye doser.

UDCA kan også ha en terapeutisk rolle forbi deres anvendelse ved forskjellige leversykdommer. I så henseende, antyder data fra dyremodeller av coloniske karsinogenese, en protektiv rolle for UDCA.

Imidlertid, er faktisk levering av UDCA til colon problematisk, dvs. den vanlige terapeutiske dose administrert oralt (10-15 mg/kg kroppsvekt/dag), blir UDCA relativt godt absorbert fra tynntarmen og blir effektivt biotransformert i leveren hovedsakelig ved konjugering. Som en konsekvens er det ekstremt vanskelig å levere effektive mengder av UDCA spesifikt til colon.

Derfor, gitt denne begrensningen ved administrasjon til colon, ville det være ekstremt fordelaktig å ha en forbindelse, sammensetning eller fremgangsmåte hvor UDCA effektivt kan bli administrert til colon. Det vil også være ønskelig å ha en forbindelse, sammensetning eller metode som kan bli benyttet for å administrere UDCA effektivt til andre deler av den gastrointestinale trakt. I tillegg vil det være fordelaktig, sammensetning eller fremgangsmåte for anvendelse for effektivt å hemme eller behandle inflammatoriske forstyrrelser i gastrointestinaltrakten eller leveren.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår således anvendelse av et sulfat av 3α,7ß-dihydroksy-5ß-cholan-24-oinsyre (ursodeoksycholinsyre, UDCA) eller et salt av dette; og en farmasøytisk akseptabel bærer for fremstilling av et farmasøytisk preparat for inhibisjon eller behandling av en leversykdom hos et pattedyr. I en foretrukket anvendelse er sulfatet UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat, UDCA-3,7-disulfat, eller kombinasjoner derav.

Ifølge et aspekt angår oppfinnelsen en anvendelse der nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å hemme eller behandle en inflammatorisk tilstand i leveren.

Ifølge et annet aspekt angår oppfinnelsen en anvendelse der nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å administrere UDCA til tykktarmen til et pattedyr.

Ifølge et annet aspekt angår oppfinnelsen en anvendelse der nevnte sulfat omfatter en sulfatgruppe på C-7-karbonet, hvor nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å forbedre administrasjonen av UDCA til tykktarmen til et pattedyr i forhold til leveringen av UDCA til tykktarmen med UDCA eller et sulfat av UDCA uten en sulfatgruppe på C-7-karbonet.

Ifølge et annet aspekt angår oppfinnelsen en anvendelse der preparatet er formulert for oral, lokal eller intravenøs administrasjon og en anvendelse der preparatet er formulert for intravenøs administrasjon.

Et UDCA-sulfat kan bli benyttet for å forbedre serumbiokjemien i leversykdommer eller leverfunksjoner, for å øke gallestrøm eller redusere biliær sekresjon av fosfolipid eller kolesterol. I tillegg, kan sulfater av UDCA effektivt bli benyttet for å hemme eller behandle leversykdommer eller forbedre leverfunksjonen. Disse og andre fordeler vil bli forstått av fagmannen ved gjennomlesning av den følgende detaljerte beskrivelse.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1A og 1B viser en sammenligning av den totale massen av UDCA i hele jejunum (fig. 1A) og konsentrasjonen i levervev hos kontrollrotter (fig. 1B) etter oral administrasjon av UDCA, UDCA-3S, UDCA-7S og UDCA-DS. Gallesyrer blir separert ifølge deres konjugasjonsmodus ved anion-byttekromatografi før analyser av de individuelle fraksjoner ved anvendelse GC-MS. Resultatene blir uttrykt som gjennomsnittsverdier i alle dyr;

fig. 2 viser føkal gallesyreekskresjon hos kontrollrotter og rotter oralt administrert UDCA, UDCA 3-S, UDCA 7-S og UDCA-DS. Gallesyrer blir separert ifølge deres konjugasjonsmodus ved anion-byttekromatografi før analyse av de individuelle fraksjoner ved hjelp av GC-MS. Resultater er uttrykt som gjennomsnittsverdier for alle dyr;

fig. 3 viser forholdet av litocholinsyre/deoksycholinsyre i feces til kontrollrotter og rotter oralt administrert UDCA, UDCA 3-S, UDCA 7-S og UDCA-DS. Resultater er uttrykt som gjennomsnittsverdier for alle dyr;

fig. 4A-4D viser UDCA-konsentrasjon i levervev til rotter oralt administrert UDCA (fig. 4A), UDCA 3-S (fig. 4B), UDCA 7-S (fig. 4C) og UDCA-DS (fig. 4D). Gallesyre blir separert ifølge deres konjugasjonsmodus ved anion-byttekromatografi før analyse av individuelle fraksjoner ved anvendelse av GC-MS. Resultater er uttrykt som gjennomsnittverdier for alle dyr;

fig. 5A og 5B viser gjennomsnittlig biliær gallestrøm og gallesyre-resultatet hos Sprague-Dawley-rotter under i.v.-infusjon av UDCA og sulfatkonjugatene;

fig. 6A-6D viser forholdet mellom gallesyresekresjonshastighet og gallestrøm etter infusjon med UDCA og dets sulfatkonjugater;

fig. 7A og 7B viser gjennomsnittlig biliær kolesterol- og fosfolipidresultat hos Sprague-Dawley-rotter under i.v.-infusjon av UDCA og sulfatkonjugatene; og

fig. 8A-8E viser negativ ion FAB-MS-spekter til rotte-galle-preinfusjon (fig. 8A), under UDCA-infusjon (fig. 8B), under UDCA 3-S-infusjon (fig. 8C), under UDCA 7-S-infusjon (fig. 8D) og under UDCA-DS-infusjon (fig. 8E).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Ytterligere forkortelser som fremkommer nedenfor omfatter: GC (gass-væskekromatografi), GC-MS (gass-væskekromatografi-massespektrometri), FAB-MS (fast atom bombardment-massespektrometri), TLC (tynnsjiktskromatografi), HPLC (høy-ytelses-væskekromatografi), UDCA-3S (ursodeoksycholinsyre-3-sulfat), UDCA-7S (ursodeoksycholinsyre-7-sulfat), UDCA-DS (ursodeoksycholinsyre-3,7-disulfat), tBDMS-eter (tert-butyldimetylsilyleter) og tBDMC (tert-butyldimetylsilylklorid).

Data representert nedenfor sammenligner den intestinale metabolismen og oppførselen til de individuelle gallesyresulfatene av UDCA med den ikke-konjugerte gallesyre og viser, blant andre ting, at nærværet av C-7-sulfatgruppen beskytter mot bakteriell degradering og hemmer intestinal absorpsjon av UDCA.

MATERIALER OG METODER

Syntese og sulfaterte estere av UDCA

UDCA, 99% ren, ble anskaffet fra Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Monosulfat- og disulfatestere av UDCA ble fremstilt ved fremgangsmåter beskrevet i trinn-for-trinn-detalj senere i denne detaljerte beskrivelse. Kort, omfatter syntesen av monosulfat-esterne selektiv beskyttelse av hver av ringhydroksylgruppene i UDCA-molekylet, fulgt av sulfatering av den ikke-beskyttede hydroksylgruppen og hydrolyse av de beskyttede gruppene for å frigi monosulfatesteren. Disulfatkonjugatet av UDCA ble fremstilt ved reaksjon av UDCA med klorsulfonsyre. Gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) ble benyttet for å bekrefte posisjonen til sulfatgruppene ved analyse av produktene etter oksydering, solvolyse og omdanning til metyl/ester-trimetylsilyleterderivatene. Kromatografisk renhet av de syntetiske gallesalter ble funnet å være > 97% for UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat og > 95% for UDCA-3-sulfat, ifølge høy-trykksvæskekromatografi, tynnsjiktskromatografi og kapillær-kolonnegasskromatografi.

DYRESTUDIER

Sprague-Dawley-rotter (Harlan Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN), vekt 210-290 g, ble holdt i en 12 timers lys-mørke-cyklus og fôret med standard laboratoriefôr ad libitum i 3 dager. Dyrene ble så overført til metabolismebur hvor de ble huset individuelt og tilført samme diett. UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat ble administrert med sonde ved en dose på 250 mg/dag i 4 etterfølgende dager. Hver gruppe omfatter 3-6 rotter. Kroppsvekt til dyrene ble målt hver dag. På dag 5 ble dyrene avlivet ved blodtapping under eterbedøvelse. Plasma ble oppsamlet og frosset ved -20°C. Leveren ble fjernet, renset i normalt saltvann og flash-frosset i flytende nitrogen. Urin og feces ble oppsamlet hver 24. time og frosset ved -20°C. Alle dyr ble stelt i samsvar med "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" utgitt av National Academy of Sciences (National Institutes of Health publication nr. 86-23, revidert i 1985).

GALLESYREANALYSE

Ikke-konjugerte og sulfat-gallesyrer i intestinalt innhold og feces

Intestinalt innhold ble veid og dissekert i små biter. I hver gruppe ble feces (100 mg) fra alle dyr samlet på dag 4 i studien og så malt til en fin pasta. Alle prøver ble sonikert og sekvensielt oppvarmet med tilbakeløpskjøling i 80% metanol i 2 timer og kloroform/-metanol (1:1) i 1 time. Prøver ble tatt til tørrhet og tørkede ekstrakter ble resuspendert i

80% metanol (20 ml). Fraksjoner av det metanoliske ekstraktet (1/40 av intestinalt innhold og 1/20 av fecesprøver) ble fjernet og intern standard nordeoksycholinsyre (10 µg) tilsatt. Dette ekstraktet ble fortynnet med 0,01 mol/l eddiksyre (20 ml) og ledet først gjennom en kolonne Lipidex 1000 (kolonnestørrelse, 4 x 1 m; Parckard Instrument Co., Groningen, Nederland) og ble så gjennom en Bound-Elut C_{18}-kassett (Analytichem, Harbor City, CA). Gallesalter ble gjenvunnet ved eluering av Lipidex 1000-kolonnen og Bond-Elut-kassetten med metanol (henholdsvis 20 og 5 ml), og de sammenslåtte ekstraktene ble tørket. Ikke-konjugerte gallesyrer ble isolert og separert fra nøytral sterol og konjugerte gallesyrer ved lipofil anionbyttekromatografi på dietyl-aminohydroksypropyl-Sephadex LH-20 (Lipidex-DEAP; Package Instrument Co.). Gjenvinning av ikke-konjugerte gallesyrer ble oppnådd ved eluering med 0,1 mol/l eddiksyre i 72% etanol (7 ml), fulgt av avdamping av oppløsningsmidlet. Totalt konjugerte gallesyrer ble gjenvunnet med 9 ml 0,3 mol/l eddiksyre i 72% etanol, pH 9,6. Salter ble fjernet ved leding gjennom en Bond-Elut C_{18}-kassett etter tilsetning av nordeoksycholinsyre (10 µg) og konjugerte gallesyrer ble gjenvunnet ved eluering med 5 ml metanol. Solvolyse ble utført i en blanding av metanol (1 ml), destillert tetrahydrofuran (9 ml) og 1 mol/l trifluoreddiksyre i dioksan (0,1 ml), og oppvarmet til 45°C i 2 timer. Etter solvolyse ble ikke-konjugerte gallesyrer isolert ved kromatografi på Lipidex-DEAP. Metylesterderivater ble preparert ved oppløsning av prøven i metanol (0,3 ml) og reagering med 2,7 ml frisk destillert eterisk diazometan. Etter avdamping av reagensen ble metylesterderivatene omdannet til trimetylsilyletere ved ytterligere 50 ml Tri-Sil-reagens (Pierce Chemicals, Rockford, IL). En kolonne av Lipidex 5000 (Packard Instrument Co.) ble benyttet for å fjerne derivatiseringsreagenser og rense prøven.

Ikke-konjugerte og sulfatgallesyrer i plasma og urin

I hver gruppe ble urin fra alle dyrene oppsamlet på individuelle oppsamlingsdager. Dag 1 representerte basislinjeprøven, og prøver fra dagene 2, 3 og 4 ble tatt under gallesyreadministrering. Etter tilsetning av nordeoksycholinsyre (1 µg), ble gallesyrer kvantitativt ekstrahert fra deler av urin (3 ml) og plasma (1 ml) ved anvendelse av Bond-Elut C_{18}-kassetter. Etter væske-faststoff-ekstraksjon ble isolering og separering av ikke-konjugerte og konjugerte gallesyrer oppnådd ved lipofil anionbyttekromatografi på Lipidex-DEAP. Solvolyse av gallesyrekonjugater og isolering av de hydrolyserte produktene ble utført som beskrevet ovenfor og gallesyrer ble omdannet til flyktige metylester-trimetylsilyleterderivater.

Grad av gallesyrekonjugering i lever og jejunale innhold

Prøver fra lever (100 mg) ble malt til en fin pasta og gallesyrer ble ekstrahert med tilbakeløpskjøling og ledet gjennom en kolonne Lipidex 1000 som beskrevet ovenfor for intestinalt innhold og feces. Gruppeseparering av gallesyrer, ifølge deres konjugeringsmodus, ble oppnådd ved lipofil-anionbyttekromatografi. Ekstrakter fra hvert dyr ble oppsamlet og gallesyrer og deres konjugater ble separert ved anvendelse av Lipidex-DEAP og trinnvis eluering av kolonnen med de følgende buffere: 0,1 mol/l eddiksyre i 72% etanol (ikke-konjugerte gallesyrer); 0,3 mol/l eddiksyre i 72% etanol, pH 5,0 (glycinkonjugater); 0,15 mol/l eddiksyre i 72% etanol, pH 6,5 (taurinkonjugater; og 0,3 mol/l eddiksyre i 72% etanol, pH 9,6 (sulfatkonjugater). Etter avdamping av bufrene, ble sulfaterte gallesyrer solvolyserte, mens amiderte konjugater ble hydrolysert med 50 U cholylglycinhydrolase (Sigma Chemical Co.) i 2,5 ml 0,2 mol/l fosfatbuffer, pH 5,6, ved 37°C over natten. De resulterende ikke-konjugerte gallesyrene ble isolert på Lipidex-DEAP og metylester-trimetylsilyleterderivatene ble preparert som beskrevet ovenfor.

Etter solvolyse ble de amiderte gallesyrene fra jejunal andel av rotte-tynntarm isolert på Lipidex-DEAP ved eluering med 0,15 mol/l eddiksyre i 72% etanol, pH 6,5 (6 ml). Enzymatisk hydrolyse ble utført som beskrevet ovenfor og de resulterende ikke-konjugerte gallesyrene ble isolert og derivatisert som beskrevet ovenfor.

