



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 362 770**

② Número de solicitud: 200931265

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/17 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.12.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.07.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Sevilla** (Titular al 47,50 %)
O.T.R.I.- Pabellón Brasil
Pº de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES
Centro de Investigación Biomedica en Red de
Enfermedades Hepáticas y Digestivas
(CIBEREHD) (Titular al 5 %) y
Fundación Pública Andaluza para la Gestión de la
Investigación en Salud de Sevilla (Titular al 47,50 %)

⑱ Inventor/es: **Bautista Palomas, Juan Dionisio;**
Díaz Herrero, María del Mar;
Vega Pérez, José Manuel;
Periñán Domínguez, Ignacio;
Jover Cobos, María;
Iglesias Guerra, Fernando y
Romero Gómez, Manuel

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Uso del compuesto *N*-fenil-*N*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la encefalopatía hepática.**

㉖ Resumen:

Uso del compuesto *N*-fenil-*N*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la encefalopatía hepática.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto *N*-fenil-*N*-(3-metil-2-butenil)tiourea y al uso del compuesto *N*-fenil-*N*-(3-metil-2-butenil)tiourea y de dicha composición farmacéutica en la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamonemia, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la encefalopatía hepática en general o la encefalopatía hepática provocada por cirrosis en particular. Este compuesto es capaz de inhibir parcialmente la actividad enzimática de la glutaminasa intestinal activada por fosfato (GAP), provocando una reducción en la producción de amonio.

ES 2 362 770 A1

DESCRIPCIÓN

Uso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la encefalopatía hepática.

La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular, la medicina y la farmacología y se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea y al uso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea y de dicha composición farmacéutica en la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamonemia, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la encefalopatía hepática en general o la encefalopatía hepática provocada por cirrosis en particular.

Estado de la técnica anterior

La encefalopatía hepática (EH) es una complicación neurológica severa de la cirrosis que se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de amonio en el plasma o en los tejidos del paciente (Bosoi, *et al.*, 2009, *Metabolic Brain Disease*, 24: 95-102). En los pacientes sanos, el amonio se detoxifica por medio del ciclo de la urea, pero en aquellos pacientes que presentan daños en esta capacidad de detoxificación, como es el caso de enfermos del hígado en general y en la EH en particular, el amonio se concentra en la sangre provocando un daño cerebral (Hazell, *et al.*, 1999, *P.S.E.B.M.*, 222(2): 99-112).

El amonio es principalmente generado en el intestino a partir de diversas fuentes: componentes nitrogenados de la dieta, deamidación de la glutamina y rotura de la urea por la ureasa presente en la flora del colon (Huizenga, *et al.*, 1996, *Annals of Clinical Biochemistry*, 33:23-30). La glutaminasa es la enzima que metaboliza la deamidación de la glutamina y ha sido descrita como una enzima importante en la patogénesis de la EH (Romero-Gómez, 2005, *Metabolic Brain Disease*, 20(4): 319-325). En el intestino, la actividad de la glutaminasa se ha asociado con EH mínima, debido probablemente a su papel en la regulación de la generación de amonio.

La importancia de diagnosticar la presencia de encefalopatía hepática mínima (EHM) radica en que su presencia se relaciona con el desarrollo posterior de episodios de encefalopatía hepática, lo cual implica una menor supervivencia, así como una peor calidad de vida y un mayor riesgo de sufrir accidentes de tráfico o laborales. No obstante, a pesar de su importancia no existen tratamientos eficaces para esta entidad por lo que, aún en casos de pacientes con alto riesgo de desarrollar encefalopatía hepática clínica, no se indica tratamiento alguno. Hasta el momento se han planteado tímidos abordajes para el tratamiento de la EHM utilizando disacáridos no absorbibles, antibióticos y probióticos. Sin embargo, ninguno de estos fármacos ha demostrado de forma clara su utilidad. Una revisión sistemática reciente (Als-Nielsen, *et al.*, 2004, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2):CD003044) confirmó que los disacáridos no absorbibles muestran una eficacia similar al placebo y que los antibióticos, tipo rifaximina, podrían añadir un ligero efecto beneficioso.

Teniendo en cuenta que cada vez hay más datos que apuntan hacia un papel primordial del amonio en la fisiopatología de EHM (Shawcross, *et al.*, 2005, *Lancet*, 365:431-3), ya que la mayor parte del amonio sistémico es producido por la glutaminasa activada por fosfato (GAP) intestinal y renal, y que el amonio producido en los astrocitos es debido a la actividad glutaminasa cerebral, la inhibición de esta enzima constituye una de las principales dianas potenciales para el tratamiento de la EH.

Se han descrito dos tipos de glutaminasa mitocondrial, la glutaminasa hepática (L-GAP) y la glutaminasa tipo renal (K-GAP) o extrahepática (que se localiza también en otros órganos como el intestino). En humanos, la mayor actividad glutaminasa se localiza en el duodeno. Existen datos indirectos que sugieren que la actividad glutaminasa del enterocito está aumentada en pacientes cirróticos, como demuestra el hecho de que tras la administración de glutamina oral se produce un rápido aumento de la amoniemia en individuos cirróticos pero no en los controles sanos (Romero-Gómez, *et al.*, 2002, *Journal of Hepatology*, 37:781-787). La hiperamonemia es muy marcada en pacientes con cirrosis hepática con mala función hepática, pero este marcado incremento en la producción de amonio tras la ingestión de glutamina se normaliza tras la realización del trasplante hepático y la normalización de la función hepática. La actividad específica de la glutaminasa en el enterocito es un punto crucial en la estabilidad del metabolismo nitrogenado en pacientes con cirrosis hepática. Se ha demostrado que la actividad glutaminasa está aumentada en individuos cirróticos frente a controles y que esta actividad se relaciona con la existencia de encefalopatía y el grado de disfunción hepática (Romero-Gomez, *et al.*, 2004, *Journal of Hepatology*, 41:49-54). Así, también la acumulación de glutamina en el astrocito es responsable, en gran parte, de la toxicidad inducida por amonio (Albrech, *et al.*, 2006, *Hepatology*; 44:788-794).

El cDNA de la glutaminasa humana tipo-renal (hK-GAP) fue clonado en 1998 y posteriormente fueron aislados los cDNAs que codificaban para tres isoformas de la hK-GAP, que se designaron como: K-GAP (que se expresa predominantemente en riñón, intestino y cerebro, pero no en hígado), M-GAP (que se expresa sólo en músculo cardíaco y esquelético), y C-GAP (que se expresa fundamentalmente en músculo cardíaco y páncreas pero no en cerebro ni en hígado). La K-GAP es la isoforma renal y tiene 669 aminoácidos, la C-GAP es una proteína de 598 aminoácidos y difiere de la K-GAP en el extremo carboxílico y la M-GAP es una proteína de 169 aminoácidos, que es idéntica a la C-GAP hasta el aminoácido 161 y los 8 restantes son únicos. Mediante la secuenciación del ADN genómico fue propuesto que las tres isoformas eran el producto de splicings alternativos del mismo gen. Empleando la técnica de Hibridación *In Situ*, se localizó el gen GLS en la región cromosómica 2q32-q34. La secuencia genómica de GLS se en-

cuentra disponible a través del *Gene Data Bank* (GDB) con el número de acceso GDBID 119993. Este gen comprende unas 85,5 Kb del ADN genómico. Está constituido por 18 exones interrumpidos por 17 intrones. La transcripción de este gen da lugar a un mRNA de 4.606 nucleótidos de tamaño. Recientemente se han descrito dos haplotipos de este gen: TACG y CACG, que condicionan una menor actividad de la glutaminasa, lo que se traduce en una menor producción intestinal de amonio y una mejor función hepática y menor riesgo de desarrollar encefalopatía hepática (Romero-Gómez, *et al.*, 2006, *Hepatology*, 44:685).

