

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 538**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2017** **PCT/KR2017/012127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2018** **WO18080276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2017** **E 17864916 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2025** **EP 3533450**

54 Título: **Composición farmacéutica para prevenir o tratar lesión por isquemia-reperfusión que contiene un ácido biliar**

30 Prioridad:

31.10.2016 KR 20160143393

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

24.06.2025

73 Titular/es:

**SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE
FOUNDATION (100.00%)
48 Itaewon-ro 55-gil, Yongsan-gu
Seoul 04348, KR**

72 Inventor/es:

**GWON, HYEON CHEOL y
JANG, HYUNG SUK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 029 538 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

Composición farmacéutica para prevenir o tratar lesión por isquemia-reperusión que contiene un ácido biliar

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una lesión por isquemia-reperusión provocada por isquemia miocárdica, conteniendo la composición ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

La sangre suministra oxígeno y nutrientes a los respectivos tejidos y células del cuerpo. La isquemia se refiere a un estado de deficiencia de oxígeno en el que los vasos sanguíneos, que se usan para suministrar sangre a los órganos del cuerpo, tejidos o partes, se estrechan o se encogen, o los vasos sanguíneos normales no se producen lo suficiente, dando como resultado una falta de suministro de sangre. La isquemia lesiona irreversiblemente las células y conduce a la necrosis tisular. En particular, el cerebro o el corazón es el órgano corporal más sensible a la falta de suministro de sangre. Por ejemplo, cuando se produce isquemia en un tejido debido a un ictus o lesión en la cabeza, se desencadena una serie de procesos denominados cascadas isquémicas de manera que el tejido se lesiona permanentemente. Para evitar dicha lesión tisular, el flujo de sangre nuevamente después de la isquemia se denomina reperusión.

La terapia convencional para la isquemia y la consiguiente hipoxia es restablecer el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno a niveles normales, ya sea aumentando el suministro de oxígeno sistémico o eliminando la causa de la oclusión vascular. Sin embargo, existe el problema de que el restablecimiento del flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno da como resultado la muerte celular adicional o la pérdida de función, independientemente de la lesión provocada por isquemia o hipoxia. La lesión adicional provocada por el restablecimiento del flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno se conoce como lesión por reperusión. La lesión tisular provocada por la lesión por reperusión parece ser similar a las afecciones inflamatorias agudas resultantes de la adherencia de las células inflamatorias al tejido reperfundido para provocar la activación de estas células inflamatorias y la posterior formación de radicales libres. La generación de radicales libres y otras biomoléculas citotóxicas en tejido reperfundido puede conducir a la muerte celular por necrosis o activación de vías apoptóticas.

Por otro lado, se forma un poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, por sus siglas en inglés) en la membrana interna mitocondrial, y cuando se abre el mPTP, las moléculas por debajo de 1500 Da pueden entrar en la membrana mitocondrial. El resultado de la apertura de mPTP es el hinchamiento de la membrana mitocondrial externa y el estallido final, así como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la posterior liberación de calcio almacenado y factores preapoptóticos. La liberación de calcio almacenado puede provocar una transición de permeabilidad mitocondrial (MPT, por sus siglas en inglés) en las mitocondrias vecinas, dando como resultado la producción de sobrecarga de calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la reacción en cadena mediada por células. Posteriormente, dependiendo del estado energético de las células, se produce apoptosis o necrosis para provocar la lesión de tejidos y órganos irreversibles.

Las funciones de la apoptosis y la necrosis mediadas por mitocondrias en la patogenia de muchas enfermedades están bien establecidas. Se sabe que mPTP es responsable de la patogenia y la progresión de varias enfermedades tales como infarto agudo de miocardio, ictus, enfermedades neurológicas y hepatitis.

En particular, el infarto de miocardio es provocado por la muerte de las células miocárdicas resultante de la necrosis y/o la apoptosis debido a la reperusión isquémica secuencial en la enfermedad cardíaca isquémica. Se cree que la lesión por reperusión fatal (muerte de células miocárdicas como consecuencia directa de la reperusión tisular) representa hasta el 50 % del tamaño final del infarto de miocardio y se sabe que depende de la vía de cinasa de recuperación de lesión por reperusión (RISK, por sus siglas en inglés) y la apertura de mPTP.

No ha habido ningún informe sobre la asociación de ácidos biliares y mPTP con estas funciones. Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento eficaz para la lesión por isquemia-reperusión, una enfermedad importante con una alta incidencia, es insuficiente. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento eficaces de la lesión por isquemia-reperusión usando ácidos biliares tendrían efectos dominó significativos.

Rajesh *et al.* (2025, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39, 766776) describe que UCDA es el principio activo para la protección del miocardio contra la lesión por reperusión.

Divulgación**Problema técnico**

En consecuencia, los inventores de la presente invención confirmaron que el ácido desoxicólico, el ácido cólico y el

ácido litocólico en los ácidos biliares podrían inhibir la lesión por isquemia-reperfusión mientras se estudia la relación entre mPTP y los ácidos biliares, completando de este modo la presente invención.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar la lesión por isquemia-reperfusión que contiene ácidos biliares o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y una composición alimenticia para prevenir o mejorar la lesión por isquemia-reperfusión.

Solución técnica

Con el fin de conseguir los objetivos identificados anteriormente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la lesión por isquemia-reperfusión provocada por isquemia miocárdica, conteniendo la composición ácidos biliares o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el ácido biliar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxicólico y ácido cólico y el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo ha de administrarse en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.

Además, la presente invención proporciona una composición alimenticia para su uso en la prevención o la mejora de la lesión por isquemia-reperfusión provocada por isquemia miocárdica, conteniendo la composición ácidos biliares o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el ácido biliar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxicólico y ácido cólico y el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo ha de administrarse en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.

Efectos ventajosos

De acuerdo con la presente invención, los ácidos biliares aumentan los niveles intranucleares de beta-catenina (• - catenina), interfieren con la apertura de un poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y tiene efectos excelentes, en modelos animales de lesión por isquemia-reperfusión, de alivio de la lesión tisular y reducción del tamaño de los infartos, siendo de este modo utilizables en la prevención, el tratamiento o el alivio de la lesión por isquemia-reperfusión.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra los resultados de un ensayo de luciferasa de beta-catenina nuclear para determinar si el ácido cólico, el ácido litocólico y el ácido desoxicólico aumentan los niveles intranucleares de beta-catenina.

La FIG. 2 ilustra los resultados del análisis de transferencia Western de la transferencia intranuclear de beta-catenina después del tratamiento con ácido desoxicólico (DCA).

La FIG. 3 ilustra los resultados del método de tinción con TMRM (Tetrametilrodamina, Éster metílico, Perclorato) para determinar si el ácido cólico, el ácido litocólico y el ácido desoxicólico tienen un efecto de protección de mitocondrias.