GC-MS

Metylester-trimetylsilyleterderivatene ble separert på en 30 m x 0,25 mm DB-1 fusert silika kapillærkolonne (J & W Scientific, Folson, CA) ved anvendelse av et temperaturprogram fra 225°C til 295°C med trinn på 2°C/min. og endelig isotermisk periode på 30 minutter. GC-MS-analyse ble utført ved anvendelse av Finnigan 4635-massespektrometer (Finnigan Inc., San Jose, CA), som hadde en identisk gasskromatografikolonne operert under de samme betingelser. Elektroionisering (70 eV) massespekter ble målt over masseområdet på 50800 dalton ved repetitiv scanning av de eluerte komponentene. Identifisering av gallesyrer ble gjort på basis av gasskromatografi-retensjonsindeks relativt til en homolog serie n-alkaner, referert til som metylen-enhetsverdi, og massespektret sammenlignet med autentiske standarder. Kvantifisering av gallesyrer ble oppnådd ved anvendelse av kromatografi ved sammenligning av topphøyderesponsen til de individuelle gallesyrene med topphøyderesponsen oppnådd fra den interne standard.

Væske-sekundær ioniseringsmassespektrometri

Væske-sekundær ioniseringsmassespektrometri negativ ionespekter av urinprøver ble oppnådd etter plassering av omkring 1 µl metanolekstrakt til en dråpe av glycerol/-metanol-matriks avsatt på en rustfri stålprobe. Denne proben ble innført i en ionekilde i en VG Autospec Q-massespektrometer og strålen av hurtige atomer av cesium ble generert fra cesiumiodid (35 KeV), ble avfyrt med målet inneholdende prøven. Negative ionespektre ble oppnådd over masseområdet fra 50-1000 dalton.

STATISTISK ANALYSE

Data uttrykt som gjennomsnitt ± standardavvik eller som gjennomsnittsverdi for alle dyr når ekstraktene ble oppsamlet før analyse. Resultater fra forskjellige grupper ble sammenlignet ved anvendelse av parede og ikke-parede two-tailed Student's t-tester. P-verdier på $< 0,05$ ble antatt å være statistisk signifikante.

RESULTATER

Intraluminal gallesyresammensetning langs tynntarmen

Gjennomsnittsvekten til de uttatte segmentene av tynntarmen for dyrene i kontrollgruppen og de administrert de individuelle gallesyrene var tilsvarende. I kontrolldyrene, var totalmengden av UDCA i jejunum (0,03 ± 0,01 mg) neglisjerbar, og utgjorde kun 0,3% av de totale gallesyrer. Imidlertid, var totalmassen til UDCA (og dets prosent av totale gallesyrer) i jejunum større i alle dyrene 24 timer etter administrasjon av den endelige dosen av UDCA, UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat, for å utgjøre henholdsvis 9,95 ± 0,49 mg (35,9%), 3,67 ± 0,45 mg (16,4%), 1,09 ± 0,34 mg (4,7%) og 0,21 ± 0,07 mg (2,0%). Dette resultatet indikerer meget liten konservering av UDCA når en sulfatgruppe er konjugert i C-7-posisjon (tabell 1).

Δ^{22}-UDCA, en spesifikk metabolitt av eksogent administrert UDCA, ble detektert i store proporsjoner og mengder i jejunum fra dyr administrert UDCA og UDCA-3-sulfat. Imidlertid, ble denne metabolitten ikke detektert i kontrollgruppen og sto for $< 3\%$ av de totale jejunale gallesyrene til dyrene administrert C-7-sulfatkonjugatene av UDCA (tabell 1).

Når konjugatmønsteret for UDCA i jejunum ble undersøkt etter separering av gallesyrer ved lipofil anionbyttekromatografi (figur 1), ble dyrene administrert UDCA funnet å ha hovedsakelig glyco- og tauro-UDCA, små mengder ikke-konjugert UDCA og neglisjer-

bare mengder sulfatert UDCA. Selv om amiderte og ikke-konjugerte former av UDCA ble funnet i jejunum etter administrasjon av C-7-sulfater, var totalmassen av UDCA i jejunum meget liten. I rotter administrert UDCA-3-sulfat, inneholdt jejunum betydelige andeler amidert UDCA, noe som indikerer signifikant biotransformering ved dekonjugering og/eller admidering.

Med hensyn på endogen gallesyrer, var cholinsyre den viktigste gallesyren i jejunum hos kontrolldyrene, og sto for 48,5 ± 2,9% (6,82 ± 1010 mg) av de totale gallesyrer og etter UDCA-administrasjon, var det betydelig reduksjon (P = 0,01) til 16,8% ± 1,3% (4,68 ± 0,65 mg). UDCA-3-sulfat forårsaket også en reduksjon (P = 0,05) i andelen av cholinsyre, men i mindre grad enn UDCA, mens administrasjon av C-7-sulfater av UDCA forårsaket en økning (P = 0,01) i andelen av cholinsyre i jejunum (tabell 1).

I colon til kontrolldyr, var de fleste av gallesyrene sekundære og ble identifisert hovedsakelig som deoksycholin- og ω-muricholinsyrer, men kun små mengder litocholinsyre ble detektert (tabell 2). UDCA-administrasjon forårsaket en reduksjon (P-= 0,003) i forholdet av deoksycholinsyre, og litocholinsyre ble den viktigste tilstedeværende gallesyren, og sto på 32,0% ± 0,8% av de totale gallesyrer (P = 0,0004). Derimot førte UDCA-7-sulfat- og UDCA-3,7-disulfat-administrasjon til betydelig reduksjon i massen og andelen av både dioksycholinsyre og litocholinsyre i colon.

FECAL GALLESYREEKSKRESJON

Ingen signifikante forskjeller ble funnet i vekten av feces ekskretert hver dag i gruppen av dyr. Total feces-gallesyreekskresjon hos dyr administrert UDCA, UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat var henholdsvis 14,85, 10,70, 12,65 og 10,88 mg/g feces. Feces til alle dyr ble anriket med UDCA; imidlertid, for de dyrene administrert med ikke-konjugert gallesyre, ble UDCA nesten eksklusivt funnet i ikke-konjugert form. Derimot, var det neglisjerbare konsentrasjoner av ikke-konjugert UDCA i feces til rotter administrert UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat; disse to konjugatene ble utskilt i feces hovedsakelig uforandret (figur 2). Konsentrasjonene av de viktigste gallesyrene utskilt i feces var forskjellig blant gruppene dyr. I UDCA-gruppen økte litocholinsyre markert fra kontrollverdier, mens den lokale ekskresjon av litocholinsyre etter UDCA-7-sulfat- og UDCA-3,7-disulfat-administrasjon, var redusert. En tilsvarende trend i deoksycholinsyre-ekskresjon ble funnet. Sammenlignet med normal rottefeces, økte forholdet av litocholinsyre/deoksycholinsyre mer enn 20 ganger når

UDCA ble administrert, økte 11 ganger med UDCA-3-sulfat-administrasjon og økte ikke når C-7-sulfater ble administrert (figur 3).

Gallesyresammensetning i levervev

Konsentrasjonen og andelene av de individuelle gallesyrene i levervev er oppsummert i tabell 3. UDCA-konsentrasjon var 12,0 nmol/g i kontrolldyr og sto for 2,8% av de totale hepatiske gallesyrene. Administrasjon av UDCA og C-3-sulfatet økte konsentrasjonen og forholdet i levervev UDCA (figur 1). I tillegg, ble Δ^{22}-UDCA funnet i lever i relativt høye andeler. Derimot, opptrådte markert reduksjon i total UDCA-konsentrasjon og prosent sammensetning når dyrene ble administrert C-7-sulfat-gallesyrene. UDCA-administrasjon resulterte i økt hepatisk litocholinsyrekonsentrasjon, mens reduksjon i litocholinsyre opptrådte etter administrasjon av sulfatkonjugatene. Deoksycholinsyre-konsentrasjonen ble redusert i alle gruppene med gallesyre-administrasjon, og reduksjonen var større for C-7-sulfatene. Levervev-cholinsyrekonsentrasjon avtok nesten 4 ganger når UDCA ble administrert, men økte svakt etter administrasjon av C-7-sulfat-konjugatene.

Etter administrasjon av individuelle gallesyrer, viste konjugering av UDCA i levervev at ikke-konjugert UDCA og dets C-3-sulfat begge ble biotransformert ved konjugering, hovedsakelig med taurin. Uansett den administrerte gallesyre, ble neglisjerbare konsentrasjoner og andeler av ikke-konjugert UDCA og sulfatert UDCA funnet i levervev i alle dyr (figur 4).

Gallesyresammensetning i plasma og urin

Ikke-konjugert UDCA-konsentrasjon i dyr administrert med UDCA var 4,8 ± 2,2 µmol/l, og denne verdien var signifikant større enn den funnet i dyrene administrert UDCA-3-sulfat (0,9 ± 0,4 µmol/l), UDCA-7-sulfat (0,7 ± 0,5 µmol/l) og UDCA-disulfat (1,0 ± 0,2 µmol/l). Sulfatert UDCA-konsentrasjoner var tilsvarende og < 0,3 µmol/l i alle dyregrupper.

Urinekskresjonen av UDCA var neglisjerbar (< 0,4 nmol/dag) før gallesyre-administrasjon hos alle dyr. Etter UDCA var urinekskresjonen av ikke-konjugert UDCA 642,7 nmol/dag. Dette var signifikant mer enn konsentrasjonen av UDCA utskilt i urin i dyr administrert sulfatkonjugatene (UDCA-3-sulfat, 5,2 nmol/dag; UDCA-7-sulfat, 1,8 nmol/dag; og UDCA-3,7-disulfat, 1,3 nmol/dag). Sulfatkonjugater av UDCA ble funnet i urin etter administrasjon av ikke-konjugert UDCA (4,6 nmol/dag), UDCA-3-sulfat (2,7 nmol/dag), UDCA-7-sulfat (317,8 nmol/dag) og UDCA-3,7-disulfat (217,1 nmol/dag).

Selv om dette representerer < 0,05% av den daglig administrerte dose, var det mulig å detektere disse gallesyrekonjugatene ved væske-sekundær ioniseringsmassespektrometrianalyse.

DISKUSJON

Levervev UDCA-konsentrasjoner økte markert med oral administrasjon av UDCA og denne gallesyren var hovedsakelig konjugert med amidering. Neglisjerbare mengder av ikke-konjugert UDCA ble funnet (figur 4) og med hensyn til dette er dets metabolisme tilsvarende til den hos mennesker. Derimot, når C-7-sulfat- og disulfatkonjugatene ble administrert, var hepatiske konsentrasjoner av UDCA lave sammenlignet med kontrolldyr, noe som indikerer at disse konjugatene ikke ble absorbert fra tynntarmen og således var der en neglisjerbar konservering av UDCA. Hepatisk UDCA-konsentrasjoner økte etter administrasjon av C-3-sulfat og det faktum at den var hovedsakelig amidert, indikerte at signifikant desulfatering og amidering av UDCA-3-sulfat hadde skjedd. Mønsteret for konjugering av UDCA i jejunum var parallell med den i levervev, bortsett fra at UDCA og UDCA-3-sulfat administrerte grupper hadde en høyere andel av ikke-konjugert UDCA til stede (figur 1). Tidligere studier av gallesyreføring har vist at maksimum anriking av gallesyremassen ble oppnådd ved dag 4 og forlenget føring resulterer i ingen ytterligere endring i gallesyresammensetning.

Mangel på intestinal absorpsjon av C-7-sulfater av UDCA er ytterligere reflektert i gallesyresammensetningen i feces. Den fecale konsentrasjonen av totalmengden av UDCA i dyrene administrert med UDCA-7-sulfat og UDCA-3,7-disulfat var markert større enn den funnet i feces i dyrene administrert UDCA eller UDCA-3-sulfat. I tillegg, ble C-7-sulfater av UDCA hovedsakelig utskilt uendret i feces. Disse funnene kan bli forklart ved substratspesifisiteten til bakterielle sulfater som har blitt tidligere vist å være aktive kun mot C-3-gallesyresulfater. UDCA-administrasjon hadde markert effekt på fecal ekskresjon av de viktigste sekundære gallesyrene og litocholin- og deoksycholinsyrer. En stor økning av fecal litocholinsyrekonsentrasjon opptrådte når ikke-konjugert UDCA og UDCA-3-sulfat ble administrert, men UDCA-7-sulfat- og UDCA-3,7-disulfat-administrasjon hadde ingen signifikant effekt på fecal utskilling av disse sekundære gallesyrene.

Økningen i fecal og hepatisk litocholinsyrekonsentrasjon kan bli forklart ved intestinal bakteriell biotransformasjon av UDCA og, til en mindre grad, dets C-3-sulfat. Biotransformasjon av UDCA til litocholinsyre opptrer i tilsvarende grad i både rotter og

mennesker. En økning i deoksycholinsyre i feces til dyr administrert UDCA er i samsvar med den kjente kompetitive hemmingen av cholinsyreopptak i den terminale ileum, som fører til øket overstrømming inn i colon og påfølgende 7α-dehydroksylering for å danne deoksycholinsyre. Det er interessant at UDCA-C-7-sulfat synes å ha den motsatte effekt; cholinsyrekonsentrasjoner i levervev ble øket svakt sammenlignet med kontrolldyr og fecal cholinsyre- og deoksycholinsyrekonsentrasjoner ble redusert.

I lys av det faktum at UDCA gjennomgår signifikant biotransformering til litocholinsyre og øker fecal deoksycholinsyrekonsentrasjon, begge sterkt hydrofobe gallesyrer, er det kanskje overraskende at fordelaktige effekter av UDCA har blitt vist i dyremodeller av kjemisk indusert coloncancer. I disse modellene har det blitt trukket den slutningen at hydrofobe gallesyrer fremmer tumorvekst. Rektal og oral administrasjon av gallesyrer, galle-avledning til cecum, cholestyraminføring, diettfett og visse fibere, er tilstander som alle øker strømningen av gallesyrer gjennom colon, øker tumordannelsen, i samsvar med en fremmende effekt. In vitro-studier indikerer at deoksycholinsyre og litocholinsyre er komitogene og øker colons epiteliske celleproliferasjonshastighet. Andre effekter på ornitindekarboksylase-aktivitet og HLA-klasse I- og II-antigener er også blitt vist.

Det er forskjellige mulige forklaringer på den kjemopreventive effekten av UDCA. Eventuelle skadelige effekter av øket litocholinsyredannelse i colon kan være bufret ved nærværet av relativt høye konsentrasjoner av UDCA på en måte tilsvarende til den cytoprotektive effekten av UDCA når den blir koinkubert in vitro eller koinfusert in vivo med hydrofobe gallesyrer som er membranskadelige. Alternativt, kan beskyttende effekter være et resultat av redusert deoksycholinsyrekonsentrasjon i colon, noe som vil bety at deoksycholinsyre er av stor viktighet i fremmingen av coloncancer. På tross av tilsvarende reduksjon i colonsk deoksycholinsyre med administrasjon av sulfaterte gallesyrer, kan C-7-sulfatene av UDCA i prinsippet være overlegne UDCA, der disse konjugatene ikke blir biotransformert til mer hydrofobe gallesyrer. Alternativt, kan mangelen av absorpsjon av C-7-sulfatene i tynntarmen tillate anvendelsen av lavere doser for å åpne tilsvarende kjemopreventive effekter.