Por otro lado, se han descrito inhibidores de la glutaminasa como mersalyl, *N*-etil maleimida, 5-oxo-6-Norleucina (DON). El DON se ha utilizado en la inhibición de glutaminasa en cultivos celulares de astrocitos demostrando la importancia de la actividad GAP en el daño celular inducido por el amonio. También, en ratas sometidas a derivación porto-cava, la neomicina inhibe la actividad glutaminasa intestinal (Hawkins, *et al.*, 1994, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 368:125-34), aunque los mecanismos por los que la neomicina puede inhibir la actividad glutaminasa no están descritos. La actividad glutaminasa está aumentada en pacientes con altos niveles de óxido nítrico, de glucagón o de factor de necrosis tumoral.

Así pues, en base todo lo indicado, sería interesante inhibir la actividad glutaminasa como diana terapéutica en el manejo de la encefalopatía hepática. Para ello, es muy importante investigar nuevas moléculas que sirvan para tal fin que puedan ser empleadas en el tratamiento de la EHM, así como para disminuir la producción intestinal de amonio, ya que la concordancia de ambos factores determina un alto riesgo de encefalopatía y una menor supervivencia. Sin embargo, a la hora de desarrollar estas moléculas inhibitoras es necesario tener en cuenta que la inhibición completa de la actividad enzimática de la glutaminasa podría dañar severamente la función normal de los enterocitos, por lo que las moléculas inhibitoras de la actividad de la glutaminasa han de provocar una reducción en la producción de amonio, es decir, una inhibición parcial de la actividad enzimática, pero sin afectar significativamente la funcionalidad del enterocito.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un compuesto capaz de inhibir parcialmente la actividad enzimática de la glutaminasa intestinal activada por fosfato (GAP), el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea o sus derivados, provocando una reducción en la producción de amonio. Por ello, este compuesto o sus derivados podrían ser empleados en la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamonemia, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la encefalopatía hepática en general (EH) o la encefalopatía hepática provocada por cirrosis en particular.

Bajo la hipótesis de que la inhibición de la actividad glutaminasa se acompaña de una reducción de la hiperamonemia, de una mejoría en el test de aprendizaje y de un descenso de la actividad glutaminasa intestinal y renal en ratas sometidas a derivación porto-cava (modelo experimental *in vivo* de encefalopatía hepática), en la presente invención se ha detectado un compuesto, *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea, capaz de inhibir la actividad glutaminasa en ratas con derivación porto-cava a partir del screening de una librería de compuestos químicos inhibitoras de la glutaminasa. Otros inhibidores de la K-GAP, que presentan afinidad por reactivos de mareaje o sustratos análogos, poseen estructuras similares a la de la glutamina, sin embargo, este no es el caso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea.

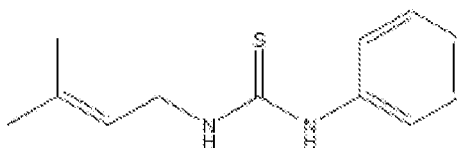
Otros compuestos químicos cuya actividad inhibitora de la glutaminasa ha sido ensayada en la presente invención son: *N*-geranil-*N'*-metiltiourea, *N*-etil-*N'*-geranilurea, *N*-etoxicarbonilmetil-*N'*-geraniltiourea, *N*-(3-metil-2-butenil)-*N'*-(4-nitrofenil)tiourea, *N*-etil-*N'*-(3-metil-2-butenil)urea, *N*-farnesil-*N'*-(4-nitrofenil)tiourea, 3-farnesil-2-tioxoimidazolidin-4-ona, *N*-etil-*N'*-farnesilurea, *N*-farnesil-*N'*-fenilurea o *N*-alil-*N'*-farnesilurea. No obstante, todos estos compuestos mostraron una elevada inhibición de la enzima, conduciendo así a una elevada toxicidad.

Debido a que el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea produce una inhibición parcial sobre la actividad de la GAP, se convierte de un candidato idóneo para su uso en el control de la hiperamonemia en, por ejemplo, pero sin limitarnos, pacientes de EH, ya que la enzima, aunque parcialmente inhibida, es capaz de continuar realizando su función fisiológica en un menor grado, lo que permite al mismo tiempo el mantenimiento de la funcionalidad de los enterocitos y una reducción de la toxicidad provocada por la acumulación de amonio.

Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto, *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea de ahora en adelante "compuesto de la invención", para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamonemia. En una realización preferida, las enfermedades que cursan con hiperamonemia se seleccionan de la lista que comprende: errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea, errores congénitos del metabolismo de la lisina, acidemias orgánicas, hiperamonemia transitoria del recién nacido, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática o cirrosis. En una realización más preferida, la enfermedad es la cirrosis. En una realización aún más preferida, la enfermedad es la encefalopatía hepática.

ES 2 362 770 A1

El compuesto de la invención “*N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea” se define como el compuesto de CAS-RN: 104741-27-7 descrito por Iliceto, *et al.*, 1960, *Gazzetta Chimica Italiana*, 90:919-40, de fórmula:



Se incluyen dentro de esta definición cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de las combinaciones de los mismos.

El compuesto de la invención ejerce su acción inhibitoria de la actividad enzimática de GAP a una concentración que se encuentra, preferiblemente, en un rango de entre 1 μM y 10 mM. Por ello, en una realización preferida, el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea se encuentra en un rango de concentraciones de entre 1 μM y 10 mM. En una realización más preferida, el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea se encuentra en un rango de concentraciones de entre 5 μM y 8 mM.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta descripción, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una preparación que comprenda, al menos, el inhibidor *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o sus combinaciones.

El medicamento comprende, al menos, el compuesto de la invención. El compuesto de la presente invención, derivados farmacéuticamente aceptables o sus profármacos, se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, preferiblemente junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El medicamento es útil para el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamoniemia, preferiblemente, la encefalopatía hepática.

Por un “derivado farmacéuticamente aceptable” se entiende cualquier sal, farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que después de su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos.

Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de la invención que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos del compuesto de la invención. El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado del compuesto de la invención, que cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de la invención en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de la invención cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de la invención en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de la invención en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, supone combatir los efectos causados como consecuencia de enfermedades que cursan con hiperamoniemia, preferiblemente, encefalopatía hepática, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores. El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sea cualquier enfermedad que curse con hiperamoniemia, preferiblemente, encefalopatía hepática.