La FIG. 4 ilustra los resultados del método de recuento de células (FIG. 4A) y el método de tinción de CCK-8 (FIG. 4B) para determinar el efecto de proliferación celular identificado mediante el tratamiento de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) con TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico entre los ácidos biliares.

La FIG. 5 ilustra los resultados del método de tinción celular (FIG. 5A) y el método de recuento celular (FIG. 5B) que cuenta el número de células que pasan a través de la membrana usando una cámara de Boyden para determinar el efecto de migración celular identificado mediante el tratamiento de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico entre los ácidos biliares.

La FIG. 6 ilustra una fotografía de tejido de un modelo en ratón que identifica el efecto inhibitor del ácido biliar sobre la lesión por reperfusión en ratón (FIG. 6A) y los resultados de cuantificar el área del tejido infartado con respecto al área total en % en la fotografía de tejido (FIG. 6B).

La FIG. 7 ilustra gráficos que muestran los resultados de la tinción con colorante de fluorescencia Anexina-vivo 750 (FIG. 7A) y el efecto de la concentración de ácido desoxicólico sobre la reducción de la muerte de células miocárdicas con el fin de examinar la inhibición de la necrosis miocárdica por lesión por reperfusión mediante ácido desoxicólico en ácido biliar (FIG. 7B).

Modos de la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la lesión por isquemia-reperfusión provocada por isquemia miocárdica, la composición que contiene un ácido biliar o una

sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde el ácido biliar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxicólico y ácido cólico y el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo ha de administrarse en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.

- 5 En la presente divulgación, los ácidos biliares tienen excelentes efectos de aumentar los niveles intranucleares de beta-catenina, interferir con la apertura de un poro de transición de permeabilidad de las mitocondrias (mPTP) y aliviar la lesión tisular y reducir el tamaño de los infartos en modelos animales de lesión por isquemia-reperfusión, siendo de este modo utilizables en la prevención, el tratamiento o el alivio de la lesión por isquemia-reperfusión.
- 10 En la presente divulgación, los ácidos biliares pueden ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico y ácido desoxicólico (DCA), preferentemente, ácido cólico.

El ácido cólico y el ácido desoxicólico pueden prevenir y tratar eficazmente la lesión por isquemia-reperfusión incluso a una concentración baja.

- 15 A menos que se especifique lo contrario, la sal farmacéuticamente aceptable de ácidos biliares de la presente invención incluye una sal ácida o básica que puede estar presente en los ácidos biliares. Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable incluye sales de sodio, calcio y potasio que tienen un grupo hidroxilo. Además, sales bromhidrato, sulfato, hidrogenosulfato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, acetato, succinato, citrato, tartrato, lactato, mandelato, metanosulfonato (mesilato) y p-toluenosulfonato (tosilato) que tienen un grupo amino. La sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse mediante los métodos bien conocidos en la técnica. La sal farmacéuticamente aceptable es preferentemente sal gluconato de sodio o sal taurato de sodio, pero sin limitación.
- 20

- 25 En la presente divulgación, "lesión isquémica" se refiere a una lesión que se produce como resultado de una restricción en el suministro de sangre y, por lo tanto, la escasez de suministro de oxígeno a los órganos que requieren suministro de sangre, tales como el corazón, cerebro, riñones, etc., lo que puede conducir a daños fatales tales como la disfunción de tejidos y la muerte celular. La causa de una lesión isquémica incluye enfermedad vascular, trombosis coronaria, trombosis cerebrovascular, ruptura de aneurisma, hemorragia sistémica, lesión por aplastamiento, septicemia, quemadura de piel grave, cirugía de ligadura vascular (por ejemplo, isquemia espinal durante cirugía de aneurisma toracoabdominal), bypass cardiopulmonar, trasplante de órganos, colapso cardiopulmonar (muerte cardíaca súbita), asfixia, etc., pero sin limitación.
- 30

- 35 En la presente divulgación, la "lesión isquémica" también incluye la lesión isquémica-por reperfusión que puede producirse, por ejemplo, durante el trasplante de órganos, además de la lesión isquémica provocada convencionalmente.

En la presente invención, la "lesión por isquemia-reperfusión" es provocada por isquemia miocárdica.

- 40 La lesión por isquemia-reperfusión puede ser provocada por el restablecimiento del flujo sanguíneo en un tejido u órgano que ha experimentado un evento natural tal como el restablecimiento del flujo sanguíneo después de un traumatismo (por ejemplo, infarto agudo de miocardio) o la reducción del suministro de sangre; o la cirugía de reperfusión (por ejemplo, uno o más procedimientos quirúrgicos para restablecer el flujo sanguíneo en un tejido u órgano que ha experimentado una reducción del suministro de sangre), otras intervenciones terapéuticas o procedimientos de trasplante de órganos. Dichos procedimientos quirúrgicos incluyen, por ejemplo, cirugía de bypass de arterias coronarias, angioplastia coronaria, procedimiento de trasplante de órganos y similares.
- 45

- 50 Por ejemplo, el infarto agudo de miocardio se refiere al fenómeno de muerte y necrosis del músculo cardíaco debido a la falta de oxígeno y nutrientes provocada por la oclusión de uno de los vasos cardíacos. En este caso, por lo general, el paciente debe visitar el hospital y el vaso sanguíneo debe reperfundirse en 1 hora. Por lo tanto, la tasa de mortalidad puede reducirse a menos del 10 %. Sin embargo, en aproximadamente el 10 % de los pacientes, las células miocárdicas se lesionan debido al suministro rápido de oxígeno resultante de la reperfusión de vasos sanguíneos bloqueados, que se denomina lesión por reperfusión. Debido a la lesión por reperfusión, aproximadamente el 10 % de los pacientes mueren dentro de los 30 días posteriores al procedimiento y aproximadamente el 30 % de los pacientes supervivientes tienen síntomas tales como insuficiencia cardíaca.
- 55

- 60 Como se usa en el presente documento, la expresión "cirugía de reperfusión" se refiere a una cirugía o procedimiento para eliminar el trombo generado en los vasos sanguíneos y permitir que el flujo sanguíneo fluya nuevamente, que puede incluir trombectomía quirúrgica y manipulación inducida por reperfusión usando un stent, pero sin limitación. La cirugía de reperfusión puede usarse para complementar las desventajas del agente terapéutico de reperfusión (por ejemplo, activadores de plasminógeno tales como tPA).

- 65 La cirugía de reperfusión puede incluir un método de succión de trombos aplicando presión negativa (trombectomía proximal), un método de extracción de trombos con bobina (trombectomía distal), un método de inserción de un stent en vasos sanguíneos estrechados para ensanchar los vasos sanguíneos y eliminar el trombo con el stent juntos (extractor de stents) y similares. La trombectomía proximal es un método de eliminación de trombos aplicando una presión negativa que se acerca al trombo proximal, usando principalmente un dispositivo de succión, tal como el

sistema Penumbra. La trombectomía distal es un método de eliminación del trombo de una porción distal sobre el trombo con un alambre, usando principalmente un dispositivo de bobina, tal como el sistema Merci. El extractor de stents es un método de inducción de la reperfusión de un vaso sanguíneo insertando un stent como una arteria coronaria. La composición de acuerdo con la presente invención puede aplicarse a diversas cirugías de reperfusión con fines de reperfusión además de las cirugías mencionadas anteriormente.