Rollen av gallesyrer i human colonisk karsinogenese er mindre klar. Tidlige studier indikerer at fecal gallesyreekskresjon, spesielt litocholinsyre og deoksycholinsyre, ble øket i pasienter med coloncancer, adenomatøse polypper og familiær polyposis, selv om disse funnene ikke er underbygget av flere andre granskere. Sammenlignet med kontroller, har pasienter med coloncancer eller adenomatøse polypper blitt rapportert å ha øket vannfase litocholinsyre- og deoksycholinsyrekonsentrasjoner i feces, og disse

konsentrasjonene korrelerer med graden av colonisk celleproliferasjon. På tross av å eliminere data som støtter en kjemoprotektiv og/eller cytoprotektiv effekt av UDCA i dyremodellen av coloncancer en in vitro-cellesystemer, kan den økede litocholinsyre-dannelsen etter UDCA-konsentrasjon begrense totaleffektiviteten av UDCA i colon. Litocholat/deoksycholat-forholdet i feces blir markert øket etter UDCA- og UDCA-3-sulfat-administrasjon sammenlignet med kontroller (figur 3). Dette kan være mindre ønskelig, da forholdet av fecal litocholat/deoksycholat blir øket hos pasienter med coloncancer og i pasienter med høy risiko for sykdom og er foreslått å være av diagnostisk verdi. På den annen side, resulterte UDCA-7-sulfat- og UDCA-3,7-disulfat-administrasjon ikke i noen endring i litocholat/deoksycholat-forhold. Selv om dette ikke statistisk signifikant, ble en tendens mot reduksjon av dette forholdet observert, mens den kvantitative fecale ekskresjon av disse sekundære gallesyrene var tilsvarende som kontrolldyrene.

Videre, som diskutert ovenfor, økte introduksjonen av en sulfatgruppe i posisjon C-7 i UDCA sterkt hydrofilisiteten til molekylet, noe som forhindrer intestinal absorpsjon, for derved å muliggjøre sete-spesifikk administrasjon av UDCA til colon. I motsetning til ikke-konjugert UDCA som gjennomgår omdanning til litocholinsyre for derved å øke det fecale litocholinsyre/deoksycholinsyre-forholdet, antatt en risiko for colonisk sykdom, er C-7-sulfatene metaboliske inert. Derfor, kan disse konjugerte gallesyrene være mer effektive kjemoprotektive midler enn UDCA i colon.

METABOLISME OG EFFEKT AV SULFATESTERE AV RSODEOKSY-CHOLINSYRE PÅ GALLESTRØM OG BILIÆR LIPIDSEKRESJON HOS ROTTER

C-3- og C-7-sulfatestere og disulfatkonjugatene av UDCA ble fremstilt som diskutert trinn-for-trinn umiddelbart nedenfor. Deretter ble den hepatiske metabolismen til disse gallesyrene i gallefistula undersøkt og disse gallesyrene ble sammenlignet med UDCA for å etablere deres effekt på gallestrøm og biliær lipidsekresjon.

MATERIALER OG METODER

Syntese av ursodeoksycholinsyre-3-sulfat (UDCA-3S)

Imidazol (3,5 g) og tert-butyldimetylsilyklorid (1,6 g) ble tilsatt til en iskald oppløsning av UDCA (2 g) i vannfri dimetylformamid (1,5 ml) -pyridin (0,75 ml) og blandingen ble omrørt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble så helt i isvann (20 ml) og ekstrahert

med etylacetat (100 ml). Det organiske laget ble vasket med vann, tørket over vannfri Na_2SO_4 og avdampet. Den oppnådde oljeaktige resten ble oppløst i heksan-etylacetat (3:1, volum, 250 ml) og filtrert gjennom en 40 g kolonne silikagel (28-200 mesh, Aldrich Chemical Co. Inc., Wisconsin). Etter avdamping av oppløsningen ble resten oppløst i etanol og produktet, UDCA-3-tbDMS-eter (2,15 g, utbytte 83%) ble krystallisert. Behandling av UDCA-3tBDMS-eter (2,0 g) med eddiksyreanhydrid (20 ml) og pyridin (20 ml) ved romtemperatur i 5 ga UDCA-7-acetat-3-tbDMS-eter som et oljeaktig produkt. Til oppløsningen av UDCA-7-acetat-3-tbDMS-eter i aceton (24 ml) ble det tilsatt 18% HCl (2,4 ml) og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Det resulterende produktet ble ekstrahert i etylacetat, vasket med vann, tørket over vannfri Na_2SO_4 og oppløsningsmidlet avdampet for å gi ursodeoksycholinsyre-7-acetat som et oljeaktig produkt. Klorsulfonsyre (1,2 ml) i vannfri pyridin (12 ml) ble tilsatt til en iskald oppløsning av UDCA-7-acetat (1,2 g) og oppløsningen ble oppvarmet til 50°C. Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen avsluttet ved tilsetning av vann (400 ml) og produktet ble absorbert på en stor kassett av oktadecylsilan-bundet silika, MEGA-BOND-ELUT (Varian, Harbor City, CA) og gjenvunnet ved eluering med metanol. Metanolekstraktet ble avdampet til tørrhet og pyridiniumsaltet av UDCA-7-acetat-3-sulfat ble så omdannet til dinatriumsaltet ved oppløsning i 0,2M metanolisk NaOH-oppløsning (40 ml) og filtrert. Filtratet ble fortynnet med kald eter (400 ml) og utfellingen ble oppsamlet, vasket med kald eter og tørket. Faststoffet (1,0 g) ble oppløst i MeOH (10 ml), 3,5M NaOH (10 ml) ble tilsatt og oppløsningen ble omrørt ved romtemperatur i 18 timer. Produktet ble ekstrahert med MEGA-BOND-ELUT etter fortynning med vann (500 ml). Metanolekstraktet fra kassetten ble avdampet til tørrhet, oppløst i 0,2M metanolisk NaOH (30 ml) og filtrert. Filtratet ble fortynnet med kald eter (300 ml) og den resulterende utfellingen ble oppsamlet og vasket med eter. Prosedyren ble gjentatt tre ganger med metanol (20 ml) og eter (200 ml) for å gi dinatriumsaltet av UDCA-3-sulfat (0,62 g, utbytte 50%).

Syntese av ursodeoksycholinsyre-7-sulfat (UDCA-7S)

Klorsulfonsyre (0,9 ml) i vannfri pyridin (9 ml) ble tilsatt til en iskald oppløsning av UDCA-3-tbDMS-eter (900 mg) og blandingen ble oppvarmet til 50°C. Etter 30 minutter ble reaksjonen avsluttet ved tilsetning av vann (400 ml). Det utfelte pyridiniumsaltet av UDCA-3-tbDMS-7-sulfat ble vasket med vann, tørket under vakuum og hydrolysert med HCl som beskrevet ovenfor. Produktet ble ekstrahert med en kassett MEGA-BOND-ELUT og isolert som beskrevet ovenfor for å gi dinatriumsaltet av UDCA-disulfat (1,1 g, 91% utbytte).

Gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) ble benyttet for å bekrefte posisjonen til sulfatgruppene i alle syntetiserte forbindelsene etter oksydering, solvolyse og omdanning til metyltrimetylsilyl (Me-TMS)-eterderivatene. Kromatografisk renhet til de syntetiske forbindelsene ble funnet å være > 97% ifølge høytrykksvæskekromatografi (HPLC), tynnsjiktskromatografi (TLC) og kapillær kolonne-gasskromatografi (GC).

Dyrestudier

Hannkjønns-Sprague-Dawley-rotter (kroppsvekt 200-230 g) ble bedøvet ved intraperitoneal injeksjon av pentobarbital (Nembutal, 7,5 mg/100 g kroppsvekt) og holdt under bedøvelse ved ytterligere doser. Den høyre jugulare vene og hovedgallegangen ble kanulert ved anvendelse av PE-50-polyetylenslange (Clay-Adams, Parsippany, N.J.). Kroppstemperatur ble holdt gjennom eksperimentet ved 37°C ved hjelp av en rektal probe og en termostat-kontrollert varmpute (Harvard Apparatus Co., Inc., Millis, Mas.). Saltvann ble infusert ved en hastighet på 1,0 ml/time ved anvendelse av en Harvard-pumpe (Harvard Apparatus Co., Inc.) i den jugulare venen i en kontrollperiode på 2 timer. Etter oppsamling to 10 minutters galleprøver for basislinje-analyse, ble gallesyrene individuelt infusert intravenøst (i.v.) i 30 minutter i trinnvis økende doser (0,5, 1,0 og 2,0 µmol/min/100 g kroppsvekt). Gallesyreoppløsninger ble preparert i 3% humant albumin i 0,45% saltvann. Seks dyr ble benyttet for hvert eksperiment og gallen ble oppsamlet hvert 10. minutt i forveide rør. Ved slutten av eksperimentet ble blod tatt ved hjertepunktering og urin ble tatt ved tømming av blæren. Alle biologiske prøver ble lagret ved -20°C. Dyrestudieprotokollen (#1B10044) ble godkjent ved Bioethic-komiteen ved Children's Hospital Medical Center (Cincinnati, Ohio).

Analytiske teknikker

TLC ble utført på forhåndsbelagte silikagel G-plater (Merck, 0,2 mm tykkelse) ved anvendelse av et oppløsningsmiddelsystem av n-butanol-eddiksyre-vann (10:1:1, volum). Flekkene ble visualisert ved sprøyting med 10% etanoloppløsning av fosfomolybdensyre, fulgt av oppvarming ved 120°C i 5 minutter.

HPLC ble utført ved anvendelse av et Varian 5000 HPLC-instrument (Varian Associates Inc., Palo Alto, CA) utstyrt med en variabel bølgelengde UV-detektor og med en 25 x 0,46 cm Hypersil ODS-kolonne (5 µm partikkelstørrelse, Keystone Scientific, Bellefonte, PA). Kolonnen ble drevet ved omgivelsestemperatur og eluerings-oppløsningsmidlet var metanol - 0,01M fosfatbuffer (65:35, volum), justert til p 6,8 og modifisert fra fremgangsmåten ifølge Rossi et al. (High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and

unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile ducts., J. Lipid Res. 28: 589-595 (1987)). Strømningshastighet var 1,0 ml/min. og gallesyrer ble detektert ved absorpsjon ved 205 nm.

GC ble utført på en Hewlett-Packard 5890 gasskromatograf med en 30 meters DB-1 (4 mm indre diameter; 0,25 μm film) fusert silika kapillærkolonne (J. og W. Scientific Inc., Rancho Cordova, CA) og ved anvendelse av et temperaturprogram fra 225°C til 295°C med økning på 2°C/min. med initiell og endelig isotermale perioder på henholdsvis 2 minutter og 30 minutter. Helium ble benyttet som bæregass med en strømningshastighet på 1,8 ml/min.

GC-MS ble utført på enten et VG Autospec Q magnetsektorinstrument eller et Finnigan 4635 kvadruplet GC-MS-DS-instrument med identiske GC-kolonner og drevet under samme kromatografiske betingelser. Elektron-ionisering (70 eV) massespektra ble registrert over et masseområde på 50 til 1000 Da/e ved respektiv scanning av elueringskomponentene.

Negativ ion-fast-atom-bombardment-massespektrometri (FAB-MS) spektra av galleprøver, urin og syntetiske forbindelser ble oppnådd etter anbringelse av ekvivalenten av omkring 1 μl av det opprinnelige galleekstraktet, 10 μl - 50 μl av urinekstraktet og μg mengder av syntetiske gallesyrer oppløst i metanol i en liten dråpe glycerolmatriks satt på et kobbermål på FAB-proben. Proben ble innført direkte i ionkilden i massespektrometeret og en stråle hurtige atomer av enten xenon generert fra en saddle-field-atomkanon (Ion Tech, Teddington, Middlesex, UK) drevet ved 8 kV og 20 μA, eller cesium generert fra cesiumiodid (35 kV), ble avfyrt ved målet inneholdende prøven. Negative ionspektere ble oppnådd over masseområdet på 50-1000 Da/e.

Galleanalyse

Gallevolum ble bestemt gravimetrisk ved antagelse av en densitet på 1 g/ml. Total 3α-hydroksy-gallesyrekonsentrasjon i gallen ble målt enzymatisk før solvolyse (ikke-sulfaterte gallesyrer) og etter solvolyse (totale gallesyrer) (Mashige, F., et al., Direct spectrometry of total bile acids in serum. Clin Chem., 27: 1352-1356 (1981)). Gallesyreproduksjonen ble beregnet ved å multiplisere hastigheten av gallestrøm med gallesyrekonsentrasjonen. Gallefosfolipider ble bestemt ved en enzymatisk prosedyre basert på cholinoksydasemetoden (Nippon Shoji Kaisha, Ltd., Osaka, Japan) (Grantz, D., et al., Enzymatic measurement of choline-containing phospholipids in bile. J. Lipid Res., 22: 273-276 (1981)). Kolesterol ble også målt enzymatisk (Boehringer Mannheim,

Indianapolis, IN) (Fromm, H., et al., Use of a simple enzymatic assay for cholesterol analysis in human bile. J. Lipid. Res., 21: 259-261 (1980)).

Biliær og uringallesyreanalyse

For bestemmelse av hepatisk biotransformering av den infuserte gallesyre, ble galle-oppsamlinger fra 6 dyr oppsamlet og biliære gallesyrer ble bestemt ved GC-MS etter ekstraksjon, solvolyse, hydrolyse og derivatisering. Kvantifisering av gallesyrer ble oppnådd ved anvendelse av GC, ved sammenligning av topphøyderesponsen til de individuelle gallesyrene med toppresponsen oppnådd fra den interne standard nordeoksycholinsyre tilsatt til den initielle galleprøven. Identifisering av en gallesyre ble gjort på basis av retensjonsindeksen i forhold til en homolog serie av n-alkaner, referert til som metylen-enhetsverdien (MU) og fragmenteringsmønsteret til massespekteret ble sammenlignet med autentiske standarder. En liste på over 100 massespektere av autentiske gallesyrestandarder og retensjonsindekser ble nylig kompilert som en referansekilde (Lawson. A.M., et al., Mass spectrometry of bile acids, The Bile Acids, vol. 4, Methods and Applications, sidene 167-267 (1988)). Urinoppsamling fra 6 dyr ble oppsamlet og gallesyre ble ekstrahert ved væske-fastfase-ekstrahering ved anvendelse av Bond Elut-C_{18}-kassett og gallesyre ble analysert ved GC-MS etter solvolyse, hydrolyse og derivatisering.

Gruppeseparering av gallesyrer ved anvendelse av lipofil anionkromatografi

I dette tilfellet ble dyrene infusert med UDCA-3S, galle ble oppsamlet under den endelige perioden av gallesyre-infusjon (1,0 µmol/min/100 g kroppsvekt). Gallesyre ble solvolysert og separert i grupper basert på deres konjugasjonsmodus ved anvendelse av den lipofile anionbyttegelen, dietylaminohydroksypropyl-Sepahdex LH-20; Packard Instruments, Groningen, Nederland). Gallesyresammensetningen ble bestemt ved hver fraksjon ved GC-MS etter hydrolyse og preparering av Me-TMS-eterene.