Se entiende por “hiperamoniemia” el estado fisiológico caracterizado por la presencia de un nivel elevado y, por tanto tóxico, de amonio en el plasma o en los tejidos del individuo, entendiéndose por “nivel elevado de amonio” los niveles de amonio (NH_4) en plasma superiores a 50 $\mu\text{mol/L}$ = > 90 $\mu\text{g/dL}$ y en período neonatal superiores a 110 $\mu\text{mol/L}$ = > 190 $\mu\text{g/dL}$. Se trata de una de las complicaciones más frecuentes del ciclo de la urea. Las formas más leves se caracterizan por los síntomas episódicos, con brotes de hiperamoniemia que comienzan en la primera infancia o al final de la niñez y cursan con vómitos y alteraciones neurológicas como ataxia (carencia de la coordinación de movimientos musculares), confusión mental, agitación y combatividad, separados por periodos de normalidad. Los episodios suelen aparecer tras tomar una dieta rica en proteínas, tras una infección o en periodos de estrés. En alguno de los ataques puede haber un coma hiperamoniémico y producirse la muerte. Es frecuente que aparezca un retraso mental de ligero a moderado y cálculos biliares.

La medida del nivel de amonio, y por tanto, del grado de hiperamoniemia en un individuo, podría realizarse mediante los tests comerciales disponibles para tal fin, como por ejemplo, pero sin limitarnos, el método enzimático de la glutamato-deshidrogenasa (ROCHE, Barcelona). La glutamato-deshidrogenasa (GLDH) cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato en presencia de NH_4^+ y NADPH, para producir glutamato y NADP^+ . La concentración del NADP^+ es directamente proporcional a la concentración del amonio consumido. Por lo que la reacción se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm. La medida del nivel de amonio en plasma mediante este test consiste en la recolección de sangre del individuo en un tubo sin anticoagulante, su centrifugación, el trasvase del sobrenadante y la medida del nivel de amonio como se ha descrito. Para la medida del nivel de amonio en los tejidos, éstos se homogenizan, por ejemplo, pero sin limitarnos, en nitrógeno líquido en un mortero, se añade ácido tricloroacético (TCA) y se sonicán, se centrifugan y el sobrenadante se neutraliza, por ejemplo, pero sin limitarnos, con KHCO_3 y se determinan las distintas cantidades de amonio evitando la descongelación de los tejidos en su manipulación. Se define, por tanto, hiperamoniemia como los niveles de amonio (H_4) en plasma superiores a $50 \mu\text{mol/L} = > 90 \mu\text{g/dL}$ y en período neonatal superiores a $110 \mu\text{mol/L} = > 190 \mu\text{g/dL}$.

Cualquier enfermedad que curse con hiperamoniemia podría ser tratada con los medicamentos o composiciones farmacéuticas elaboradas con el compuesto de la invención o sus sales, profármacos, derivados o análogos o cualquiera de sus combinaciones, ya que estos, al inhibir la actividad de la GAP, son capaces de reducir los niveles de amonio, lo que evita la toxicidad derivada de la acumulación del mismo, por lo tanto, el compuesto de la invención es útil para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que los niveles de amonio se encuentren incrementados (hiperamoniemia). Enfermedades que cursan con hiperamoniemia son, por ejemplo, pero sin limitarnos, los errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea, errores congénitos del metabolismo de la lisina, acidemias orgánicas, hiperamoniemia transitoria del recién nacido, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática o cirrosis. Dentro de los errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea se pueden producir diversas enfermedades metabólicas distintas según el sitio del bloqueo, pero todas ellas con hiperamoniemia y sintomatología clínica similar, las cuales son: deficiencia de carbamil fosfato sintetasa, deficiencia de omítina transcarbamilasa, deficiencia en argininosuccinato sintetasa, deficiencia en argininosuccinato Nasa, deficiencia en arginasa, deficiencia en N-acetilglutamato sintetasa o síndrome de hiperamoniemia-hiperornitinemia-homocitrulinemia (síndrome HHH). Dentro de los errores congénitos del metabolismo de la lisina se encuentran la hiperlisinemia, hiperlisinuria o la intolerancia familiar a la proteína aminoaciduria dibásica. Dentro de las acidemias orgánicas se encuentran los errores congénitos del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, la hipervalinemia, acidemia isovalérica, acidemia propiónica o la acidemia metil malónica, déficit de β -cetotiolasa, déficit múltiple de carboxilasas, déficit de acil CoA deshidrogenasa de los ácidos grasos de cadena media, acidemia glutárica de tipo II o aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica. La insuficiencia hepática puede ser debida a infecciones o intoxicaciones.

Se entiende por “encefalopatía hepática” el síndrome de alteración mental que aparece en pacientes con insuficiencia hepática aguda o crónica. En algunos casos raros puede ocurrir en ausencia de daño hepático (síndromes hiperamoniémicos). La encefalopatía hepática aguda se presenta en casos de necrosis hepática masiva asociada con infecciones virales, fármacos, tóxicos, o con esteatosis micronodular que suele presentarse con medicamentos, como las tetraciclina, administrados por vía intravenosa o en el hígado graso del embarazo. Las manifestaciones clínicas son diversas y varían desde cambios sutiles de la personalidad hasta el coma profundo. La encefalopatía hepática se caracteriza, y por tanto, se puede detectar, por la presencia de hiperamoniemia. Los niveles elevados de amonio que se acumulan en el plasma o en los tejidos de los individuos afectados por hiperamoniemia causan un daño cerebral que en ocasiones deriva en encefalopatía hepática, por lo que el compuesto de la invención, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, al controlar la producción de amonio, puede ser útil en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de la encefalopatía hepática, incluyéndose dentro de la misma tanto la mínima como la aguda.

Se entiende por “cirrosis” o “cirrosis hepática” la enfermedad que afecta al tejido hepático como consecuencia final de diferentes enfermedades crónicas. Los síntomas son: hemorroides sangrantes, confusión, impotencia y pérdida del interés sexual, ictericia, náuseas y vómitos, vasos sanguíneos pequeños, rojos y en forma de araña bajo la piel, hinchazón de las piernas, vómito con sangre, debilidad y/o pérdida de peso. Una de las complicaciones de la cirrosis es la encefalopatía hepática, la cual no se presenta en todos los individuos cirróticos. Por lo tanto, ya que la encefalopatía hepática esta producida por hiperamoniemia y que la cirrosis puede provocar encefalopatía hepática, podría ser viable el tratamiento de la encefalopatía hepática en la cirrosis mediante los medicamentos o composiciones farmacéuticas elaboradas a partir del compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, otro principio activo. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” se refieren a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluyen, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la presente invención son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos destinados al tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamoniemia, preferiblemente, encefalopatía hepática.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento. En una realización preferida, el medicamento es para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamoniemia. En otra realización preferida, las enfermedades que cursan con hiperamoniemia se seleccionan de la lista que comprende: errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea, errores congénitos del metabolismo de la lisina, acidemias orgánicas, hiperamoniemia transitoria del recién nacido, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática o cirrosis. En una realización más preferida, la enfermedad es la cirrosis. En una realización aún más preferida, la enfermedad es la encefalopatía hepática.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Representa el cultivo de células del epitelio intestinal sobre insertos bicamerales. Las células exponen su polo apical al compartimento superior y el polo basolateral al inferior.