En la presente divulgación, la cirugía de reperfusión se refiere a cirugía o tratamiento realizado para tratar enfermedades cerebrovasculares, arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares y similares, pero sin limitación.

La enfermedad cerebrovascular incluye ictus, infarto cerebral, trombosis cerebral y embolia cerebral, pero sin limitación. La enfermedad cardiovascular incluye infarto de miocardio y angina de pecho, pero sin limitación.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse antes, durante o después de la aparición de una lesión por isquemia-reperfusión, por ejemplo, para el pretratamiento de la cirugía de reperfusión. La composición farmacéutica de la presente divulgación se administra en los vasos sanguíneos de un paciente antes de la cirugía de reperfusión vascular de manera que sea útil para prevenir, tratar o mejorar la lesión tisular, tal como la lesión miocárdica, después de la reperfusión.

Además, como se describe en el presente documento, las lesiones provocadas por isquemia y la lesión provocada por isquemia o reperfusión isquémica pueden inducir apoptosis en células, tejidos u órganos enfermos, conduciendo a alteración y disfunción. Para la prevención o el tratamiento de lesión isquémica o lesión por isquemia-reperfusión, por ejemplo, el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención puede administrarse a un sujeto para someterse a una cirugía de reperfusión, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas, y preferentemente aproximadamente 2 horas antes de la cirugía de reperfusión.

Como alternativa o adicionalmente, el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención puede administrarse a un sujeto después de la cirugía de reperfusión o durante la cirugía de reperfusión. Por ejemplo, el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden administrarse más de una vez a intervalos regulares durante la cirugía de reperfusión. Como alternativa, el ácido biliar puede administrarse de forma continua a lo largo de la duración de la cirugía de reperfusión. Además, por ejemplo, el ácido biliar de la presente invención puede administrarse a un sujeto que se sometió a cirugía de reperfusión después de la cirugía de reperfusión. El ácido biliar de la presente invención puede administrarse a un sujeto que se sometió a una cirugía de reperfusión, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas después de la cirugía de reperfusión. El ácido biliar o la sal aceptable del mismo de la presente invención también pueden usarse para inhibir la lesión por isquemia o isquemia-reperfusión a células, tejidos u órganos *in vitro* (por ejemplo, tejidos utilizados en procedimientos de trasplante, órganos utilizados en trasplante de órganos) antes de la cirugía de reperfusión. Por ejemplo, el órgano puede ponerse en contacto con ácido biliar (por ejemplo, sumergiendo el órgano en el baño con la composición que contiene ácido biliar de la presente invención) antes de implantar el órgano en el cuerpo hospedador (por ejemplo, durante el almacenamiento o el transporte del órgano en un ambiente estéril) para inhibir la isquemia o la lesión por isquemia-reperfusión. Preferentemente, una única inyección intravenosa antes de la cirugía de reperfusión de un sujeto que tiene un infarto agudo de miocardio puede inhibir la lesión cardíaca debido a la cirugía de reperfusión.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir además un agente terapéutico para la reperfusión (agente terapéutico para la recanalización). Además, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede usarse en combinación con un agente terapéutico de reperfusión.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un inhibidor de la apertura de mPTP.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un agonista de beta-catenina.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación son para proteger las mitocondrias.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación inhiben el infarto del tejido.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación es un agonista de beta-catenina, lo que reduce significativamente el fenómeno de muerte o necrosis del músculo cardíaco provocado por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) debido a la rápida captación de oxígeno durante

la reperusión de los vasos sanguíneos bloqueados. Por lo tanto, puede reducir la tasa de mortalidad del 10 % en los 30 días posteriores a la cirugía de reperusión y reducir los síntomas de insuficiencia cardíaca en aproximadamente el 30 % de los pacientes después de la cirugía de reperusión. mPTP se forma en la membrana interna mitocondrial. mPTP se abre para inducir la despolarización de las mitocondrias, dando como resultado una disfunción de las mitocondrias. El ácido biliar actúa como un agonista de beta-catenina, interfiriendo en la apertura de mPTP para inhibir la despolarización mitocondrial, protegiendo de este modo las mitocondrias y evitando la lesión oxidativa de las mitocondrias para inhibir el infarto tisular. En consecuencia, tiene el efecto de prevenir, tratar o mejorar la lesión por isquemia-reperusión.

La composición farmacéutica que contiene el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede formularse en la forma de preparaciones inyectables u orales. Además, la preparación inyectable que contiene la composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse a través de diversas vías, incluyendo la oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa o muscular, pero preferentemente puede administrarse por vía intravenosa. La preparación inyectable que contiene la composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de su administración al sujeto. La preparación inyectable se administra preferentemente por vía subcutánea, por vía muscular o por vía intravenosa, y mucho más preferentemente por vía intravenosa. Cuando se administra por vía intravenosa, puede administrarse mediante inyección intravenosa una vez antes de la cirugía de reperusión y la única inyección intravenosa puede mejorar eficazmente la lesión de órganos tales como el corazón debido a la cirugía de reperusión. Además, la preparación oral puede seleccionarse del grupo que consiste en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes y preparaciones liofilizadas, pero sin limitación.

El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente divulgación puede administrarse a un sujeto a través de administración intraperitoneal, administración intranasal, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intracerebroespinal, administración por inhalación o administración oral. Además, los ingredientes eficaces de la composición farmacéutica de la presente invención varían dependiendo de la edad, el sexo, el peso, la patología y la gravedad del sujeto al que se les va a administrar, la vía de administración o el criterio del prescriptor. La determinación de la dosis óptima basándose en estos factores está dentro del nivel de los expertos en la materia, pero puede usarse a una concentración similar o inferior con respecto a la concentración aprobada por la FDA. Más específicamente, la dosis diaria de los mismos es de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, específicamente de 0,5 mg/kg/día a 5 mg/kg/día, más específicamente de 0,8 mg/kg/día a 3 mg/kg/día, además específicamente de 1 mg/kg/día a 2 mg/kg/día, pero sin limitación. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse de una a tres veces al día, pero sin limitación.

Las formulaciones para la administración parenteral de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser inyecciones, gotas, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorios, parches o agentes de pulverización, pero sin limitación. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener aditivos tales como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, colorantes, fragancias o edulcorantes según sea necesario.