Statistiske metoder

Resultater ble uttrykt som gjennomsnitt ± standard avvik (SEM). Gallestrøm og biliært lipid resultat er uttrykt som µl/min/g lever og nmol/min/g lever. Statistisk analyse ble gjort ved anvendelse INSTAT-program (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Parametriske data blant grupper ble analyser ved anvendelse av Students t-test. Den statistiske sammenligningen mellom forskjellige grupper ble gjort ved en en-veis-variansanalyse (ANOVA). Når verdiene ble funnet å være signifikante med hensyn på infusjon av forskjellige gallesalter, ble sammenligning av hvilke som helst to grupper gjort ved Bonferronis t-test. Lineære regresjonsanalyser ble utført. Choleretisk aktivitet

av hver gallesyre ble bestemt ved helningen av regresjonslinjen av korrelasjonen mellom gallesyresekresjonsraten og gallestrømmen og var uttrykt som µl/µmol. Sammenligninger mellom helningen ble gjort ved en en-veis-ANOVA.

RESULTATER

Gallestrøm og gallesyresekresjon

Effektene av i.v.-infusjon av UDCA, UDCA-3S, UDCA-7S og UDCA-DS på gallestrøm og gallesyresekresjonshastighet er angitt i figurene 5A og 5B og oppsummert i tabell 4. Alle gallesyrer var markert choleretiske og størrelsesorden til gallestrømmen var UDCA-3S < UDCA < UDCA-7S = UDCA-DS. Biliær gallesyresekresjonshastighet økte hos alle dyr når infusjon med UDCA-3S, UDCA, UDCA-DS og UDCA-7S til et maksimum på henholdsvis 138,9 ± 11,8, 145,1 ± 17,3, 222,4 ± 24,3 og 255,4 ± 18,2 nmol/min/g lever. For sammenligningen, var gjennomsnittlig basis gallesyresekresjon 40,4 ± 4,2 nmol/min/g lever. Forholdet mellom gallesyresekresjonshastighet og gallesyrestrøm etter infusjon av hver gallesyre er vist i figur 6. Den tilsynelatende choleretiske aktiviteten til UDCA, UDCA-7S, UDCA-3S og UDCA-DS beregnet fra skråningen av regresjonslinjene var henholdsvis 16 ± 2, 15 ± 1, 13 ± 1 og 16 ± 1 µl/µmol. Skjæringen av linjene indikerte at gallesyreuavhengig gallestrøm var av samme størrelsesorden (1,7 µl/min/g lever) for alle gruppene dyr.

Biliær lipidsekresjon

Effekten av infusjon av UDCA og dets sulfatkonjugater på biliær output av kolesterol og fosfolipider er vist i figurene 7A og 7B. På det første 40 minuttene ble infusjon av UDCA og UDCA-7S, økte biliær kolesterol, for å nå en maksimum sekresjonshastighet på henholdsvis 1,88 ± 0,19 og 1,76 ± 0,21 nmol/min/g lever og kolesterolsekresjon ble holdt med UDCA-7S, men viste en signifikant reduksjon når UDCA ble infusert, selv med en trinnvis økning av dosen. I pre-infuseringsperiodene var de gjennomsnittlige tilsvarende sekresjonshastighetene for kolesterol henholdsvis 1,46 ± 0,1 og 1,42 ± 0,16 nmol/min/g lever. Derimot, reduserte infusjon av UDCA-3S og UDCA-DS signifikant den biliære kolesterol output på henholdsvis 0,40 ± 0,05 og 0,37 ± 0,12 nmol/min/g lever, sammenlignet med basisverdien. Biliær fosfolipidsekresjon økte signifikant med UDCA- og UDCA-7S-infusjon, men derimot forårsaket UDCA-3S og UDCA-DS signifikant reduksjon i biliær fosfolipid (tabell 4).

Negativ ion FAB-MS-analyse av biliære og urinare gallesyrer

Negativ ion FAB-MS-spekter av oppsamlet rottegalle oppsamlet før (basisperiode) og under infusjon av ikke-konjugert UDCA er vist i figurene 8A og 8B. Ionene m/z 514 og m/z 498 i basisgalleprøvene står for taurinkonjugatene av henholdsvis trihydroksy- og dihydroksy-cholanoatene og står for primære gallesalter som er hovedforbindelsene i rottegalle. Under infusjon av UDCA ble de fremtredende ionene i spektrene m/z 498 og m/z 448, noe som indikerer at infusert UDCA nesten eksklusivt konjugerte med taurin og glycin. Ionet ved m/z 471 indikerer et dihydroksycholanoat (UDCA)-sulfat, mens de ved m/z 567 og m/z 589 (natriumaddukt) står for flukuronidkonjugater av UDCA.

Under infusjon med UDCA-7S var de fremtredende ionene i spekteret (figur 8D) m/z 471 og dets natriumaddukt m/z 493 og disse ionene representerer uendret UDCA-7S. Ingen andre signifikante ioner var til stede for å indikere ytterligere metabolske transformasjon av UDCA-7S.

Under infusjon av UDCA-3S bekreftet ioner ved m/z 471 og m/z 493 (natriumaddukt) biliær sekresjon av uendret gallesyre og ionene ved m/z 550 og m/z 600 reflekterer amidering med glycin og taurin (figur 8C).

Under infusjon av UDCA-DS, var de fremtredende ionene m/z 471 og m/z 493 (natriumaddukt) og m/z 573. Ionet på m/z 573 representerer UDCA-DS og m/z 471 og m/z 493 er fragmentioner. Ingen andre ioner var til stede for å antyde ytterligere metabolske transformering av UDCA-DS (figur 8E).

GC-MS-analyse av biliære gallesyrer

Tabell 5 oppsummerer de relative prosentvise sammensetningene av individuelle gallesyrer i gallen etter infusjon av UDCA og de forskjellige sulfatkonjugatene. I basistilstand, var cholinsyre, α-muricholinsyre og ß-muricholinsyre hovedgallesyrene i rottegalle. Under infusjon av alle forbindelsene, ble UDCA den fremtredende biliære gallesyren og prosentsammensetningen var tilsvarende blant alle grupper, noe som indikerer at alle de sulfaterte galleesterne ble tatt opp i leveren og effektivt utskilt i gallen.

Det var ingen tegn som støttet noen biotransformasjon inkludert amidering av C-7-sulfat og disulfatestrene av UDCA, imidlertid, ble både ikke-konjugert UDCA og UDCA-3S metabolisert ved ytterligere hydroksylering, mest sannsynligvis i sidekjeden, imidlertid

er fremdeles den ikke den eksakte strukturen til denne hydroksylerte metabolitten definitivt etablert.

Separasjon av gallesyrekonjugater utskilt i gallen under infusjon av UDCA-3S indikerer at like proporsjoner (25%) av infusert gallesyre ble gjenvunnet som taurin- og glycin-konjugater, mens UDCA ble nesten eksklusivt konjugert med taurin og glycin. På grunn av mangelen av biotransformasjon av UDCA-7S og UDCA-DS, bekreftet ved FAB-MS, ble ytterligere konjugatsepareringsstudier ansett å være unødvendige.

Urinare gallesyreanalyser

Negativ ion FAB-MS-analyse av alle urinprøvene indikerte at sulfatestrene av UDCA alle ble utskilt i urin, og dette ble bekrefte ved GC-MS-analyse. Kvantitativt var imidlertid den relative andelen av UDCA-sulfat utskilt i urin liten sammenlignet med den biliære ekskresjonen som var hovedeliminerings veien. Når UDCA ble infusert, kom neglisjerbare andeler (0,01%) av den totale administrerte dosen til syne i urinen. For UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat og UDCA-disulfat var de tilsvarende andelene av administrert dose som kom frem i urinen henholdsvis 2,8%, 0,9% og 2,2%.

DISKUSJON

Resultatene angitt ovenfor viser at, som UDCA, er alle sulfatkonjugatene markert choleretiske og øker gallesyresekresjonen. Størrelsesorden av maksimal gallestrøm for de individuelle gallesyrer var UDCA-DS = UDCA-7S > UDCA > UDCA-3S og er ikke direkte relatert til deres relative hydrofobe/hydrofile natur som bestemt ved HPLC-retensjonsindekser.

Nærværet av en sulfatgruppe i C-7-posisjon i gallesyrekjerner resulterte i en betydelig høyere gallestrøm enn den indusert av UDCA, mens C-3-sulfatet, selv om det er choleretisk, var mindre effektivt i å stimulere gallestrøm enn ikke-konjugert UDCA. Disse forskjellene kan bli forklart ved det faktum at signifikant amidering av C-3-sulfatet skjer under første gangs passasje i leveren, mens en sulfatgruppe i posisjon C-7 forhindrer biotransformasjon. Det er mulig at de amiderte sulfatene har lavere choleretiske egenskaper. Det er interessant at de relative andeler av UDCA som kommer til syne i gallen var tilsvarende for alle gallesyrene som var undersøkt, selv om det var signifikante forskjeller i gallestrømmen blant disse forbindelsene.

Med hensyn på kolesterol og fosfolipidsekresjon var en klar tendens tydelig. Gallesyrene som var mest polare (ifølge deres HPLC-retensjonsindekser) ble funnet å forårsake en signifikant reduksjon i biliær kolesterol- og fosfolipid-output. Dette forholdet mellom gallesyre-hydrofobisitet/hydrofilisitet og kolesterol og fosfolipidsekresjon er sannsynligvis assosiert med detergensiteten til molekylet, dvs. desto mindre detergente og høyt polare gallesyresulfater, desto mindre membranskadelige er de enn mer hydrofobe gallesyrer.

De kombinerte effektene av en lavere kolesterol- og fosfolipidsekresjon og høyere hypercholeresis indusert ved høyt hydrofile 3-sulfat- og 3,7-disulfatkonjugater av UDCA sammenlignet med ikke-konjugert UDCA, vil antyde at disse bestemte gallesyresulfatene kan være enda mer effektive midler for behandling av cholestatisk leversykdom.

Markerte forskjeller i hepatisk biotransformering av individuelle UDCA-sulfater ble observert. F.eks., hindret substitusjon av en sulfatgruppe i C-7-posisjon i kjernen hepatisk biotransformasjon slik at UDCA-7-sulfat og UDCA-disulfat begge ble utskilt uendret i gallen. Dette var ikke tilfellet for C-3-sulfatet av UDCA som ble utskilt i gallen i en begrenset grad, uendret, men som også gjennomgikk registrerbar amidering med taurin og glycin og ytterligere hydroksylering, mest sannsynlig i sidekjeden. Ikke-konjugert UDCA på den annen side var hovedsakelig konjugert med taurin og til mindre grad ble den omdannet til glycin-, sulfat- og flukuronidkonjugater før biliær sekresjon.

Neglisjerbare mengder av UDCA-sulfat ble skilt ut i urinen selv etter infusjon av relativt høye konsentrasjoner. Dette var spesielt overraskende når man betrakter at majoriteten av urinære gallesyrer er sulfatkonjugater. Mangelen på biliære gallesyresulfater i pasienter med cholestatisk leversykdom og funnet av høye andeler og høye konsentrasjoner av sulfaterte urinære gallesyrer, kan derfor kun bli forklart med renal sulfatering og ikke hepatisk sulfatering av gallesyrer. Disse observasjonene demonstrerer klart at sulfaterte gallesyrer lett kan bli tatt opp av leveren og transportert til gallen og vil derfor ikke synes å støtte den generelt aksepterte tro at hepatisk sulfatering er en viktig metabolsk vei i cholestasis. Hva dette angår, kan nyren være et viktig metabolsk organ for beskyttelse av leveren fra toksisiteten til gallesyrer under cholestasis.

Rotten er en art som signifikant 6ß-hydroksylerer gallesyre og 6ß-hydroksylering av CDCA og UDCA har vist å opptre. I denne studien, kunne signifikante mengder av hydroksylerte produkter av UDCA, slik som muricholinsyreisomerer, ikke bli detektert.

Det har blitt rapportert at taurochenodeoksycholinsyredisulfater og glycochenodioksycholinsyredisulfater ble metabolisert til 90% til 3α,7α-disulfat, 6ß-hydroksy-5ß-cholanoinsyre (3α,7ß-disulfat av α-muricholinsyre) i gallefistula-rotter. I eksperimentene utført med hensyn på oppfinnelsen, ble hverken UDCA-7S eller UDCA-disulfat hydroksylert. Disse eksperimentene antyder sterkt at nærværet av sulfatgruppen forhindrer hepatisk biotransformasjon av kjernen. Imidlertid kan det være mulig at enzymet som er ansvarlig for hydroksyleringen, fortrinnsvis virker på de amiderte gallesyrene som substrater.

Det er antatt at konjugeringen av gallesyrer med taurin avhenger av substrataffiniteten til enzymet (gallesyre CoA:glycin/taurin-N-acyl-transferase) og tilførselen av taurin i leveren. Våre resultater fra FAB-MS og GC-MS viser at UDCA-3S ble amidert delvis med taurin og glycin, noe som indikerer at sulfatesteren har lavere affinitet for enzymet sammenlignet med den ikke-sulfaterte gallesyre. Observasjonen at UDCA-7S og UDCA-DS ikke ble amidert med taurin eller glycin, indikerer at nærværet av 7ß-sulfatgruppen hindrer denne enzymatiske effekten.

TABELL 1

Masse- og prosentsammensetning av de viktigste gallesyrene i jejunum fra kontrollrotter og etter oral administrasjon av UDCA, UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat eller UDCA-3,7-disulfat, bestemt ifølge GC-MS

	Kontroll		UDCA		UDCA-3-sulfat		UDCA-7-sulfat		UDCA-3,7-sulfat	
	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)
Litocholinsyre	0,02 ± 0,01	0,2 ± 0,1	0,26 ± 0,01	1,0 ± 0,1	0,07 ± 0,01	0,3 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,1	ND	0
Deoksycholin-syre	0,50 ± 0,03	4,8 ± 1,1	1,56 ± 0,18	5,6 ± 0,3	1,96 ± 0,68	8,4 ± 1,5	0.76 ± 0,08	3,3 ± 0,1	0,5 ± 0,05	5,2 ± 0,3
Chenodeoksy-cholinsyre	0,25 ± 0,05		0,98 ± 0,06		0,43 ± 0,10		0,26 ± 0,06		0,12 ± 0,04	
α-muricholinsyre	1,48 ± 0,24		0,75 ± 0,02		0,18 ± 0,02		0,04 ± 0,01		ND	
Cholinsyre	6,82 ± 1,10	48,5 ± 2,9	4,68 ± 0,65	16,8 ± 1,3	8,49 ± 1,22	37,7 ± 0,9	15,78 ± 1,30	69,0 ± 0,6	6,78 ± 1,03	66,0 ± 1,3
UDCA	0,03 ± 0,01	0,3 ± 0,2	9,95 ± 0,49	35,9 ± 0,4	3,67 ± 0,45	16,4 ± 0,5	1,09 ± 0,34	4,7 ± 1,3	0,21 ± 0,07	2,0 ± 0,4

Tabell 1, forts.