Fig. 2. Representa la actividad (en mU/ml) de la glutaminasa en presencia de *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea y de 6-diazo-5-oxo-norleucina (DON) a concentraciones de 0, 5, 20 y 100 μ M.

Fig. 3. Muestra el estudio de cinética del inhibidor no competitivo *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea. La K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima GAP están prácticamente modificadas por el mismo factor (líneas paralelas en el trazo de Lineweaver-Burk). La $V_{m\acute{a}x}$ sin el inhibidor es $1,1 E3 \pm 0,78 U/L$ (\blacktriangle) y con 10 μ M de *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea (\blacksquare) es $4,73E3 \pm 1,4 U/L$. A esta concentración, el compuesto de la invención inhibe parcialmente la actividad enzimática de GAP ($56 \pm 14\%$). Gln: glutamina.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea en la inhibición de la actividad de la glutaminasa activada por fosfato o GAP. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Estudios de inhibición in vitro

5 1.1. Liofilización de la glutaminasa dependiente de fosfato renal, intestinal y cerebral de cerdo

Para la preparación de homogenados de los diferentes tejidos de cerdo se procede como sigue: lavar con PBS cada tejido para eliminar la mayor parte de sangre, trocear y homogenizar en tampón de homogenización (solución a pH 7,4 de sacarosa 320 mM, tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM y se añade PMSF 0,005 mM justo antes de homogeneizar). Se centrifuga a 3.000 g durante 15 min. El sobrenadante se alicuotea en fracciones de 25 mL que se liofilizan. El polvo obtenido se mezcla hasta la homogeneidad y se guarda en un recipiente herméticamente cerrado a -20°C hasta su uso. Este producto constituye el material enzimático de partida (enriquecido en actividad glutaminasa tipo K) para realizar todos los ensayos de inhibición *in vitro* de la glutaminasa por diferentes inhibidores. Cada concentrado de GAP se reconstituye en tampón de solubilización (Tris 20 mM, manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EGTA 1 mM, pH 8) para constituir una muestra de partida homogénea para la realización de la batería de ensayos de inhibición. En un cálculo estimado de 100 ensayos de actividad GAP (controles y blancos), se disuelven 0,8 gramos de cada concentrado de glutaminasa en 100 mL de tampón de solubilización. Se alicuotea y se congela rápidamente a -80°C. Así se dispone de una solución de partida homogénea de diferentes tejidos como concentrado de glutaminasa de riñón, de intestino y de cerebro para los diferentes estudios de medida de actividad glutaminasa.

1.2. Estudios *in vitro*

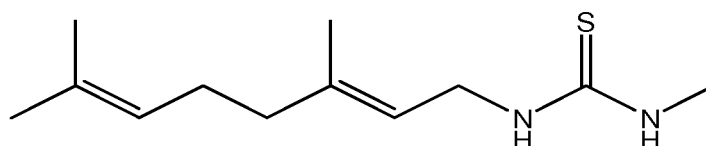
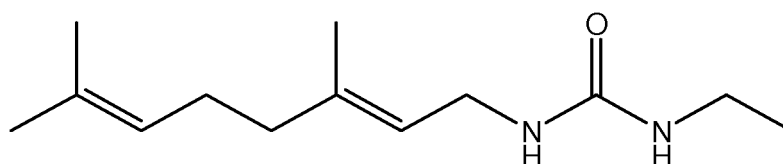
Los estudios de inhibición *in vitro* de la GAP se llevan a cabo mediante el método de Heini semi-automatizado en microplacas de 96 pocillos. Este método se basa en la medida directa del amonio, por el método del OPA, formado al hidrolizarse la glutamina a glutamato más amonio.

El estudio comprende dos etapas:

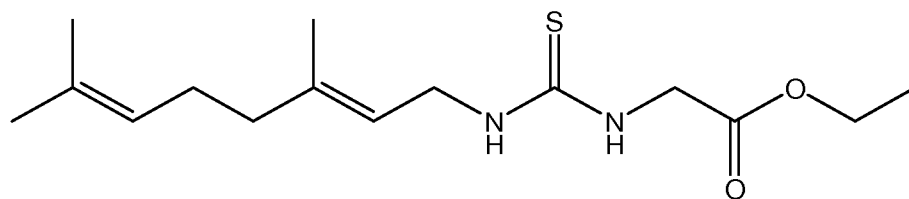
30 a) Cribado del banco de productos disponibles

De los 11.000 productos disponibles obtenidos por química combinatoria se testan 5.000, una serie productos bases (estreptomycin, DON, flumazenilo,...) y una amplia gama de productos naturales entre los que cabe destacar distintos polifenoles purificados de la aceituna, girasol, soja, hongos comestibles, etc., que en pruebas preliminares mostraron cierta actividad anti-GAP en extractos crudos.

Algunos de los compuestos químicos que forman parte de esta librería de compuestos empleados en el proceso de *screening*, son los que se muestran a continuación:

**N-geranyl-N'-metiltiourea****N-etil-N'-geranilurea**

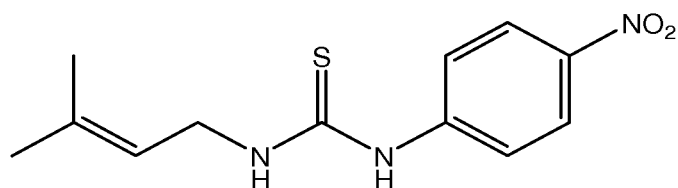
5



10

***N*-etoxicarbonilmetil-*N'*-geraniltiourea**

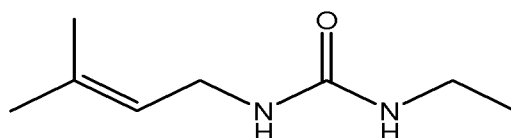
15



20

***N*-(3-metil-2-butenil)-*N'*-(4-nitrofenil)tiourea**

25

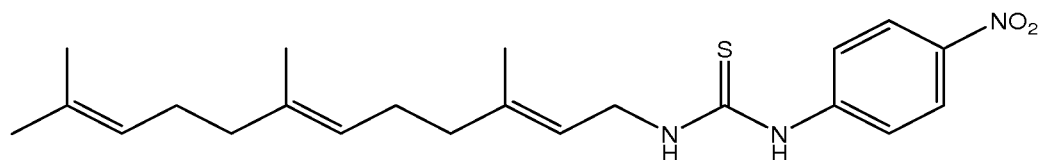


30

***N*-etil-*N'*-(3-metil-2-butenil)urea**

35

40

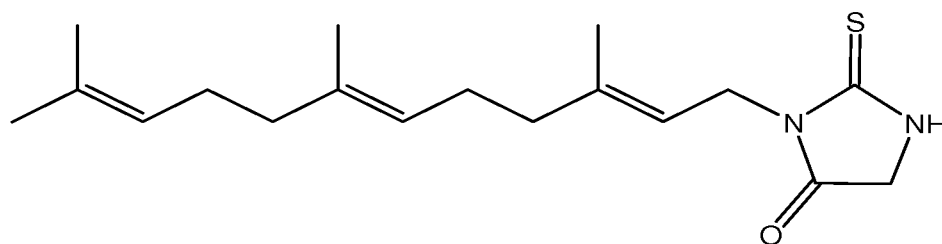


45

***N*-farnesil-*N'*-(4-nitrofenil)tiourea**

50

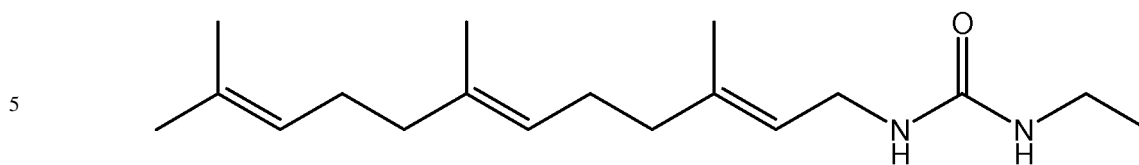
55



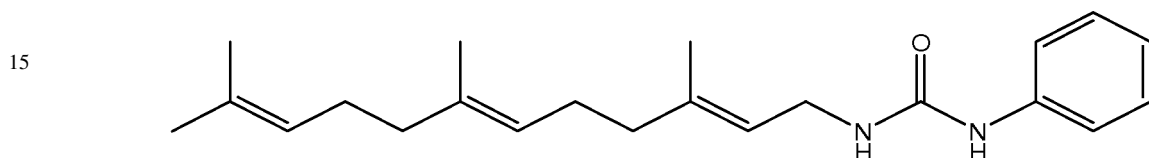
60

3-farnesil-2-tioxiimidazolidin-4-ona

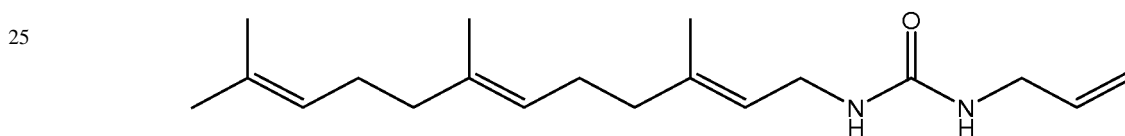
65

**N-etil-N'-farnesilurea**

10

**N-farnesil-N'-fenilurea**

20

**N-aliil-N'-farnesilurea**

30

35 La inhibición de cada producto se testa midiendo la actividad de la GAP a una concentración de glutamina, [Gln] = 150 mM y tres concentraciones diferentes de cada inhibidor potencial, [I] = 0,1 Km, 1 km y 2 Km (Km para la Gln = 3,2 mM). Los ensayos se realizan por triplicado, por lo que en cada placa de 96 pocillos se pueden testar 8 productos por placa. Testando 5 placas por día, los aproximadamente 5.500 productos disponibles podrían estar testados en unos 150 a 200 días, es decir, en el primer año.

40 b) *Caracterización de los productos con mayor potencial*

El *screening* anterior nos permite seleccionar los productos con mayor potencial de inhibición (aquellos que consigan una mayor inhibición a bajas concentraciones de inhibidor), que serán caracterizados más detalladamente.

45 Suponiendo que este grupo represente el 1-2%, estaríamos hablando de un grupo de 50 a 100 productos. Brevemente, se estudia la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de glutamina, [Gln] = 0,1 a 150 mM, en ausencia y en presencia de tres concentraciones diferentes de inhibidor, [I] = 0,1 mM, 1 mM y 10 mM. A partir de estos datos se obtienen el tipo de inhibición, la K_i para el inhibidor y la IC_{50} a concentraciones fisiológicas de Gln. El tipo de inhibición, K_i e IC_{50} se determinan mediante el análisis de los datos cinéticos en ausencia y presencia de inhibidor por el método de Lineweaver-Burk o de dobles inverso, Eisental-Cornis-Bowden y plot de Dixon.

50 Los datos son tratados, representados y analizados mediante el programa informático EnzFitter de Biosoft Ltd (Inglaterra), para obtener la representación.

55 En esta etapa estaremos en condiciones de poder elegir aquellos productos de menor K_i y/o IC_{50} . Suponiendo que este grupo represente del orden del 10-20% estaríamos hablando como mucho de 10 a 20 inhibidores potenciales. Este grupo sería el que pasaría a testarse a nivel de cultivo celular (en estudios *ex vivo*).

Ejemplo 2

60

Estudios de inhibición ex vivo

Los estudios *ex vivo* se llevan a cabo en cultivos de células de epitelio intestinal y de astrocitos primarios, como dianas de estudio de la glutaminasa intestinal y la glutaminasa de cerebro, ambas de tipo-K. Estos estudios nos permiten, no solo ver la eficiencia de los inhibidores en condiciones mucho más parecidas a las de *in vivo*, sino que además, muy importante, nos permite descartar aquellos que sean tóxicos (ensayos de viabilidad y citotoxicidad celular).

65

ES 2 362 770 A1

a) Cultivo de células de epitelio intestinal

Los cultivos de células de epitelio intestinal se llevan a cabo utilizando células Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Estas células derivan de un cáncer de colon, presentan inhibición de la proliferación por contacto seguido por un proceso de diferenciación de 12 a 14 días en los que forman monocapas celulares, desarrollan uniones estrechas y polaridad apical/basolateral. Presentan un fenotipo de epitelio intestinal fetal, expresando el transportador de glucosa (Glut-5), presente en epitelio de intestino delgado y ausente en células de intestino grueso, y no expresan Glut-4, marcador de colon. Pueden cultivarse en insertos bicamerales, por lo que conforman un sistema que posee ventajas notables para el estudio del transporte transepitelial respecto a los sistemas tradicionales, ya que no presentan interferencia de tejidos intersticiales ni musculares.

Estas células pueden cultivarse tanto en botellas de plástico como en insertos bicamerales (Costar, Cambridge, MA). Al cultivarse en insertos (membranas microporosas embebidas en insertos microplatos), exponen su polo apical al compartimento superior y el polo basolateral al inferior, permitiendo el estudio de funciones celulares polarizadas y la secreción vectorial de proteínas (Figura 1).