La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse mediante un método convencional en la técnica.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, antes, después o simultáneamente con otros agentes terapéuticos. El ácido biliar de la presente divulgación y otros agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente pueden coadministrarse simultáneamente (por ejemplo, coadministración) en forma de una formulación separada o en forma de una coformulación. Como alternativa, el agonista puede administrarse secuencialmente en forma de una composición separada dentro de un marco de tiempo razonable según lo determine un médico experto (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para permitir la superposición de los efectos farmacológicos de los agentes terapéuticos por la terapia). El ácido biliar y uno o más de otros agentes terapéuticos de la presente divulgación pueden administrarse en una dosis única o en múltiples dosis de acuerdo con dichos programas en un orden adecuado para lograr el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, reducción y/o inhibición de la isquemia, reducción y/o inhibición de la lesión isquémica; y la reducción y/o inhibición de la lesión por isquemia-reperusión). Las dosificaciones y la terapia de administración adecuadas pueden ser determinadas por el médico y dependen del agonista o agonistas, la formulación farmacéutica y la vía de administración seleccionados, de diversos factores relacionados con el paciente y otras consideraciones.

Otros agentes terapéuticos adecuados que pueden administrarse con la composición farmacéutica de la presente divulgación incluyen bloqueantes de los canales de calcio, betabloqueantes, nitroglicerina, aspirina, antiinflamatorios, diuréticos de sodio, vasodilatadores, agentes trombolíticos y agentes antitrombóticos, pero sin limitación.

Además, la presente divulgación proporciona una composición alimenticia para su uso en la prevención o la mejora de la lesión por isquemia-reperusión, conteniendo la composición un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La composición alimenticia puede usarse para alimentos saludables y, en la presente divulgación, el ácido biliar puede añadirse intacto o usarse con otros alimentos o ingredientes alimentarios en el alimento saludable y puede usarse adecuadamente de acuerdo con métodos convencionales.

5 No hay ninguna limitación particular en cuanto al tipo de alimentos. Los ejemplos del alimento incluyen bebidas, carne, salchichas, pan, galletas, pasteles de arroz, chocolates, caramelos, aperitivos, productos de confitería, pizza, fideos de ramen, otros fideos, gomas, productos lácteos, incluyendo helado, diversas sopas, bebida, alcoholes y complejos vitamínicos, e incluye todos los alimentos saludables en un sentido convencional.

10 El ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de la presente divulgación pueden añadirse intactos al alimento o pueden usarse junto con otros alimentos o ingredientes alimentarios y pueden usarse adecuadamente de acuerdo con métodos convencionales. La cantidad del principio activo que ha de mezclarse puede determinarse adecuadamente de acuerdo con su fin de uso (para la prevención o la mejora). Generalmente, la cantidad de ácido biliar en el alimento natural puede añadirse en una cantidad del 0,01 % en peso al 15 % en peso del peso total del
15 alimento, y la cantidad de ácido biliar en la composición de bebida natural puede añadirse en una cantidad de 0,02 g a 5 g, preferentemente de 0,3 g a 1 g con respecto a 100 ml de la composición de bebida saludable. Sin embargo, la cantidad puede ser inferior al intervalo descrito anteriormente en el caso de una ingesta a largo plazo destinada a fines de salud e higiene o con fines de control de la salud. Puesto que no hay ningún problema en términos de seguridad, el principio activo puede usarse en una cantidad que supere el intervalo descrito anteriormente.

20 La composición de bebida funcional para la salud de la presente divulgación no tiene limitación particular sobre otros componentes distintos de los que contienen ácido biliar como principio activo en la relación indicada y puede contener diversos aromas o hidratos de carbono naturales como ingrediente adicional como bebidas convencionales. Los ejemplos de los hidratos de carbono naturales mencionados anteriormente incluyen monosacáridos tales como
25 glucosa y fructosa; disacáridos tales como maltosa y sacarosa; y polisacáridos tales como azúcares convencionales incluyendo dextrina y ciclodextrina y alcoholes de azúcar incluyendo xilitol, sorbitol, eritritol y similares. Pueden usarse ventajosamente aromas naturales tales como extractos de tau martin y stevia (por ejemplo, rebaudiósido A, glicirricina, etc.) y aromas sintéticos tales como sacarina y aspartamo, como aromas distintos de los descritos anteriormente.

30 Además de lo anterior, la composición alimenticia de la presente divulgación puede incluir una diversidad de nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), aromas tales como aromas sintéticos y aromas naturales, agentes colorantes y agentes espesantes (queso, chocolate, etc.), ácidos pécticos y sales de los mismos, ácidos alginicos y sales de los mismos, ácidos orgánicos, agentes espesantes coloidales protectores, agentes ajustadores del pH, estabilizantes,
35 conservantes, glicerina, alcoholes, agentes de carbonatación utilizados en bebidas carbonatadas y similares.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe en detalle con referencia a ejemplos.

Ejemplo 1. Análisis del efecto del ácido biliar sobre el nivel de beta-catenina intranuclear

40 1.1 Cribado para el descubrimiento de agonista de beta-catenina

Se realizaron experimentos para identificar fármacos con un efecto potenciador sobre la beta-catenina analizando los efectos de diversos tipos de ácidos biliares sobre el nivel de beta-catenina intranuclear. Se realizó un ensayo por luciferasa de beta-catenina nuclear para examinar los efectos del tratamiento con ácido ursodesoxicólico, ácido
45 glicoquenodesoxicólico (GlicoquenoDCA), ácido taurodesoxicólico (TauroDCA), ácido glicocólico, ácido taurocólico (TauroCA), ácido quenodesoxicólico (QuenoDCA), ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido litocólico y ácido desoxicólico (DCA) en el cambio del nivel de beta-catenina intranuclear.

Específicamente, se usó la estirpe celular TCF/LEF indicador_HEK293 (BPS bioscience). La estirpe celular TCF/LEF indicador_HEK293 es una estirpe celular estable en la que la luciferasa se clona en el promotor TCF/LEF (promotor de unión a beta-catenina) en el núcleo. Cuando se mide el nivel de luciferasa después del tratamiento farmacológico, pueden obtenerse los niveles intranucleares de beta-catenina. Las estirpes celulares TCF/LEF indicador_HEK293 (BPS Bioscience) se dividieron en 24 pocillos (2×10^5 células) o 96 pocillos (2×10^4 células) y se cultivaron hasta que
50 las células se adhirieron al fondo de la placa. Con el fin de que las células estén en un estado de reposo, el medio de DMEM y FBS al 10 % se reemplazó con medio de FBS al 1 % y las células se cultivaron durante un día. Las células se trataron con los ácidos biliares descritos anteriormente en $1 \cdot \text{m}$ o $10 \cdot \text{m}$ y se cultivaron durante 24 horas. Posteriormente, la actividad de la luciferasa se midió usando un luminómetro. Los resultados de la medición se muestran en la FIG. 1.

60 Como se muestra en la FIG. 1, se confirmó que el TauroCA, el ácido cólico, el ácido litocólico y el ácido desoxicólico entre 10 tipos de ácidos biliares aumentaron significativamente los niveles de beta-catenina en el núcleo.