	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)
Δ^{22}-UDCA	ND	0	4,00 ± 0,05	14,5 ± 0,7	2,04 ± 0,08	9,2 ± 1,0	0,70 ± 0,05	3,1 ± 0,1	0,21 ± 0,03	2,1 ± 0,1
ß-muricholinsyre	0,64 ± 0,18		4,12 ± 0,25		3,02 ± 0,80		2,21 ± 0,17		1,70 ± 0,14	
Δ^{22}-ß-muricholinsyre	3,44 ± 0,57		0,85 ± 0,01		2,09 ± 0,16		1,49 ± 0,22		0,34 ± 0,09	
ω-muricholinsyre	0,10 ± 0,01		0,31 ± 0,01		0,37 ± 0,03		0,31 ± 0,04		0,24 ± 0,02	
Δ^{22}-ω-muricholinsyre	0,56 ± 0,08		0,30 ± 0,01		0,24 ± 0,01		0,26 ± 0,01		0,12 ± 0,01	
TOTALT	4,04 ± 2,40		27,77 ± 1,69		22,57 ± 3,53		22,91 ± 2,11		10,24 ± 1,37	

Note: Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt ± SEM

ND: Ikke detektert

TABELL 2

Masse- og prosentsammensetning av de viktigste gallesyrene i colon fra kontrollrotter og etter oral administrasjon av UDCA, UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat eller UDCA-3,7-disulfat, bestemt ifølge GC-MS

	Kontroll		UDCA		UDCA-3-sulfat		UDCA-7-sulfat		UDCA-3,7-sulfat	
	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)
Litocholinsyre	0,08 ± 0,02	3,4 ± 0,2	0,97 ± 0,43	32,0 ± 0,8	0,61 ± 0,19	18,4 ± 7,2	0,04 ± 0,02	1,3 ± 0,3	0,02 ± 0,10	1,8 ± 0,6
Deoksycholin-syre	0,94 ± 0,34	32,3 ± 0,8	0,31 ± 0,13	10,4 ± 0,9	0,58 ± 0,07	17,4 ± 3,3	0.36 ± 0,16	11,4 ± 2,1	031 ± 0,04	27,2 ± 6,0
Chenodeoksy-cholinsyre	0,03 ± 0,01		0,05 ± 0,03		0,06 ± 0,01		0,06 ± 0,03		0,07 ± 0,05	
α-muricholinsyre	0,15 ± 0,05		0,01 ± 0,01		0,02 ± 0,01		0,03 ± 0,02		0,03 ± 0,01	
Cholinsyre	0,47 ± 0,12	15,5 ± 1,7	0,24 ± 0,07	8,9 ± 2,8	0,44 ± 0,012	13,8 ± 5,3	0,09 ± 0,09	2,5 ± 2,0	0,23 ± 0,15	26,3 ± 9,8
UDCA	0,02 ± 0,01	0,6 ± 0,2	0,31 ± 0,26	8,3 ± 3,4	0,05 ± 0,02	1,5 ± 0,2	1,28 ± 0,38	44,0 ± 9,5	0,20 ± 0,17	14,7 ± 11,0

Tabell 2, forts.

	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)	Masse (mg)	Prosent (%)
Δ^{22}-UDCA	ND	0	0,02 ± 0,01	0,4 ± 0,1	0,01 ± 0,01	0,2 ± 0,1	ND	0	ND	0
ß-muricholinsyre	0,31 ± 0,06		0,13 ± 0,06		0,20 ± 0,03		0,06 ± 0,04		0,06 ± 0,20	
Δ^{22}-ß-muricholinsyre	0,04 ± 0,01		ND		0,,01 ± 0,01		0,03 ± 0,01		0,01 ± 0,01	
ω-muricholinsyre	0,82 ± 0,30		0,83 ± 0,35		1,67 ± 0,34		0,88 ± 0,30		0,24 ± 0,10	
Δ^{22}-ω-muricholinsyre	0,24 ± 0,10		0,19 ± 0,08		0,44 ± 0,08		0,15 ± 0,02		0,06 ± 0,30	
TOTALT	3,17 ± 0,51		3,04 ± 1,37		4,07 ± 0,71		2,98 ± 0,85		1,22 ± 0,25	

Note: Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt ± SEM

ND: Ikke detektert

TABELL 3

Masse- og prosentsammensetning av de viktigste gallesyrene i lever fra kontrollrotter og etter oral administrasjon av UDCA, UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat eller UDCA-3,7-disulfat, bestemt ifølge GC-MS

	Kontroll		UDCA		UDCA-3-sulfat		UDCA-7-sulfat		UDCA-3,7-sulfat	
	Konsen-trasjon (nmol/g)	Prosent (%)	Konsen-trasjon (nmol/g)	Prosent (%)	Konsen-trasjon (nmol/g)	Prosent (%)	Konsen-trasjon (nmol/g)	Prosent (%)	Konsen-trasjon (nmol/g)	Prosent (%)
Litocholinsyre	4,6	1,1	8,0	2,4	3,2	0,9	3,2	1,0	2,2	0,8
Deoksycholinsyre	29,0	6,7	22,5	6,8	52,6	14,5	14,9	4,5	17,3	6,1
Chenodeoksy-cholinsyre	17,2	4,0	12,4	3,7	9,2	2,5	6,4	1,9	0,7	0,2
α-muricholinsyre	39,7	9,1	16,1	4,8	6,0	1,6	0,4	0,1	6,5	2,3
Cholinsyre	157,5	36,2	42,3	12,7	86,6	23,9	186,1	56,0	163,2	57,7
UDCA	12,0	2,8	99,6	30,0	56,6	15,6	6,1	1,8	4,9	1,7
Δ^{22}-UDCA	ND	0,0	37,4	11,3	31,3	8,6	8,7	2,6	5,8	2,0
ß-muricholinsyre	45,8	10,5	60,6	18,3	65,4	18,1	36,1	10,8	50,1	17,7
Δ^{22}-ß-muricholinsyre	129,1	29,7	20,9	6,3	36,3	10,0	59,8	18,0	23,0	8,1
ω-muricholinsyre	ND	0,0	6,3	1,9	8,1	2,2	4,0	1,2	5,0	1,8
Δ^{22}-ω-muricholinsyre	ND	0,0	4,8	1,4	6,3	1,7	6,6	2,0	4,0	1,4
TOTALT	434,9		331,8		361,7		332,3		282,7	

Note: Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt ± SEM ND: Ikke detektert

Tabell 4

Fysiologiske effekter av infusjon av UDCA og dets sulfatkonjugater

	UDCA	UDCA-7S	UDCA-3S	UDCA-DS
Gallestrøm: (µl/min/g lever)				
Basis	1,97 ± 0,05	1,95 ± 0,08,8	1,85 ± 0,06	2,06 ± 0,08
Maksimum	4,88 ± 0,16	5,83 ± 0,31	3,34 ± 0,13	5,92 ± 0,21
Gallesaltproduksjon (nmol/min/g lever)				
Basis	47,30 ± 4,30	34,60 ± 4,40	39,60 ± 3,80	40,20 ± 5,50
Maksimum	145,10 ± 17,30	255,40 ± 18,20	138,90 ± 11,80	222,40 ± 24,30
Kolesterolproduksjon (nmol/min/g lever)				
Basis	1,46 ± 0,10	1,42 ± 0,16	1,28 ± 0,05	1,52 ± 0,12
Maksimal endring	1,88 ± 0,19	1,76 ± 0,23	0,40 ± 0,02	0,37 ± 0,07
Fosfolipidproduksjon (nmol/min/g lever)				
Basis	10,30 ± 0,70	9,00 ± 1,00	9,60 ± 0,80	9,80 ± 0,70
Maksimal endring	17,20 ± 1,90	15,00 ± 1,70	4,00 ± 0,50	2,50 ± 0,30

Verdier er uttrykt som gjennomsnitt ± SEM for 6 dyr i hver gruppe.

Tabell 5

Relativ %-sammensetning av individuelle gallesyrer utskilt i gallen under i.v.-infusjon av UDCA og sulfatkonjugatene av UDCA

Tid (min)	DCA	CDCA	α-MCA	CA	UDCA	ß-MCA	MCA	Andre
UDCA-infusjon:								
Basal	2,0	5,4	8,9	76,5	3,2	26,9	1,5	nd
20-30 min.	1,0	3,0	4,3	49,0	51,9	17,2	1,0	14,6
50-60 min.	0,5	2,5	3,9	21,4	65,9	12,6	0,5	13,7
80-90 min.	0,7	1,5	6,4	9,8	79,5	9,9	nd	11,9
UDCA-7S-infusjon:								
Basal	5,7	5,3	7,2	58,3	1,4	18,5	3,6	nd
20-30 min.	2,3	1,7	2,5	20,2	61,3	10,7	1,3	nd
50-60 min.	0,7	0,6	0,9	7,7	83,6	5,9	0,6	nd
80-90 min.	1,2	0,7	1,3	9,9	78,8	7,4	0,8	nd
UDCA-3-infusjon:								
Basal	2,2	4,0	10,8	57,4	2,0	20,6	3,0	nd
20-30 min.	2,5	4,6	6,2	36,0	33,3	12,4	4,9	5,2
50-60 min.	1,0	1,9	2,7	14,9	70,6	7,4	1,5	11,5
80-90 min.	1,3	2,5	3,0	18,2	67,7	5,2	2,0	11,2
UDCA-DS-infusjon:								
Basal	4,2	6,3	9,1	56,7	1,4	18,0	4,3	nd
20-30 min.	2,1	2,5	3,4	24,5	54,6	9,7	3,2	nd
50-60 min.	1,2	0,7	2,2	15,3	70,7	6,7	2,2	nd
80-90 min.	nd	0,9	1,6	10,6	79,1	6,5	1,4	nd

NYE Patentkrav

1.
Anvendelse av et sulfat av 3α,7ß-dihydroksy-5ß-cholan-24-oinsyre (UDCA) eller et salt av dette; og en farmasøytisk akseptabel bærer for fremstilling av et farmasøytisk preparat for inhibisjon eller behandling av en leversykdom hos et pattedyr.

2.
Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte sulfat er valgt blant gruppen omfattende UDCA-3-sulfat, UDCA-7-sulfat, UDCA-3,7-disulfat og kombinasjoner derav.

3.
Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte sulfat er valgt blant gruppen omfattende UDCA-7-sulfat, UDCA-3,7-disulfat og kombinasjoner derav.

4.
Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å hemme eller behandle en inflammatorisk tilstand i leveren.

5.
Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å administrere UDCA til tykktarmen til et pattedyr.

6.
Anvendelse ifølge krav 5, der nevnte sulfat omfatter en sulfatgruppe på C-7-karbonet, hvor nevnte sulfat er til stede i en mengde som er effektiv for å forbedre administrasjonen av UDCA til tykktarmen til et pattedyr i forhold til leveringen av UDCA til tykktarmen med UDCA eller et sulfat av UDCA uten en sulfatgruppe på C-7-karbonet.

7.
Anvendelse ifølge krav 1,der preparatet er formulert for oral, lokal eller intravenøs administrasjon.

8.
Anvendelse ifølge krav 7, der preparatet er formulert for intravenøs administrasjon.

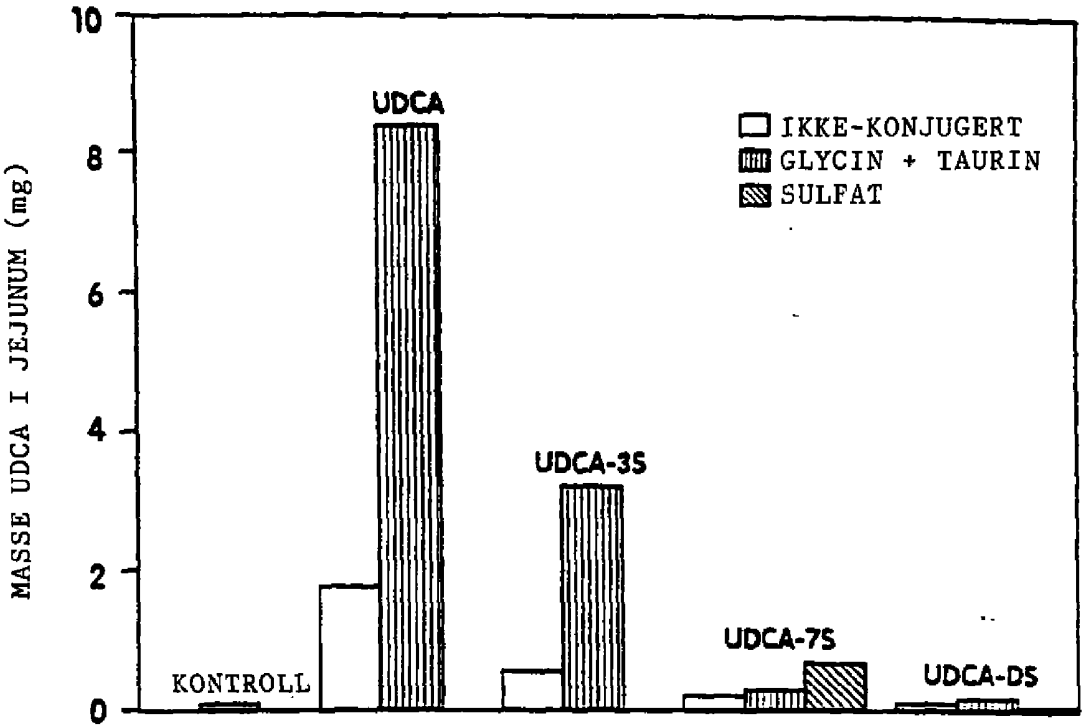
MASSE UDCA I JEJUNUM (mg)
10
8
6
4
2
0
UDCA
UDCA-3S
UDCA-7S
UDCA-DS
KONTROLL
IKKE-KONJUGERT
GLYCIN + TAURIN
SULFAT

FIG. IA

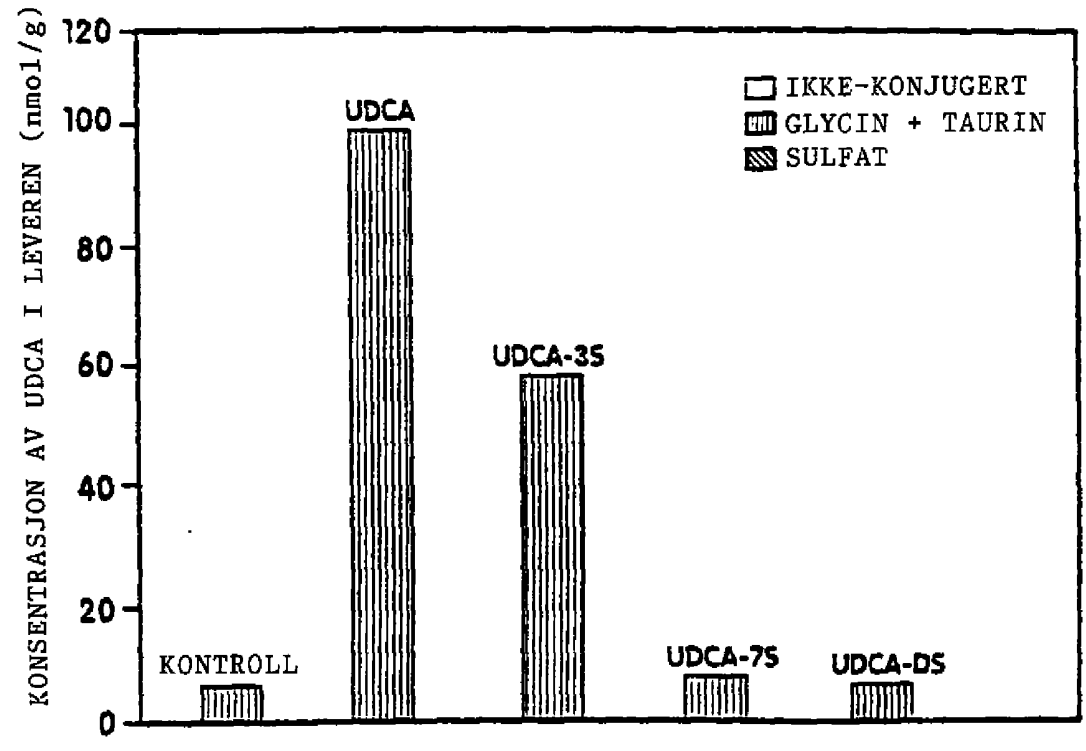
KONSENTRASJON AV UDCA I LEVEREN (nmol/g)
120
100
80
60
40
20
0
UDCA
UDCA-3S
UDCA-7S
UDCA-DS
KONTROLL
IKKE-KONJUGERT
GLYCIN + TAURIN
SULFAT