Las células Caco-2 se mantienen en DMEM, más SBF (suero bovino fetal) al 10%, 100.000 unidades internacionales/l de penicilina/estreptomicina, fungizona 25 mg/mL y aminoácidos no esenciales. Se siembran 5×10^5 células por botella de 25 mL ó $1,5 \times 10^6$ células por botella de 75 mL. Se crecen durante 7 días con cambios periódicos del medio a 37°C, 5% de CO₂ (Incubador CO₂-Water Jacketed). Durante este período las células alcanzan la confluencia, obteniéndose entre 4 y 5 millones de células por botella de 25 mL y entre 10 y 12 millones de células por botella de 75 mL. Después de 2 pasajes (proliferación a aproximadamente 2×10^6 células/botella/pasaje), las células se siembran en insertos bicamerales de 6,5 ó 24 mm de diámetro (tamaño de poro: 0,4 µm) a una densidad de 2×10^5 ó 10×10^6 células/inserto respectivamente y en presencia de una concentración 150 mM de glutamina y diferentes concentraciones de inhibidor(es): 0; 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, y 100 µM y se crecen durante 24 horas. Se separan las células y se miden los niveles de amonio en el sobrenadante y en el homogenado celular.

Obtención de homogenados celulares

Las células Caco-2, cultivadas en insertos bicamerales, se lisan incubándolas durante 15 min (con agitaciones ocasionales de 20 s) con 50 µL de solución amortiguadora SM-Np40 (Np40 0,05% en solución SM: Sacarosa 0,25 M; MOPS 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 3 mM; glicerol 5%; DTT 1 mM e inhibidores de proteasas pepstatina A 0,7 mg/mL; aprotinina 0,5 mg/mL; leupeptina 10 mg/mL; PMSF 1 mM) por cada 10⁶ células. Posteriormente, se centrifugan a 1.500 X g durante 5 min, obteniéndose así un sobrenadante que, una vez centrifugado a 14.000 x g, proporciona un precipitado enriquecido en mitocondrias y por tanto en GAP. Este precipitado constituye el material para medir la actividad GAP y se utiliza inmediatamente o se guarda a -80°C hasta su uso.

Ensayos comparativos de inhibición de la actividad glutaminasa por *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea y por DON

Se siembran 50.000 células de carcinoma de colon (Caco2) por pocillo en una placa de 12 pocillos, empleando 1,2 ml de medio DMEM completado con L-Glutamina 2 mM, 15% SBF, antibiótico/antimicótico 1X y aminoácidos no esenciales 1X (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria). Las células se incuban durante los tiempos indicados a 37°C, 5% CO₂. En tres placas paralelas se ensaya *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea, 6-diazo-5-oxo-norleucina (DON, Sigma, St. Louis, EE.UU.) y vehículo a concentraciones de 0, 5, 20 y 100 µM, midiendo la actividad glutaminasa por el método de Heini (Heini *et al.*, 1987, *Eur. J. Biochem.*; 162: 541-546) a las 24 h y 48 h. Todos los ensayos se realizan por duplicado.

Tanto DON como *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea consiguen una inhibición de la actividad glutaminasa a las 48 horas tras un incremento inicial. La administración de *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea consigue reducir la actividad glutaminasa al 58%, mientras que DON reduce la actividad al 54% y el vehículo no modifica la actividad glutaminasa (Figura 2).

Por tanto, *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea es un inhibidor incompetitivo parcial de la glutaminasa, que atraviesa la membrana celular y mitocondrial, que puede ser útil en el tratamiento de la encefalopatía hepática.

b) Cultivo de astrocitos

Se utilizan ratas albinas de una semana de edad, de la cepa Wistar, criadas en el Animalario de Espartinas de la Universidad de Sevilla y mantenidas en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Los animales se mantienen con la madre hasta el momento de ser sacrificados, en condiciones constantes de luz (ciclo de 12 horas luz-oscuridad) y temperatura 23±2°C, con acceso libre a comida y agua.

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se preparan a partir de cerebelo de ratas de un día de edad de acuerdo con el procedimiento estándar de Agullo L., *et al.*, 1995, *Brain Res.*; 686:160-8. Los animales se sacrifican en una cámara de CO₂ y una vez decapitados se disecciona el cerebro manteniéndolo en un medio salino (NaCl 137 mM; KCl 5,5 mM; KH₂PO₄ 2,22 mM; Na₂HPO₄ 0,17 mM; glucosa 5 mM y sacarosa 58,5 mM) a pH 7,4. La disgregación del tejido se realiza por pasos sucesivos a través de dos mallas de nylon de 210 y 135 µm de poro en el medio salino. La

ES 2 362 770 A1

suspensión celular obtenida se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos a 20°C y las células se resuspenden en medio de cultivo (90% DMEM, 10% SFB, 20 unidades de penicilina y 20 µg de estreptomycinina) a 37°C. En esta suspensión se realiza un recuento de células utilizando un hemocitómetro, determinándose la viabilidad por exclusión del colorante vital nigrosina (concentración final 0,25% p/v). Las células se siembran a una concentración de 0,6 x 10⁵ células viables/mL en placas de cultivo de 35 mm, 60 mm ó 100 mm de diámetro, o placas de 12 ó 24 pocillos, y se incuban a 37°C en atmósfera de 90% aire - 10% CO₂ con una humedad del 90%.

Durante los cultivos, se evalúa la proliferación celular, mediante conteo de células y determinando la cantidad de proteína (mg/mL) y el contenido de DNA (µg/mL) por espectrofotometría ultravioleta.

La mayoría de las células presentes en cultivos confluentes de 14 días son GFAP positivas (marcador de astrocitos). La contaminación por neuronas y oligodendrocitos es escasa, y la presencia de células de microglía puede variar considerablemente de una preparación a otra, pudiendo llegar a ser del 30% del total de células. Después de 2 pasajes las células se resiembran a una densidad de 10 x 10⁶ células/placa y en presencia de una concentración de 150 mM de glutamina y diferentes concentraciones de inhibidor(es): 0; 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, y 100 µM y se crecen durante 24 horas. Se separan las células y se miden los niveles de amonio en el sobrenadante y en el homogenado celular.

Determinación del porcentaje de astrocitos y de neuronas

Para calcular los porcentajes de células astrogiales y de neuronas a lo largo del desarrollo de los cultivos se utiliza un doble mareaje con un marcador celular específico: proteína ácida fibrilar glial, (GFAP), para astrocitos y proteína nuclear de neurona, (Neu-N), para neuronas, junto con el marcador nuclear 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El proceso consta de las siguientes etapas: i) fijación, ii) permeabilización y bloqueo de uniones inespecíficas, iii) incubación con el primer anticuerpo, iv) incubación con el segundo anticuerpo y v) lavado y montaje. Una vez lavadas las células, sobre las monocapas se montan cubreobjetos con el medio de montaje glicergel, y las células se observan en un microscopio de fluorescencia Zeiss.