1.2 Identificación del aumento de la transferencia intranuclear de beta-catenina por ácido desoxicólico (DCA)

65 Se realizó una transferencia de Western para examinar el mecanismo de transferencia intranuclear de beta-catenina por ácido desoxicólico (DCA) identificado en el Ejemplo 1.1 anterior.

Las células se trataron con DCA 1 • M. Después de 30 minutos, 1, 2, 4 y 8 horas, se realizó una transferencia Western. Los resultados se muestran en la FIG. 2.

- 5 Como se muestra en la FIG. 2, se observó que la transferencia intranuclear de beta-catenina aumentó desde 30 minutos después del tratamiento con DCA y la cantidad de beta-catenina intranuclear de las células alcanzó su punto máximo 2 horas más tarde.

- 10 Por lo tanto, se identificó el TauroCA, el ácido cólico, el ácido litocólico y el ácido desoxicólico aumentaron el nivel de beta-catenina, lo que inhibe la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), suprimiendo de este modo la lesión por reperfusión. Por lo tanto, se ha confirmado que tienen potencial como candidatos para fármacos con efectos de potenciación de beta-catenina.

15 **Ejemplo 2. Identificación del efecto protector del ácido biliar en las mitocondrias - inhibición de la apertura de mPTP**

- Con el fin de examinar el efecto del ácido cólico, el ácido litocólico y el ácido desoxicólico en las mitocondrias, que se confirmó que tienen un efecto de aumento de los niveles de beta-catenina en el Ejemplo 1, se realizó el método de tinción de TMRM (tetrametilrodamina, éster metílico, perclorato). TMRM es un marcador fluorescente que tiñe las mitocondrias normales.

- 20 Específicamente, las células 293T se trataron con 1 • M y 10 • M de ácido cólico, ácido litocólico y ácido desoxicólico. Después de 1 hora, las células se trataron con CCCP (clorofenilhidrazona, 50 • M), que induce una estimulación similar a la reperfusión en las mitocondrias para abrir mPTP e inducir la polarización. Por lo tanto, se indujo la apertura de mPTP y la despolarización de las mitocondrias. Después de 45 minutos, las células se lavaron con PBS, se tiñeron con TMRM y se midieron usando un lector fluorescente. Los resultados de la medición se muestran en la FIG. 3. La ciclosporina A (Cyp), que es un inhibidor típico de la apertura del mPTP, se usó como control positivo.

- 30 Como se muestra en la FIG. 3, Cyp inhibió la lesión mitocondrial en aproximadamente el 50 % en el grupo tratado con Cyp, que era el control positivo, y el ácido litocólico también inhibió la lesión mitocondrial a un nivel similar al del grupo de control positivo. En particular, se confirmó que el ácido cólico y el ácido desoxicólico tenían efectos de inhibición de la lesión mitocondrial en aproximadamente el 90 %.

- 35 Por lo tanto, se confirmó que el tratamiento con ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido litocólico inhibió la apertura de mPTP inducida y suprimieron la despolarización de las mitocondrias, teniendo de este modo un excelente efecto de protección de las mitocondrias. Por lo tanto, se identificó que el ácido cólico, el ácido desoxicólico y el ácido litocólico podrían inhibir la lesión mitocondrial por reperfusión para suprimir la apoptosis o la necrosis que inducen una lesión irreversible de tejidos y órganos.

40 **Ejemplo 3. Identificación del efecto de proliferación celular y el efecto de migración celular *in vitro* del ácido biliar**

3.1 Identificación del efecto de proliferación celular *in vitro* del ácido biliar

- 45 Se realizaron experimentos para examinar los efectos de proliferación celular de TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico entre los ácidos biliares. Por lo tanto, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se trataron con TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico 1 • M. El método de recuento de células y el método de tinción de CCK-8 se realizaron para identificar los efectos de proliferación celular 24 horas después del tratamiento con TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico. Los resultados de estos experimentos se muestran en las FIG. 4A y 4B.

- 50 Como se muestra en la FIG. 4A, el ensayo de proliferación indicó que el ácido cólico y el ácido litocólico tenían efectos de proliferación celular más significativos que el grupo de control. Como se muestra en la FIG. 4B, el ensayo de CCK-8 indicó que el ácido cólico tenía un efecto de proliferación celular significativo. Por lo tanto, se confirmó que el ácido cólico y el ácido litocólico tenían efectos de inhibición de la lesión por isquemia-reperfusión a través de la proliferación celular.

3.2 Identificación del efecto de migración celular *in vitro* del ácido biliar

- 60 Se realizaron experimentos para examinar los efectos de migración celular de TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico entre los ácidos biliares. Por lo tanto, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se trataron con TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico 1 • M. Las células se contaron usando una cámara de Boyden para identificar los efectos de migración celular de TauroCA, ácido cólico y ácido litocólico. Los resultados de estos experimentos se muestran en las FIG. 5A y 5B.

- 65 Como se muestra en la FIG. 5A, se confirmó que sus efectos de migración celular provocados por el tratamiento con ácido cólico, TauroCA y ácido litocólico fueron significativamente más altos que los del grupo de control. Además,

como se muestra en la FIG. 5B, el ensayo de migración confirmó que la migración celular por el tratamiento con ácido cólico y ácido litocólico aumentó significativamente más que la del grupo de control. En particular, el ácido cólico mostró aproximadamente 2 veces más migración celular que el grupo de control y mostró el mejor efecto de migración.

- 5 Por lo tanto, se confirmó que el ácido cólico y el ácido litocólico migraban las células y tenían efectos de inhibición de la lesión por isquemia-reperfusión a través de la migración celular.

Ejemplo 4. Preparación del modelo en ratón de lesión por reperfusión e identificación del efecto inhibitor del ácido biliar sobre la lesión por reperfusión en ratón

10 Con el fin de preparar un modelo en ratón de lesión por reperfusión, se anestesiaron ratones Balb/C (de 8 semanas de edad) con ketamina. El tubo se intubó en la vía aérea y se conectó a un respirador. Después se corrigió el lado izquierdo del ratón hacia el lado superior y se hizo una incisión en la piel. El espacio se amplió entre la tercera y la cuarta nervaduras para fijar el corazón que ha de exponerse. El ácido desoxicólico o ácido cólico, que fue el más eficaz en los ensayos de cribado e *in vitro*, se inyectó en el ventrículo izquierdo en una concentración de 2 mg/kg, 10 mg/kg y 50 mg/kg usando un método de inyección vascular. Posteriormente, la arteria coronaria izquierda se ató y después se aflojó 40 minutos más tarde y se suturó. Después de 24 horas, los corazones se extrajeron y se congelaron a -20 °C durante 4 horas. Los corazones se cuaternizaron en un espesor de 2 mm. Cada tejido se cultivó y se tiñó con una solución de TTC al 2 % (en PBS) durante 40 minutos. Después, el tejido se transfirió a una solución de formol al 10 % y se almacenó durante un día. Se tomaron fotografías y los resultados se muestran en la FIG. 6A. Además, en la fotografía de tejido, el área del tejido infartado con respecto al área total se cuantificó como %, y el resultado se muestra en la FIG. 6B. La ciclosporina A (Cyp), una sustancia que inhibe la apertura de mPTP, se usó como control positivo.