FIG. IB

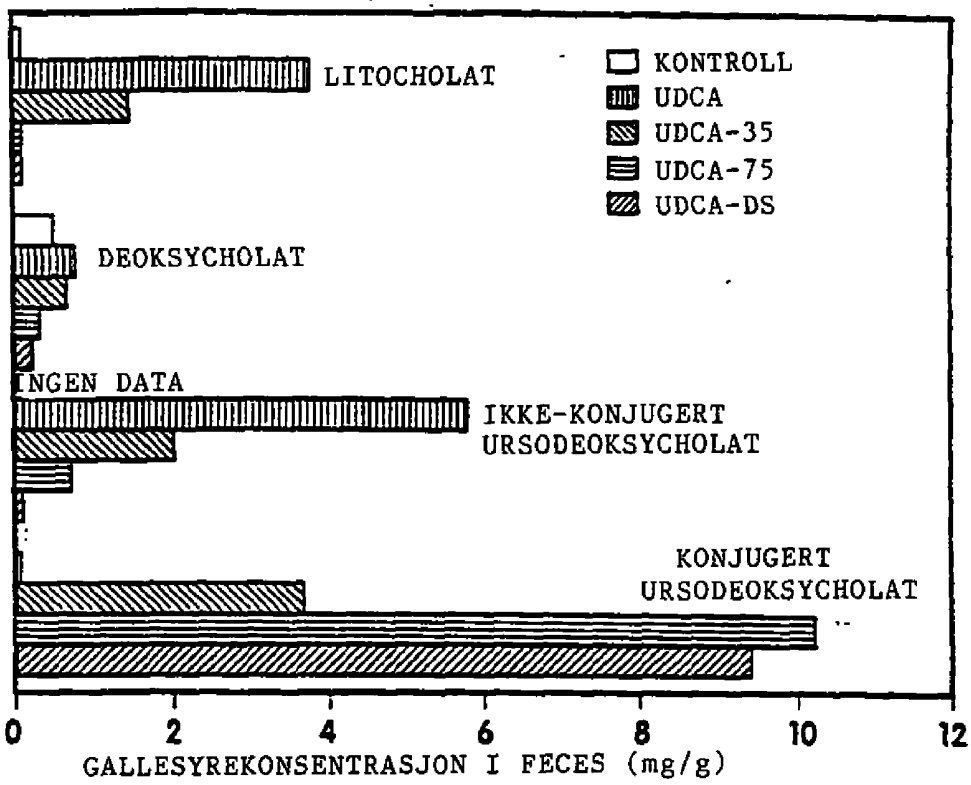
KONTROLL
UDCA
UDCA-35
UDCA-75
UDCA-DS
LITOCHOLAT
DEOKSYCHOLAT
NGEN DATA
IKKE-KONJUGERT
URSODEOKSYCHOLAT
KONJUGERT
URSODEOKSYCHOLAT
0
2
4
6
8
10
12
GALLESYREKONSENTRASJON I FECES (mg/g)

FIG. 2

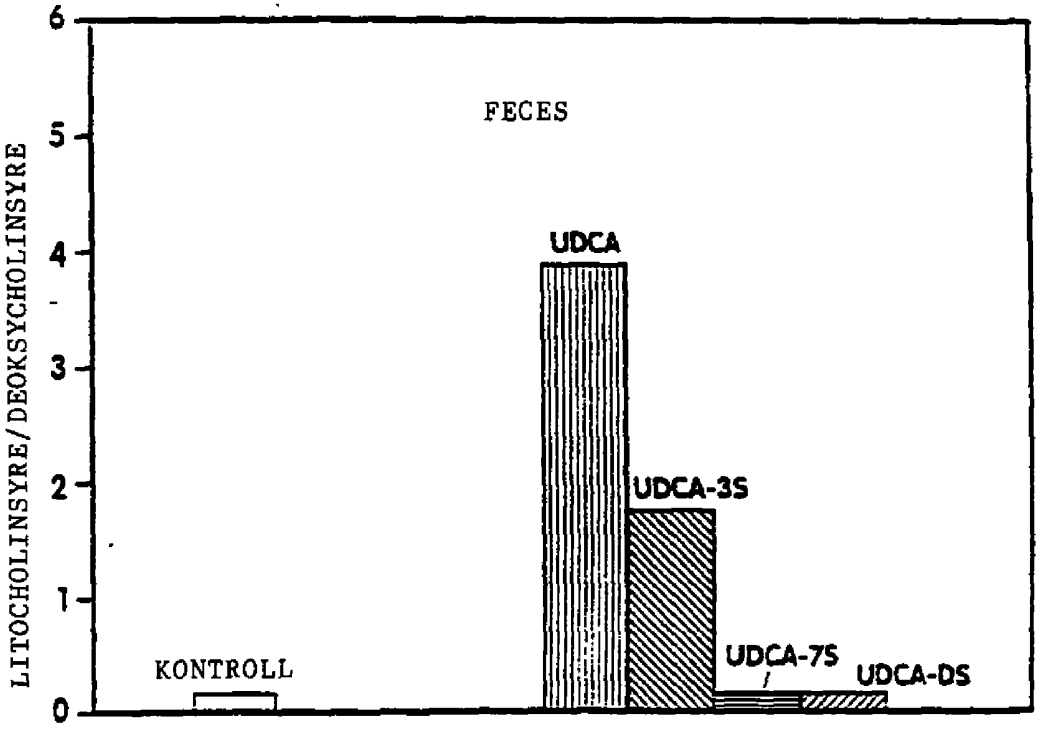
FECES
LITOCHOLINSYRE/DEOKSYCHOLINSYRE
0
1
2
3
4
5
6
KONTROLL
UDCA
UDCA-3S
UDCA-7S
UDCA-DS

FIG. 3

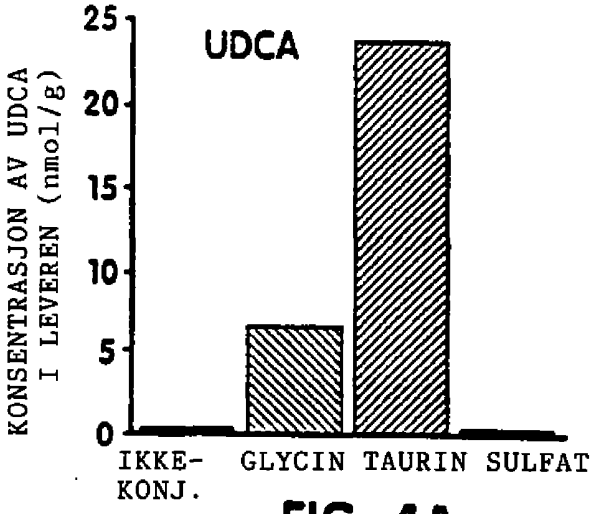

FIG. 4A

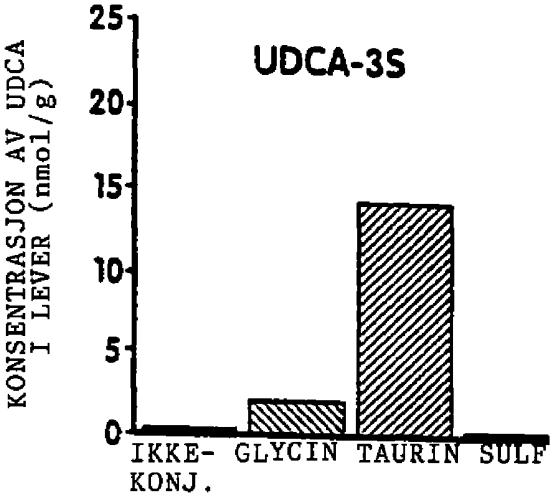

FIG. 4B

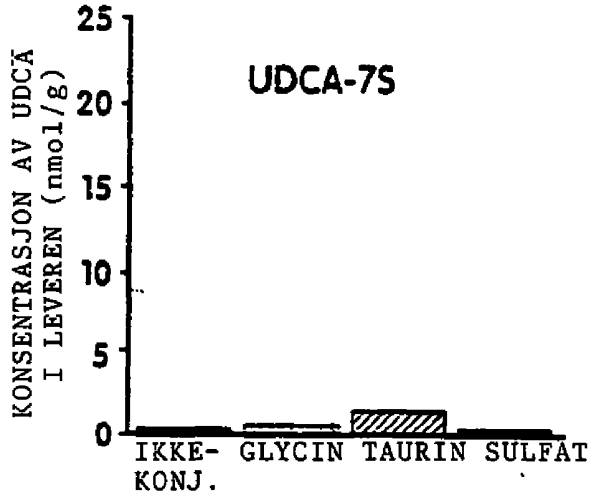

FIG. 4C

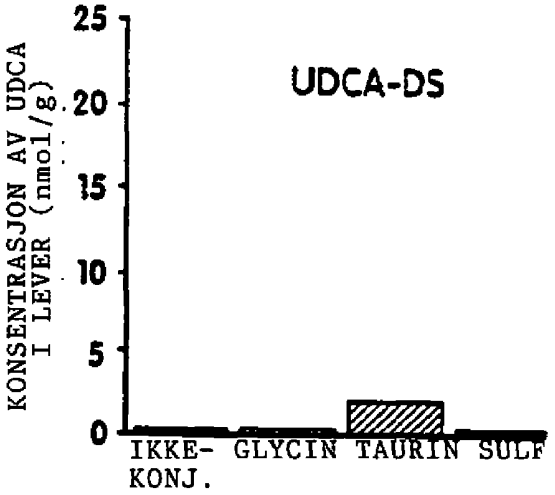

FIG. 4D

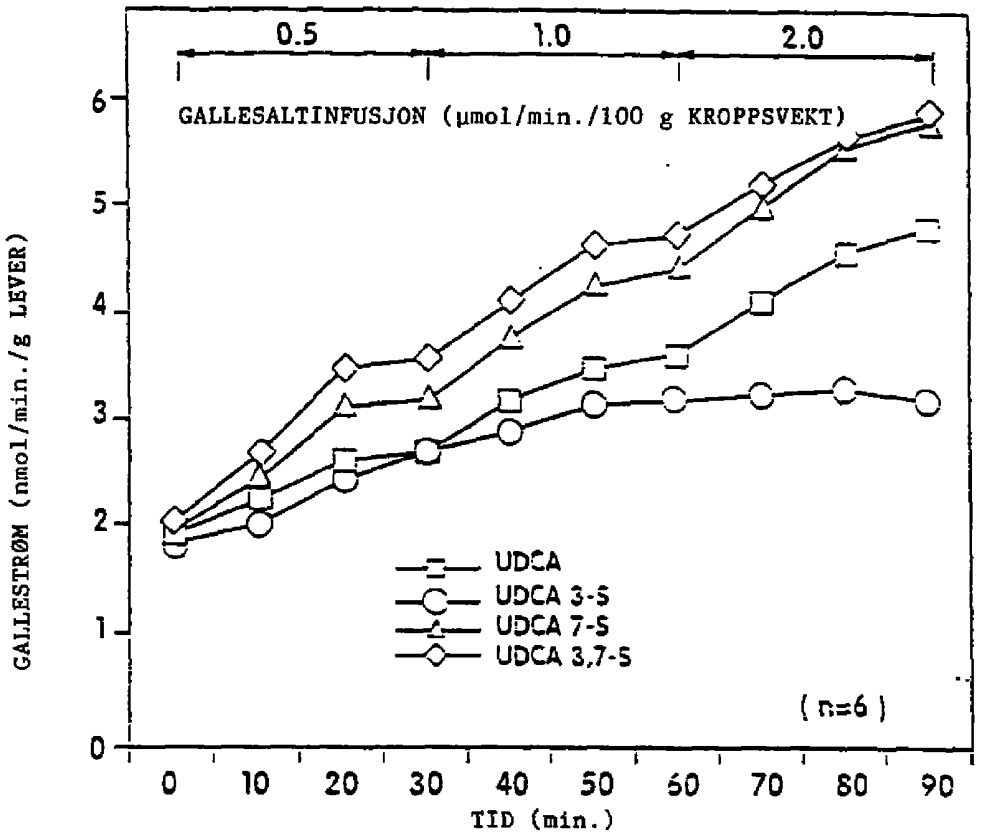
0.5
1.0
2.0
GALLESALTINFUSJON (µmol/min./100 g KROPPSVEKT)
GALLESTRØM (nmol/min./g LEVER)
UDCA
UDCA 3-S
UDCA 7-S
UDCA 3,7-S
(n=6)
TID (min.)