Preparación de homogenados de astrocitos

Para la obtención de homogenados se utilizan cultivos primarios de astrocitos de 14 días, tratados con diferentes concentraciones de inhibidor. Una vez aspirado el medio de cultivo y lavadas dos veces las monocapas con PBS a 4°C, las células se despegan de las placas de cultivo con ayuda de una espátula y se homogenizan en un tampón: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4 a 37°C); 1 mM EDTA; 0,2 mM leupeptina, 10 mg/l inhibidor de tripsina; 100 mg/l PMSF; 1 mg/l pepstatina y 0,2 mM benzamidina (1 mL por placa de 100 mm). Las homogenizaciones se realizan mediante 10 ciclos (subida-bajada) en un Potter-Elvehem. Se centrifugan a 14.000 x g 15 min a 4°C y se recoge el precipitado (fracción enriquecida en mitocondrias y por tanto en GAP). Este precipitado constituye el material para medir la actividad GAP y se utiliza inmediatamente o se guarda a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 3

Estudios de inhibición in vivo

Los estudios *in vivo* se llevan a cabo en ratas Wistar sin operar (controles sanos), en ratas controles operadas o *sham* (controles de operación) y en ratas con derivación porto-cava (DPC). Los animales se mantienen en jaulas individuales, en el estabulario de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla), a 23±2°C, con libre acceso a comida y agua y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h, durante un periodo de 24 h.

Los animales se dividen en dos grupos (ver tabla 1). Un grupo se alimenta simplemente con la dieta y el otro grupo se alimenta con la dieta suplementada con distintas concentraciones del/los inhibidor(es) seleccionados en las fases anteriores.

TABLA 1

Grupos de ratas Wistar empleados en los ensayos in vivo

Grupo sin inhibidor			Grupo con inhibidor			
Ratas control	Ratas Sham	Ratas DPC	Ratas control	Ratas Sham	Ratas DPC ₁	Ratas DPC _n
n=8	N=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8

Los animales se sacrifican en una cámara de CO₂. Una vez sacrificados se extirpan, lo más rápidamente posible, el cerebro y el intestino, y se utilizan inmediatamente o se congelan a -80°C hasta su uso (siempre antes de 3 meses).

ES 2 362 770 A1

a) Operación: derivación porto-cava

La derivación porto-cava se realiza con el fin de generar un modelo de encefalopatía hepática, en el que se espera un descenso en la actividad glutaminasa intestinal y renal tras la exposición a los inhibidores. Previamente a la intervención, los animales se someten a anestesia general por inhalación con isofluorano, mediante la exposición del animal a una mezcla de oxígeno, aire y gases anestésicos (5%), a flujos altos. Se aplica la mezcla gaseosa mediante una mascarilla en la que se introduce la cabeza completa del animal, consiguiéndose la anestesia en unos 20-30 segundos. El animal queda en ventilación espontánea. El mantenimiento de la anestesia se consigue con porciones del gas de entre el 2 y el 3% (según peso del animal). Una vez que se ha producido el clampaje de los grandes vasos, ya sea para la realización de la técnica de la anastomosis o para el grupo *sham* (ratas sometidas a las mismas condiciones de la intervención quirúrgica pero en las que no se realiza la anastomosis), la proporción del gas anestésico se reduce a un 0,5%-0,75%.

Técnica quirúrgica

Una vez que el animal se encuentra anestesiado, se procede al rasurado abdominal y a la desinfección de la piel con povidona yodada. La operación se lleva a cabo por laparotomía media y evisceración del paquete intestinal, disección de la cava infrahepática por encima de las venas renales y de la grasa del retroperitoneo y disección del hilio hepático, en especial de la vena porta, prestando especial atención a la liberación de la misma de la arteria hepática común que se encuentra íntimamente unida a la porta por su cara posterior. En esta fase es fundamental no lesionar ninguna de las dos, puesto que durante el clampaje de la porta, la arteria es la única que suministra flujo sanguíneo al hígado. A continuación, se hace pasar un primer hilo trenzado de 2-3 ceros por detrás de la cava y por detrás de la porta, justo por encima del confluente espleno-mesaraico y otro segundo hilo por debajo de dicho confluente. Al traccionar de ambas suturas en sentidos cefálico y caudal, respectivamente, ambos vasos sanguíneos quedan aproximados entre sí. Una vez dispuestos de este modo los vasos, son clampados con un clamp vascular de Satinsky, que mantiene ambos vasos en esa postura, permitiendo la realización de la técnica de anastomosis de Numata, 1983.

Para garantizar el éxito de la técnica así como la viabilidad del animal tras la intervención, es necesario que el tiempo de oclusión vascular no exceda de 20 minutos, minimizando así el efecto de los fenómenos trombóticos tanto en la porta como en la cava, que impiden la supervivencia del animal. Cuando la operación no es efectiva no existe descenso del peso del animal. En el grupo *sham* se mantiene dicho clampaje 25 minutos en todos los animales.

b) Test de aprendizaje en ratas con derivación porto-cava

El test de aprendizaje en ratas con derivación porto-cava se realiza esperando una mejoría en el mismo tras la administración de los inhibidores de la GAP. Se trata de un test de discriminación condicional en un laberinto en Y. El laberinto en Y tiene tres brazos iguales. Las ratas se colocan inicialmente en uno de los brazos (brazo de salida). Al final de los otros brazos (brazos de elección) se colocan dos copas con comida. Se realiza un pre-entrenamiento de 4 días para que las ratas se familiaricen con el laberinto. Toda el área de los brazos de elección se cubre con insertos de color blanco o negro. El color de los brazos se va modificando en los distintos ensayos sin una pauta periódica. Las ratas deben aprender que la comida está en uno de los brazos cuando el color es blanco y en el otro brazo cuando es negro. Cada rata se somete a 10 ensayos por día, con un intervalo entre ensayos de unos 5 min. Los ensayos se repiten hasta que la rata alcanza el criterio de aprendizaje (10 aciertos de 10 ensayos en un día) o hasta un total de 250 ensayos. Se considera que la respuesta es acertada cuando la rata se dirige directamente al brazo correcto (el que tiene la comida).

c) Preparación de homogenados de intestino.

Los homogenizados de enterocitos se preparan a partir de intestino de rata, utilizando fundamentalmente el duodeno y el íleon. Para ello, tras el sacrificio de las ratas por decapitación, rápidamente se les extrae el intestino, se corta el duodeno y el íleon y se lavan en tampón fosfato salino frío (PBS: ClNa 0,1 M, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 0,01 M, KH₂PO₄ 0,002M, pH 7,4). Posteriormente, se cortan con unas tijeras en trozos de aproximadamente 5 cm y se lavan de nuevo. Cada trozo se abre por la mitad y con ayuda de un porta se arrastran las vellosidades intestinales, que se vierten en un tubo de plástico y se pesa.

Unos 100 mg de las vellosidades intestinales se homogenizan en 1,5 mL de tampón de homogenización (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 320 mM, pH 7,4, más PMSF 0,005 mM, justo antes de homogeneizar), en un homogenizador mecánico Potter-Elvehjem con pistilo de teflón, en posición 8 (1000 r.p.m.) dando 5 pasadas, manteniendo la muestra en hielo. Se centrifuga a 1000 g y el sobrenadante se utiliza para la obtención de mitocondrias.

d) Obtención de homogenizados de mitocondrias

Las mitocondrias se obtienen por el método de Haser y colaboradores (Haser W.G., *et al.*, 1985, *Biochem J.*; 229: 399-408). El sobrenadante obtenido en la homogenización de los tejidos, se centrifuga a 13.000 x g, 10 minutos. El precipitado (enriquecido en mitocondrias) se resuspende en tampón de homogenización, y se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 g. El proceso se repite dos veces más. El precipitado, así obtenido, se resuspende en tampón de incubación (Tris 20 mM, manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM, pH 8), y constituye una fracción altamente enriquecida en mitocondrias.