- 25 Como se muestra en la FIG. 6A, se confirmó que el tejido vivo se tiñó de rojo y el tejido infartado se tiñó de blanco. Se confirmó que los tejidos tratados con 2 mg/kg de ácido desoxicólico y 2 mg/kg o 10 mg/kg de ácido cólico eran en su mayoría rojizos casi sin tinción blanca en comparación con el grupo de control.

30 Además, como se muestra en la FIG. 6B, el grupo de control positivo Cyp (5 mg/kg) mostró una reducción del área infartada en aproximadamente el 20 %, mientras que el grupo tratado con 2 mg/kg de ácido desoxicólico mostró una disminución de aproximadamente el 50 % y el grupo tratado con 2 mg/kg y 10 mg/kg de ácido cólico mostró una disminución de aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 40 %, respectivamente. Sin embargo, en el grupo tratado con ácido desoxicólico, las células murieron a una concentración de 10 mg/kg o más, y el ácido desoxicólico mostró el efecto a una concentración de 2 mg/kg o menos. El ácido cólico mostró la mejor eficacia a una concentración de 2 mg/kg. Por lo tanto, se confirmó que el efecto de suprimir la lesión por reperfusión es excelente cuando la concentración es baja.

40 Por lo tanto, se confirmó que las concentraciones bajas de ácido desoxicólico y ácido cólico podrían usarse como inhibidores de la lesión cardíaca después de la reperfusión.

Ejemplo 5. Identificación del efecto inhibitor del ácido biliar sobre la necrosis miocárdica en ratón en un modelo en ratón de lesión por reperfusión

45 Con el fin de confirmar el efecto inhibitor del ácido desoxicólico entre los ácidos biliares sobre la necrosis miocárdica provocada por la lesión por reperfusión, el ensayo se realizó para confirmar la necrosis miocárdica en ratón usando el colorante fluorescente Anexina-Vivo750.

50 Después de 24 horas, se inyectó colorante fluorescente Anexina-Vivo750 en el modelo de ratón preparado en el Ejemplo 3 para examinar el efecto del ácido desoxicólico (1, 2, 5 mg/kg (mpk)) por la concentración. Los resultados se muestran en las FIG. 7A y 7B. Se sabe que los colorantes de anexina se unen donde se produce la apoptosis y muestran fluorescencia.

55 Como se muestra en la FIG. 7A, se confirmó que el corazón no se tiñó en el grupo de control sin reperfusión, pero el grupo de control con cirugía de reperfusión mostró una fluorescencia fuerte. Además, como se muestra en la FIG. 7B, se confirmó que el grupo tratado con ácido desoxicólico 1 mg/kg o 2 mg/kg mostró el efecto de disminuir la muerte miocárdica en el 40 % o más en comparación con el grupo de control con cirugía de reperfusión. Por lo tanto, se confirmó que el ácido desoxicólico con baja concentración podría usarse como inhibidor de la lesión por reperfusión debido a la inhibición eficaz de la lesión por isquemia-reperfusión.

Ejemplo de formulación 1: Preparación de medicamentos

1.1 Preparación de las cápsulas

65 Ácido biliar: 100 ml
Almidón de maíz: 100 mg
Lactosa: 100 mg

Estearato de magnesio: 2 mg

Los componentes anteriores se mezclan y se cargan en cápsulas de gelatina para preparar comprimidos de acuerdo con un método de preparación de cápsulas convencional.

5

1.2 Preparación de las inyecciones

Ácido biliar: 100 ml

Agua estéril esterilizada para inyección: cantidad adecuada

Ajustador del pH: cantidad adecuada

10

Los componentes anteriores se incluyen en la cantidad anterior por 1 ampolla (2 ml) de acuerdo con un método de preparación de inyección convencional.

15

1.3 Preparación de líquidos

Ácido biliar: 100 ml

Azúcar: 20 g

Glucosa isomerizada: 20 g

Aroma de limón: cantidad adecuada

20

Se añadió agua purificada hasta alcanzar el volumen total de 1.000 ml. Los componentes anteriores se mezclan, después se cargan en un frasco de color marrón y se esteriliza para preparar líquidos de acuerdo con un método de preparación de líquidos convencional.

25

Ejemplo de formulación 2: Preparación de alimentos

2.1 Preparación de alimentos de harina

Se añadieron de 0,1 partes en peso a 10,0 partes en peso de la composición alimenticia de la presente divulgación a la harina de trigo, y la mezcla se usó para preparar pan, un pastel, una galleta, una galleta salada y un fideo para un alimento de mejora de la salud.

30

2.2 Preparación de productos lácteos

Se añadió a la leche de 0,1 partes en peso a 1,0 parte en peso de la composición alimenticia de la presente divulgación, y la mezcla se usó para preparar diversos productos lácteos tales como mantequilla y helado.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la lesión por isquemia-reperfusión provocada por isquemia miocárdica, comprendiendo la composición un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ácido biliar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxicólico y ácido cólico y el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo ha de administrarse en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde la lesión isquémica-por perfusión es provocada por cirugía de perfusión.
3. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición es para el pretratamiento de la cirugía de perfusión.
- 15 4. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un inhibidor de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP).
- 20 5. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un agonista de beta-catenina (* -catenina).
6. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es para proteger las mitocondrias.
- 25 7. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo inhibe el infarto tisular.
8. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición se formula en forma de una preparación oral o una preparación inyectable.
- 30 9. Una composición alimenticia para su uso en la prevención o la mejora de la lesión por isquemia-reperfusión provocada por isquemia miocárdica, comprendiendo la composición un ácido biliar o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ácido biliar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxicólico y ácido cólico y el ácido biliar o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo ha de administrarse en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.