FIG.5A

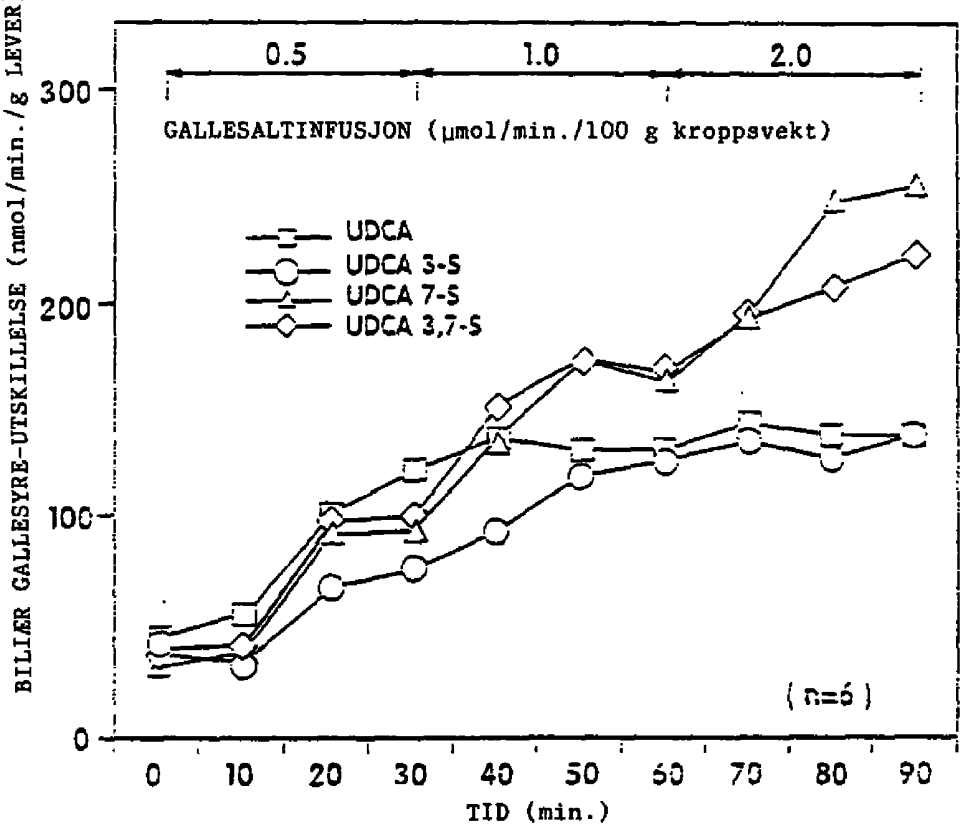
0.5
1.0
2.0
GALLESALTINFUSJON (µmol/min./100 g kroppsvekt)
BILIÆR GALLESYRE-UTSKILLELSE (nmol/min./g LEVER)
UDCA
UDCA 3-S
UDCA 7-S
UDCA 3,7-S
(n=6)
TID (min.)

FIG.5B

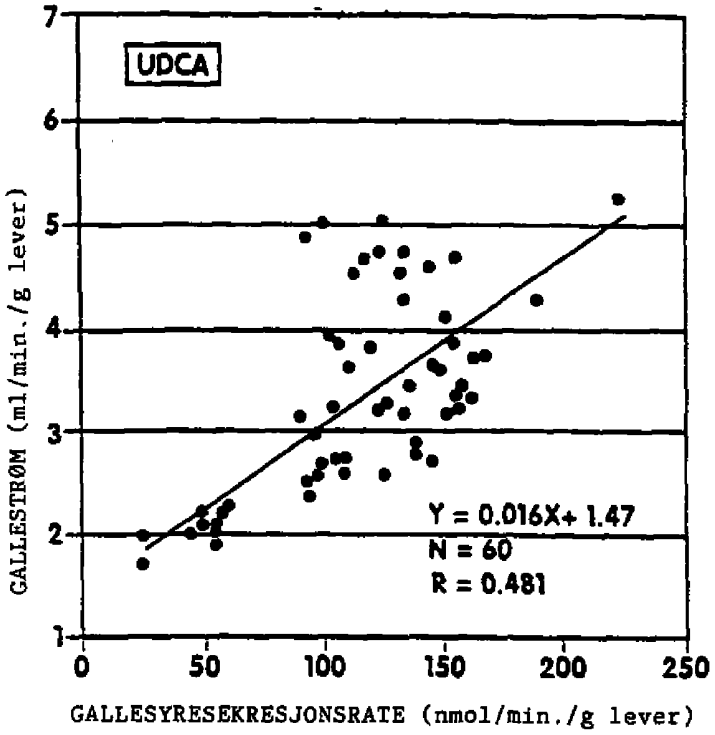
UDCA
Y = 0.016X+ 1.47
N = 60
R = 0.481
GALLESTRØM (ml/min./g lever)
GALLESYRESEKRESJONSRATE (nmol/min./g lever)
1
2
3
4
5
6
7
0
50
100
150
200
250

FIG. 6A

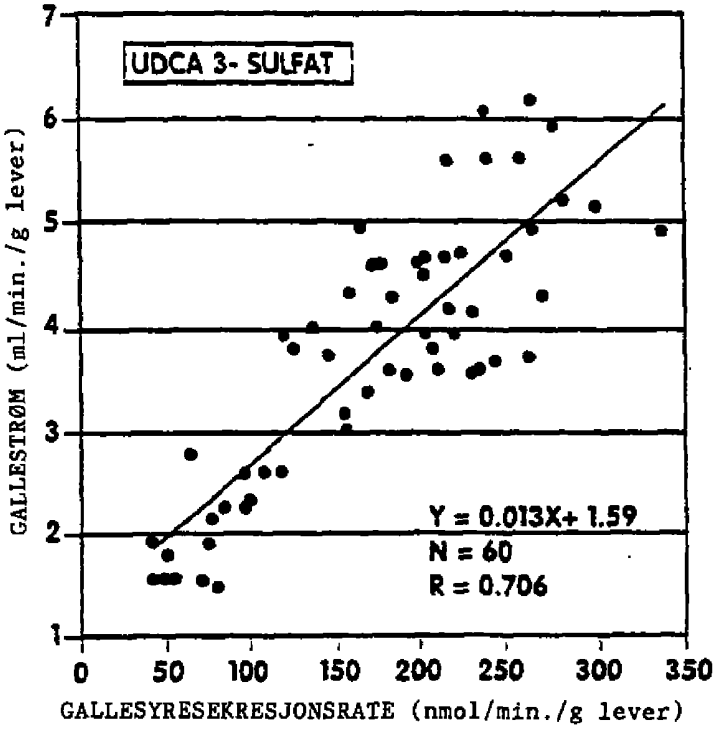
UDCA 3- SULFAT
Y = 0.013X+ 1.59
N = 60
R = 0.706
GALLESTRØM (ml/min./g lever)
GALLESYRESEKRESJONSRATE (nmol/min./g lever)
1
2
3
4
5
6
7
0
50
100
150
200
250
300
350

FIG. 6B

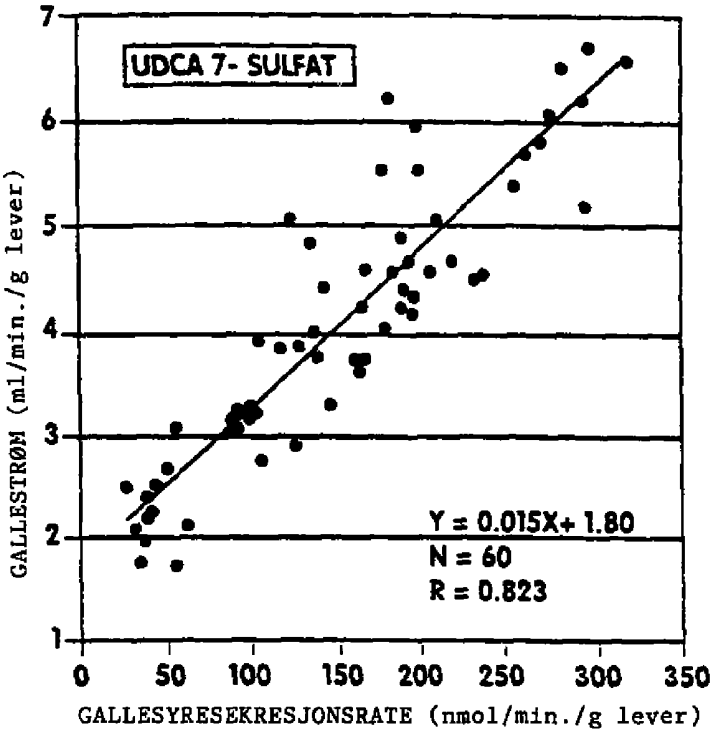
UDCA 7- SULFAT
GALLESTRØM (ml/min./g lever)
GALLESYRESEKRESJONSRATE (nmol/min./g lever)
Y = 0.015X+ 1.80
N = 60
R = 0.823
1
2
3
4
5
6
7
0
50
100
150
200
250
300
350

FIG. 6C

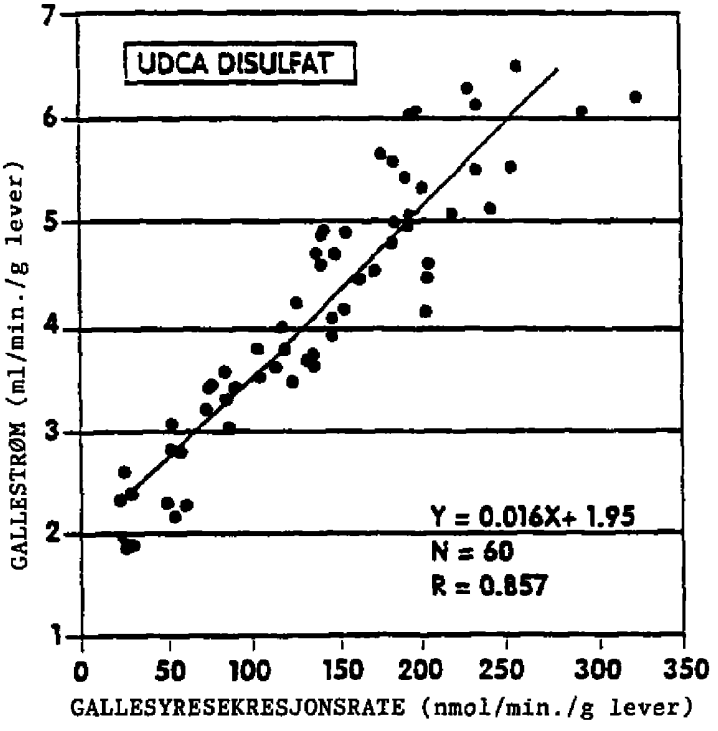
UDCA DISULFAT
GALLESTRØM (ml/min./g lever)
GALLESYRESEKRESJONSRATE (nmol/min./g lever)
Y = 0.016X+ 1.95
N = 60
R = 0.857
1
2
3
4
5
6
7
0
50
100
150
200
250
300
350

FIG. 6D

GJENNOMSNITTLIG BILIÆR KOLESTEROL-UTSKILLELSE AV SPRAGUE-DAWLEY-ROTTER UNDER i.v.-INFUSJON AV UDCA OG SULFATKONJUGATENE.

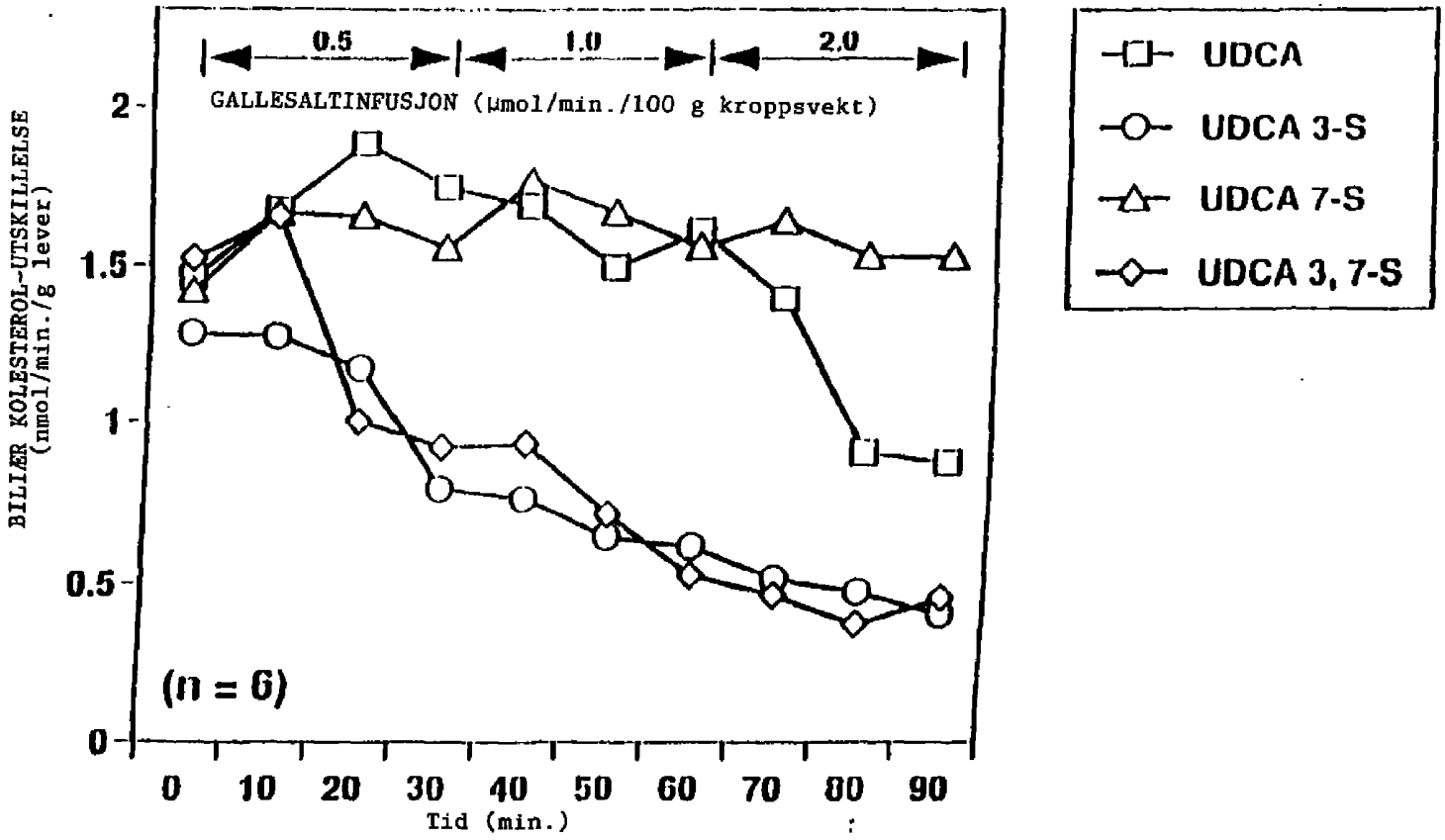

FIG. 7A

GJENNOMSNITTLIG BILIÆR FOSFOLIPID-UTSKILLELSE AV SPRAGUE-DAWLEY-ROTTER UNDER i.v.-INFUSJON AV UDCA OG SULFATKONJUGATENE.