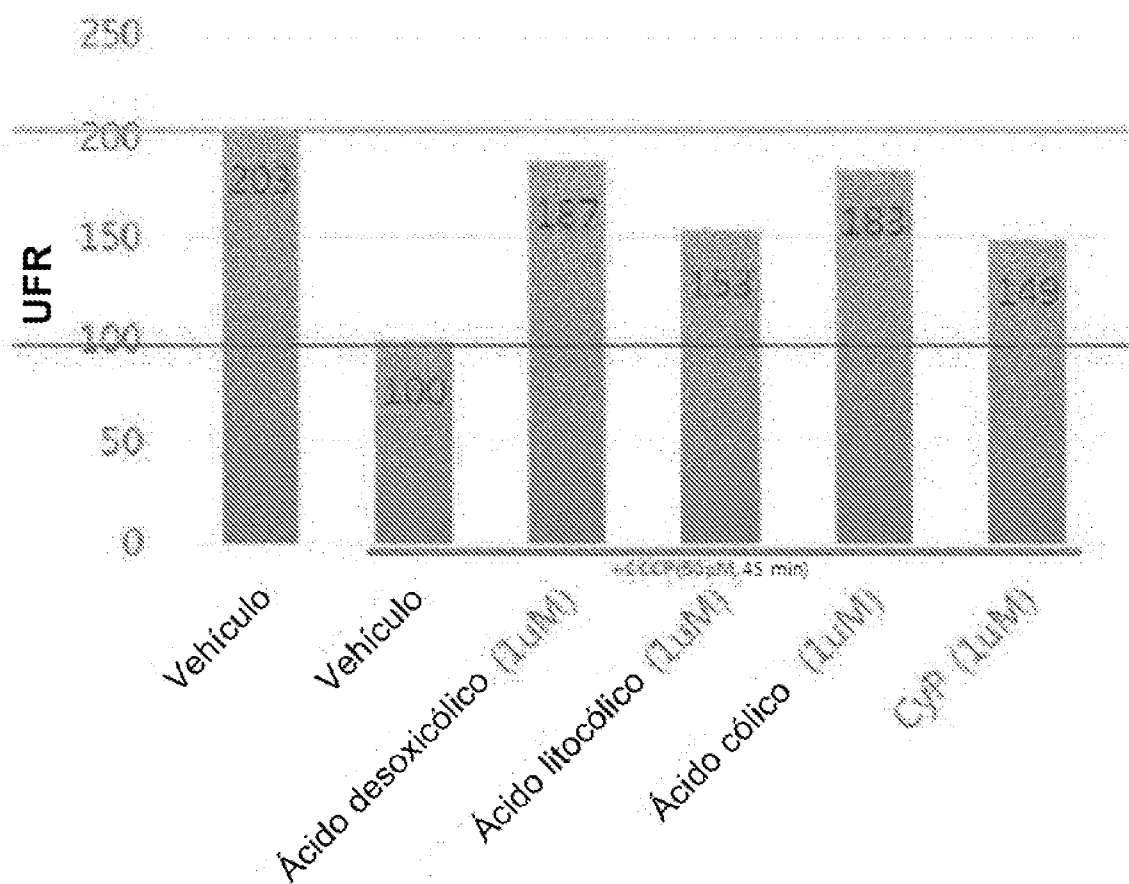


FIGURA 3

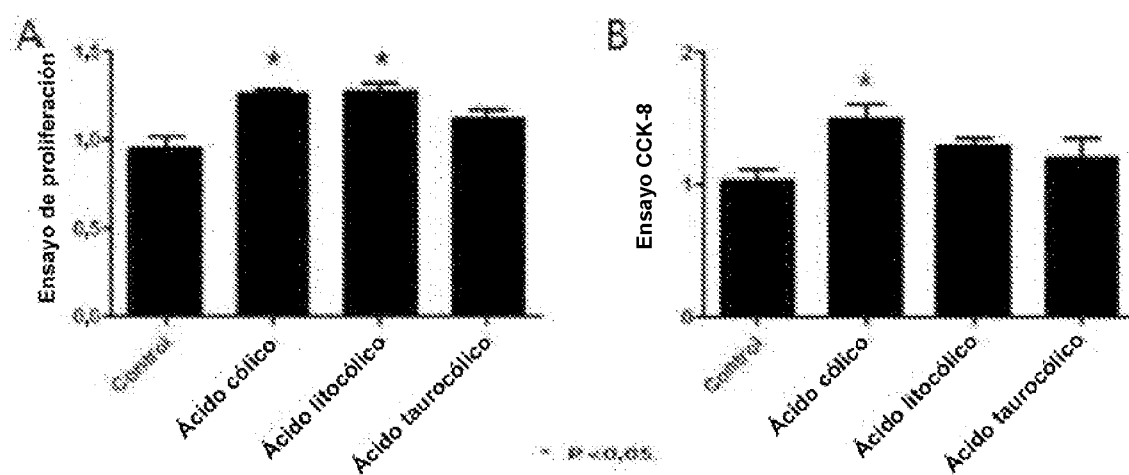
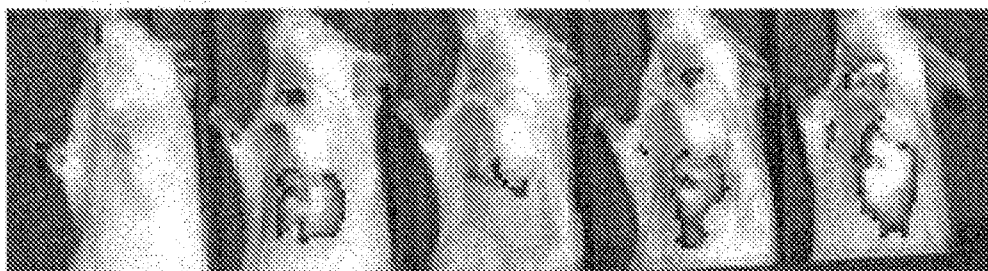


FIGURA 4

A

Reperusión

Vehículo Vehículo 1 mg/kg 2 mg/kg 5 mg/kg



B

Ácido desoxicólico (modelo de reperusión)

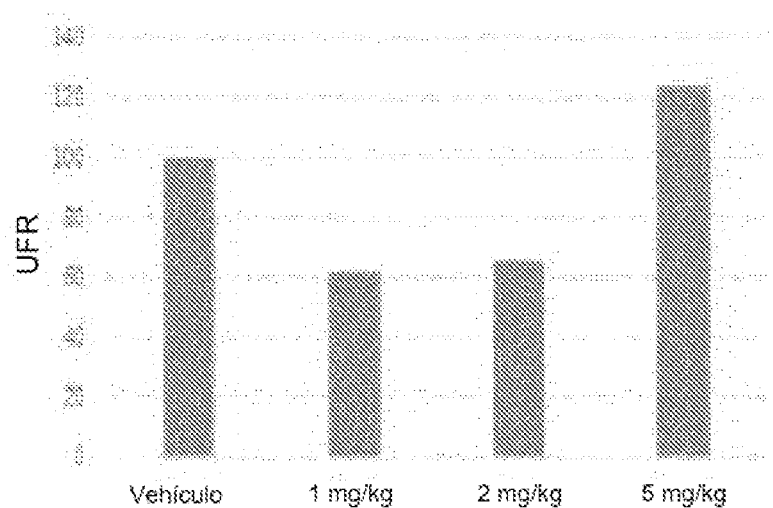


FIGURA 5

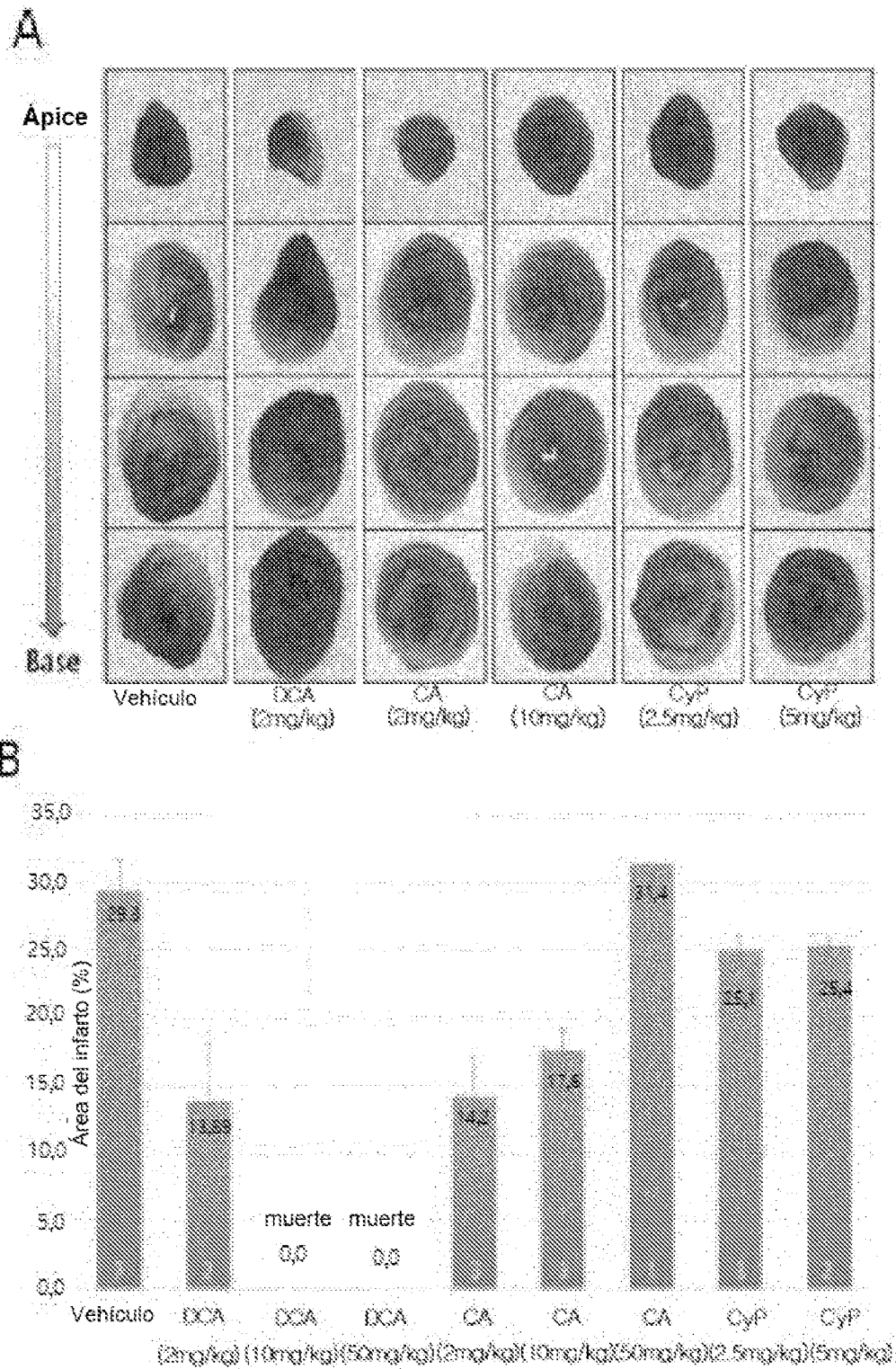


FIGURA 6

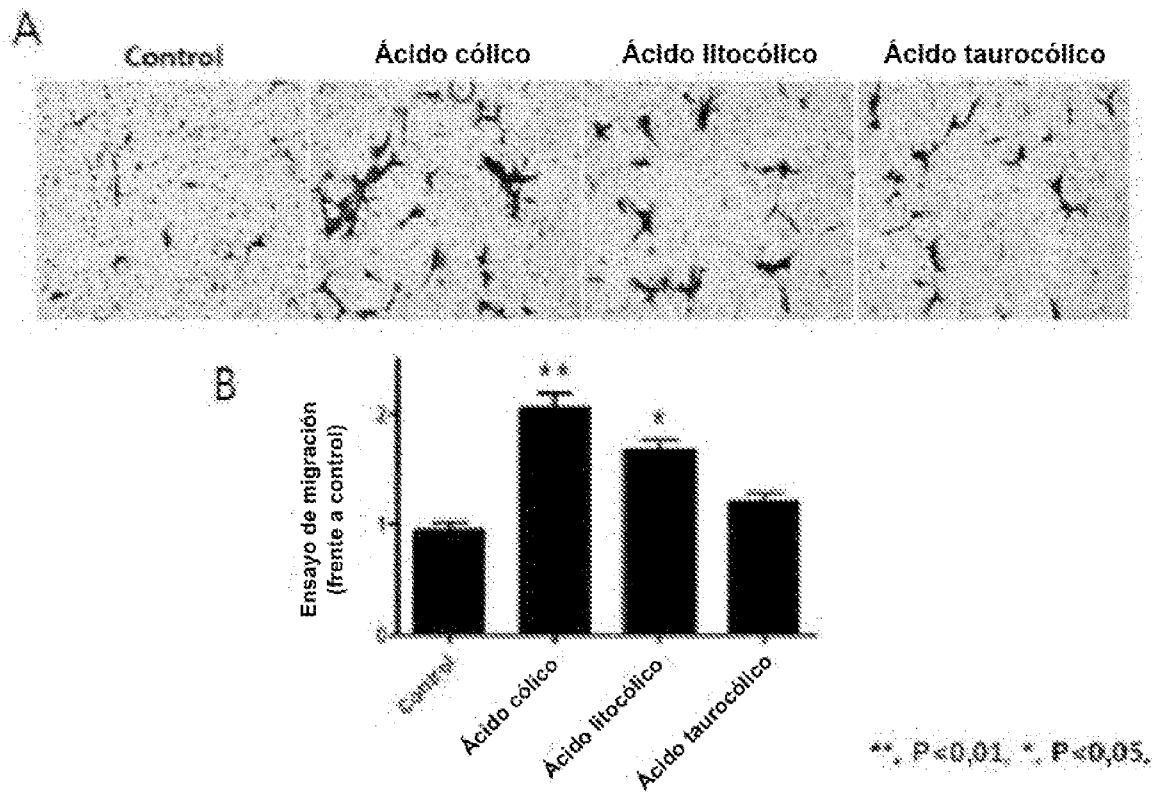


FIGURA 7