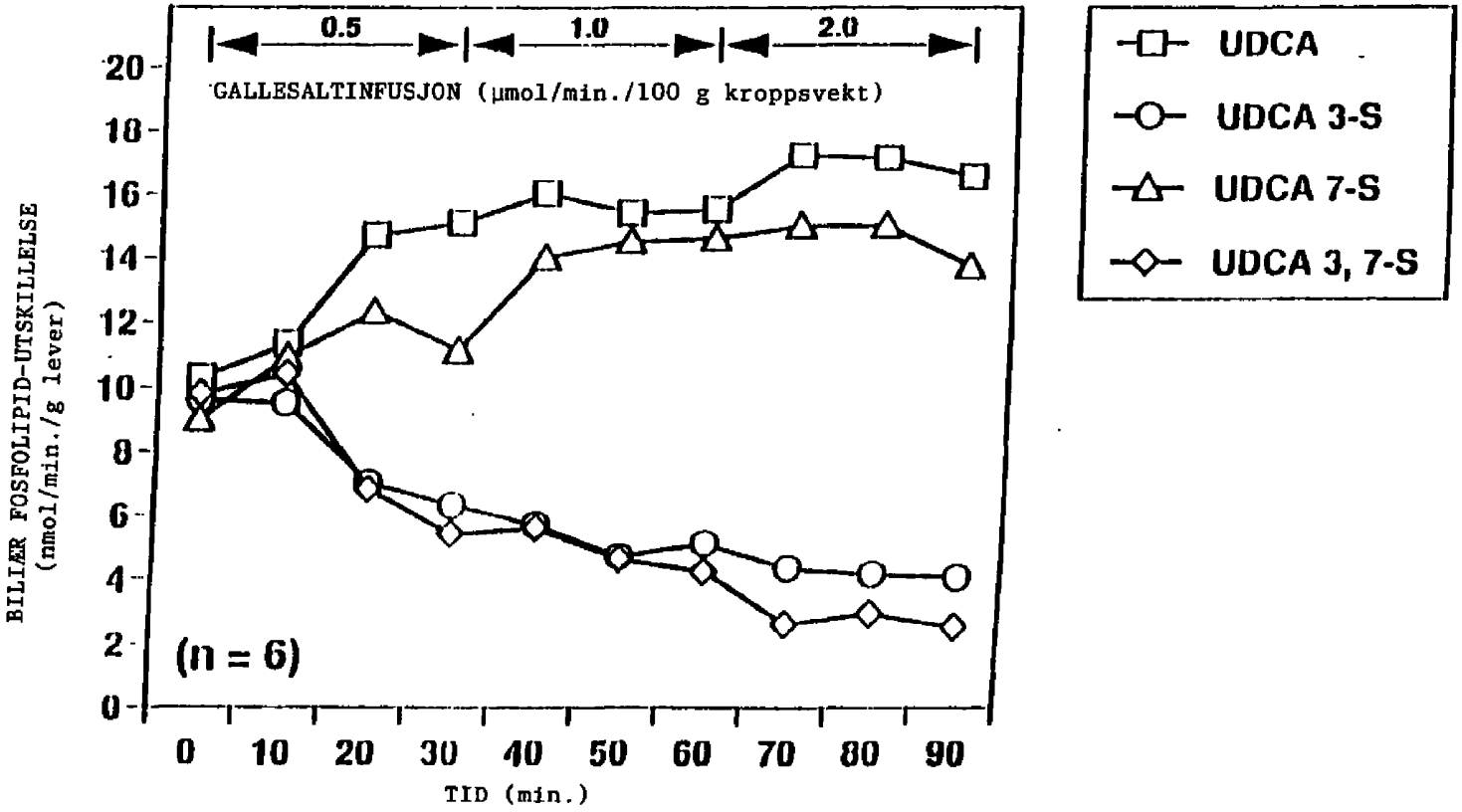

FIG. 7B

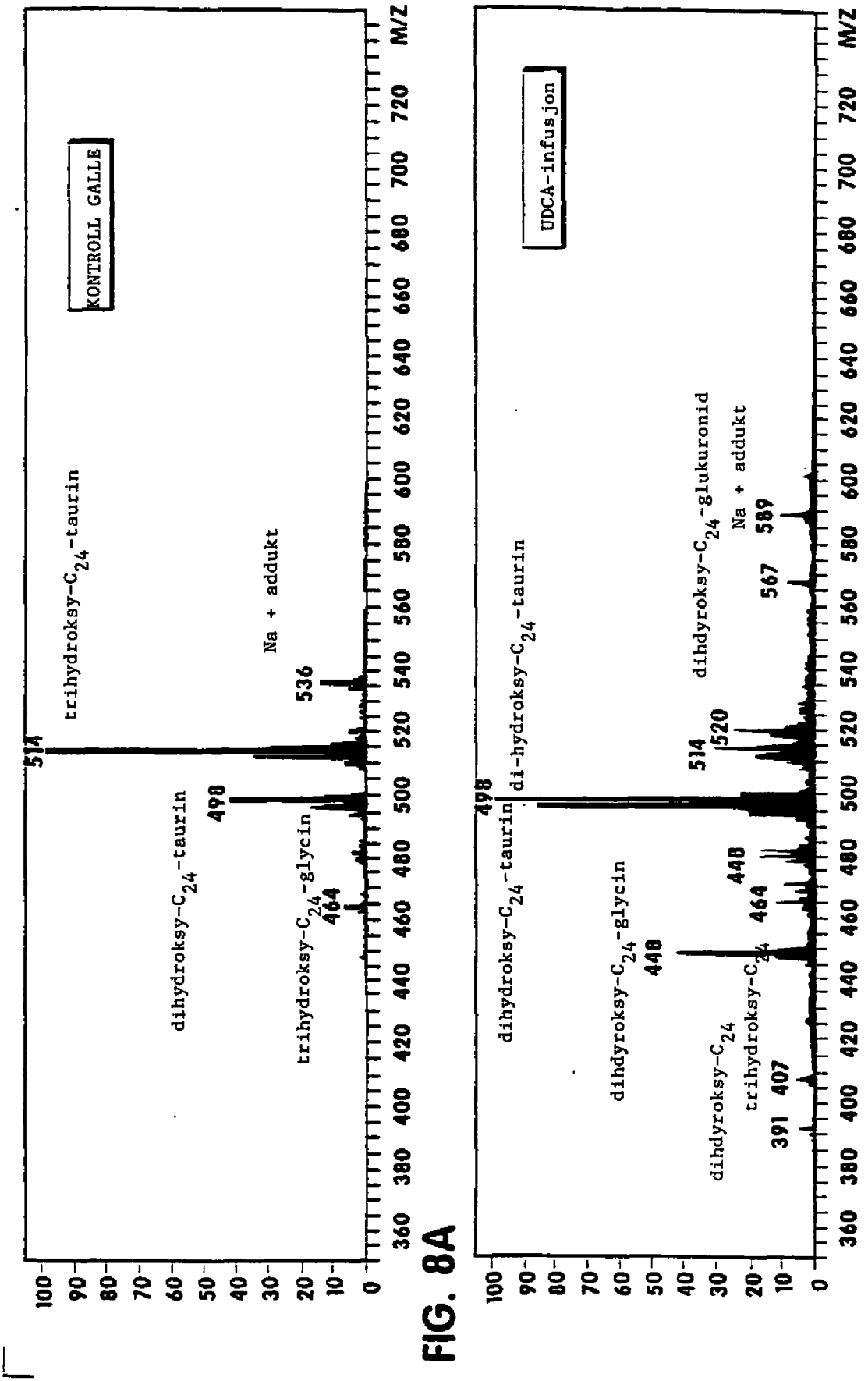
KONTROLL GALLE
trihydroksy-C24-taurin
514
Na + addukt
536
dihydroksy-C24-taurin
498
trihydroksy-C24-glycin
464
M/Z
UDCA-infusjon
di-hydroksy-C24-taurin
498
dihydroksy-C24-glycin
448
dihydroksy-C24
trihydroksy-C24
464
448
391
407
514
520
dihydroksy-C24-glukuronid
Na + addukt
567
589

FIG. 8A

FIG. 8B

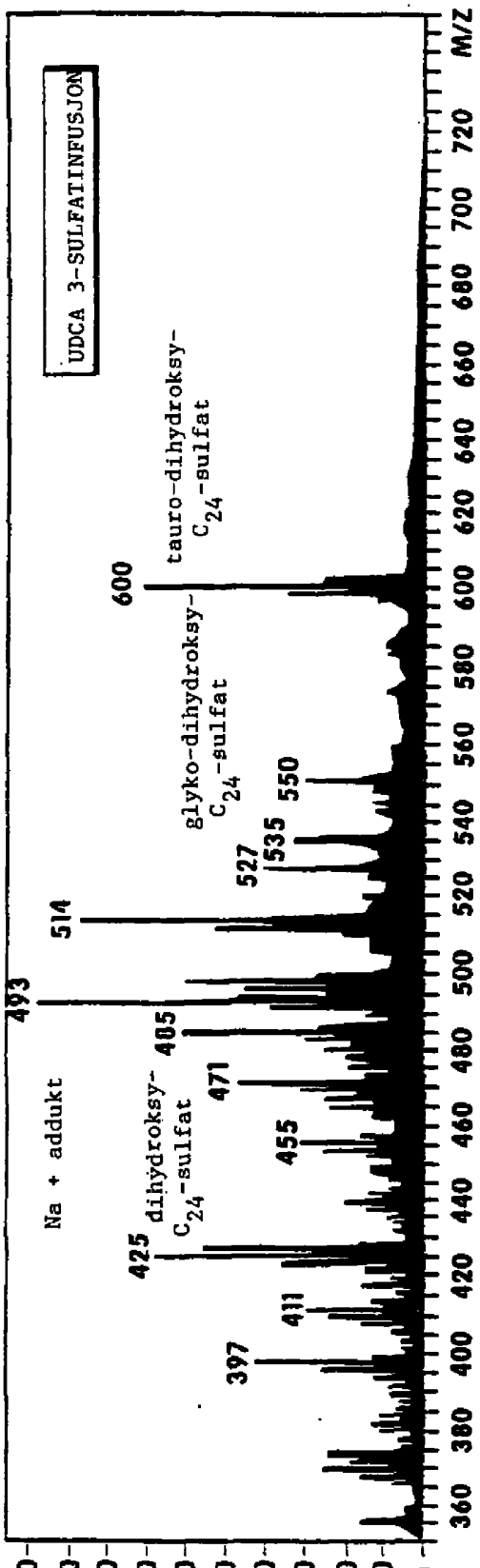
UDCA 3-SULFATINFUSJON
Na + addukt
dihydroksy-
C_{24}-sulfat
glyko-dihydroksy-
C_{24}-sulfat
tauro-dihydroksy-
C_{24}-sulfat
493
514
425
485
471
455
397
411
527
535
550
600
M/Z

FIG. 8C

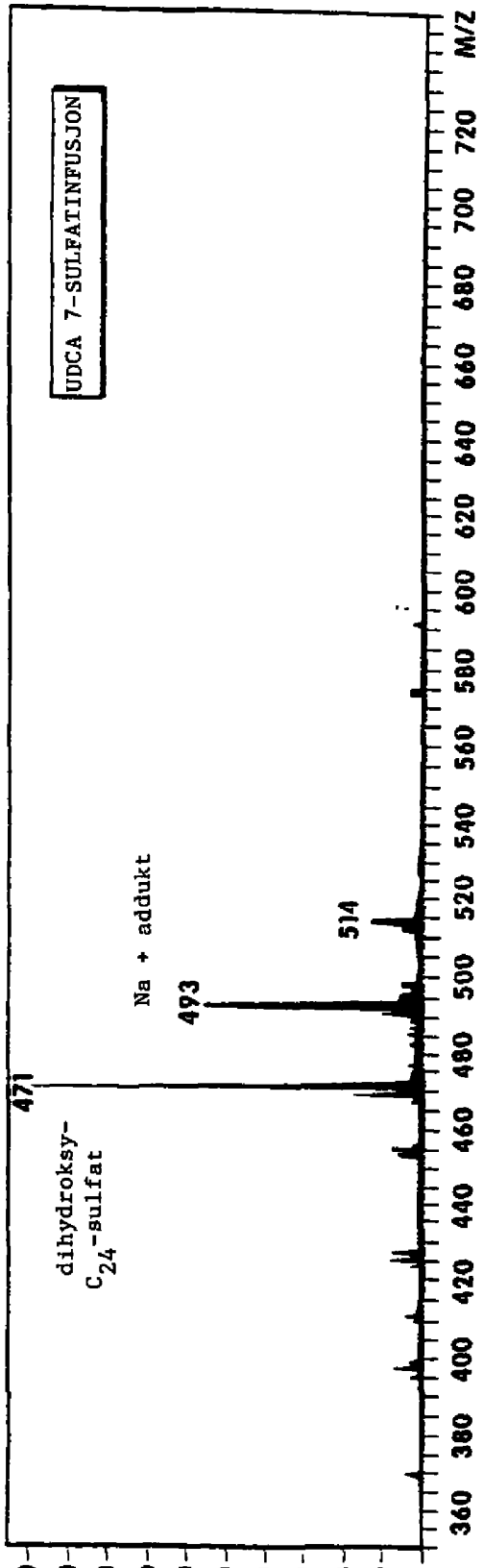
UDCA 7-SULFATINFUSJON
Na + addukt
dihydroksy-
C_{24}-sulfat
471
493
514
M/Z

FIG. 8D

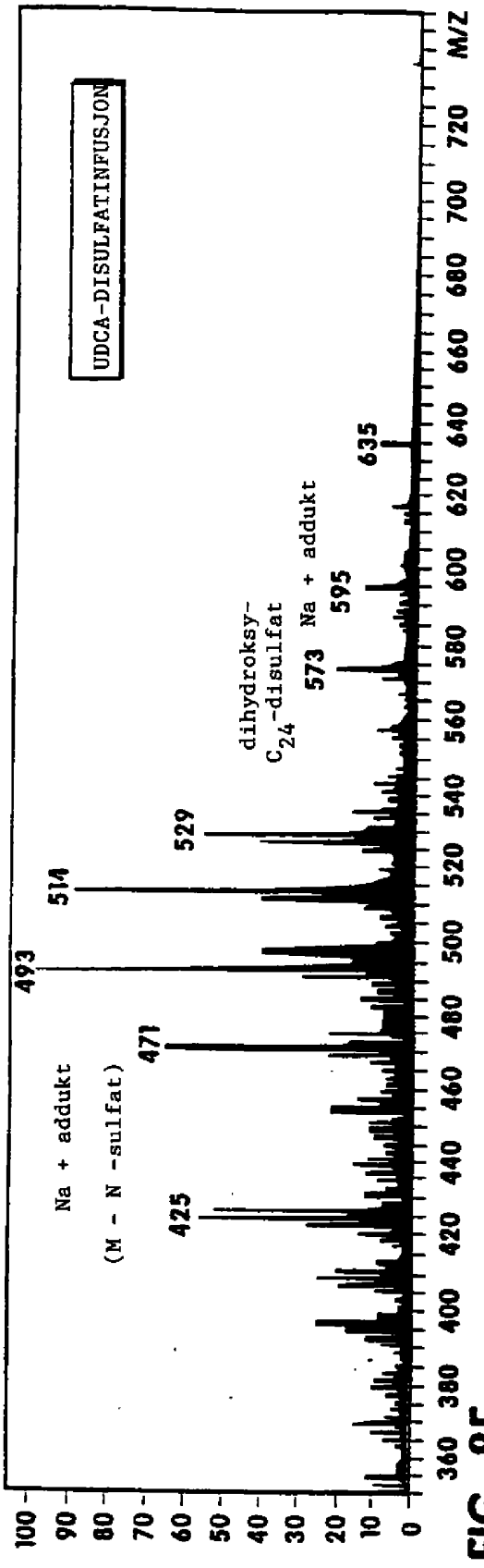
UDCA-DISULFATINFUSJON
Na + addukt
(M - N -sulfat)
493
514
529
dihydroksy-
C_{24}-disulfat
573 Na + addukt
595
635
425
471
M/Z

FIG. 8E