ES 2 362 770 A1

Las proteínas mitocondriales se solubilizan utilizando tampón de incubación que contiene 5 mM β -mercaptoetanol y 0,7% Tritón X-100 para la determinación del contenido en proteínas y medida de la actividad enzimática.

e) Preparación de homogenados de cerebro

Se disecciona el cerebro lo más rápidamente posible y se guarda en frío (sobre hielo). Una vez separado se homogeniza de manera análoga a la descrita para el caso de los enterocitos.

f) Obtención de mitocondrias sinápticas y no-sinápticas

Para la obtención de mitocondrias no sinápticas se sigue una variación del procedimiento descrito por Kosenko y colaboradores (Kosenko, E., *et al.*, 2001, *Brain Res. Protoc.*; 7:248-254). Tras la decapitación del animal, se extrae la masa encefálica rápidamente, se sumerge en tampón de homogenización y se homogeniza en un potter de vidrio a mano, con suavidad, 6 pasadas, evitando la formación de espuma. El homogenado se centrifuga a 2.000 x g, durante 3 min, a 4°C, y se recoge el sobrenadante. El precipitado se resuspende de nuevo en el mismo volumen de tampón de homogenización y se centrifuga nuevamente a 2.000 x g, durante 3 min, 4°C, recogiendo nuevamente el sobrenadante. Se juntan los dos sobrenadantes y se centrifugan durante 10 min a 13.000 x g, recogiendo el precipitado. Las mitocondrias así obtenidas se lavan con tampón de homogenización sin EDTA y nuevamente se centrifugan, 10 min, a 13.000 x g, a 4°C. La separación de las mitocondrias de los astrocitos se lleva a cabo en un gradiente de Ficoll. Se centrifuga 15 min a 1.000 x g, a 4°C y se lava con tampón de homogenización sin quelantes, guardándose las mitocondrias congeladas a -80°C. Para la rotura de la pared mitocondrial y la liberación de la enzima glutaminasa en la solución se descongelan las muestras en dos ciclos de congelación-descongelación antes de la realización de la medida de actividad enzimática. Estas muestras de mitocondrias de astrocitos constituyen las muestras de partida para la realización de los estudios de actividad glutaminasa.

g) Medición de la actividad glutaminasa

Para estudiar la actividad en enterocitos, se practica una biopsia de mucosa duodenal. Las muestras se homogenizan en Tris-EDTA, pH 7,9 y se toman alícuotas, que son incubadas a 37°C en medio de incubación en buffer fosfato, pH 8,2, en presencia de 171 mM glutamina, como sustrato (nmol glutamato min⁻¹ mg⁻¹ proteína o nmol/L).

La actividad glutaminasa se cuantifica mediante la medición espectrofotométrica del amonio derivatizado con OPA, como medida directa de formación de producto.

Para las mediciones anteriormente descritas se utilizan los reactivos proporcionados por la firma Sigma Corp. USA, basados en el procedimiento de Heini ya descrito.

h) Medición de los niveles de amonio en plasma y en tejidos

La cantidad de amonio presente en la muestra se mide por el método enzimático de la glutamato-deshidrogenasa (ROCHE, Barcelona), en un analizador COBAS Integra 700. La glutamato-deshidrogenasa (GLDH) cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato en presencia de NH₄⁺ y NADPH, para producir glutamato y NADP⁺. La concentración del NADP⁺ es directamente proporcional a la concentración del amonio consumido. Por lo que la reacción se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm.

Tras dormir al animal, con hidrato de doral, se pincha la yugular y rápidamente se recogen unos 150 μ L de sangre en un tubo sin anticoagulante, se centrifuga 5 min a 3.500 g. Se trasvasa el sobrenadante obtenido y se mide el amonio como se ha descrito anteriormente. Para la medida de amonio en tejidos se procede de la siguiente forma: tejidos congelados a -80°C rápidamente tras su obtención, se homogenizan en nitrógeno líquido en un mortero. Una vez homogenizados, se añaden 2 volúmenes de TCA al 10%, y se sonicán (6 ciclos de 30 segundos). Seguidamente se centrifuga a 13.000 x g, 15 min, a 4°C. El sobrenadante se neutraliza con KHCO₃ 2M y se determinan las distintas cantidades de amonio evitando la descongelación de los tejidos en su manipulación. Los ensayos de cinética *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demuestran que el compuesto con mayor potencial de inhibición es *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea, un inhibidor no competitivo. La Km y Vmáx de la enzima GAP están prácticamente modificadas por el mismo factor. La Vmáx sin inhibidor es 11.1E3 \pm 0,78 U/L y con 10 μ M de *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea es 4,73E3 \pm 1,4 U/L. A esta concentración el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea inhibe parcialmente la actividad de GAP (56 \pm 14%) (Figura 3).

ES 2 362 770 A1

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de un medicamento.

5 2. Uso del compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamoniemia.

10 3. Uso del compuesto según la reivindicación 2 donde las enfermedades que cursan con hiperamoniemia se seleccionan de la lista que comprende: errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea, errores congénitos del metabolismo de la lisina, acidemias orgánicas, hiperamoniemia transitoria del recién nacido, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática o cirrosis.

4. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 donde la enfermedad es la cirrosis.

15 5. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 donde la enfermedad es la encefalopatía hepática.

6. Composición farmacéutica que comprende el compuesto *N*-fenil-*N'*-(3-metil-2-butenil)tiourea.

20 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 que comprende, además, otro principio activo.

8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 9. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para la elaboración de un medicamento.

30 10. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 9 donde el medicamento es para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamoniemia.

35 11. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 10 donde las enfermedades que cursan con hiperamoniemia se seleccionan de la lista que comprende: errores congénitos del metabolismo del ciclo de la urea, errores congénitos del metabolismo de la lisina, acidemias orgánicas, hiperamoniemia transitoria del recién nacido, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática o cirrosis.

12. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde la enfermedad es la cirrosis.

40 13. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 donde la enfermedad es la encefalopatía hepática.

45

50

55

60

65

Fig. 1

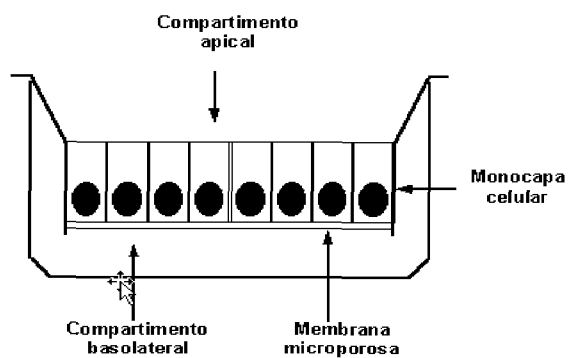


FIG. 2

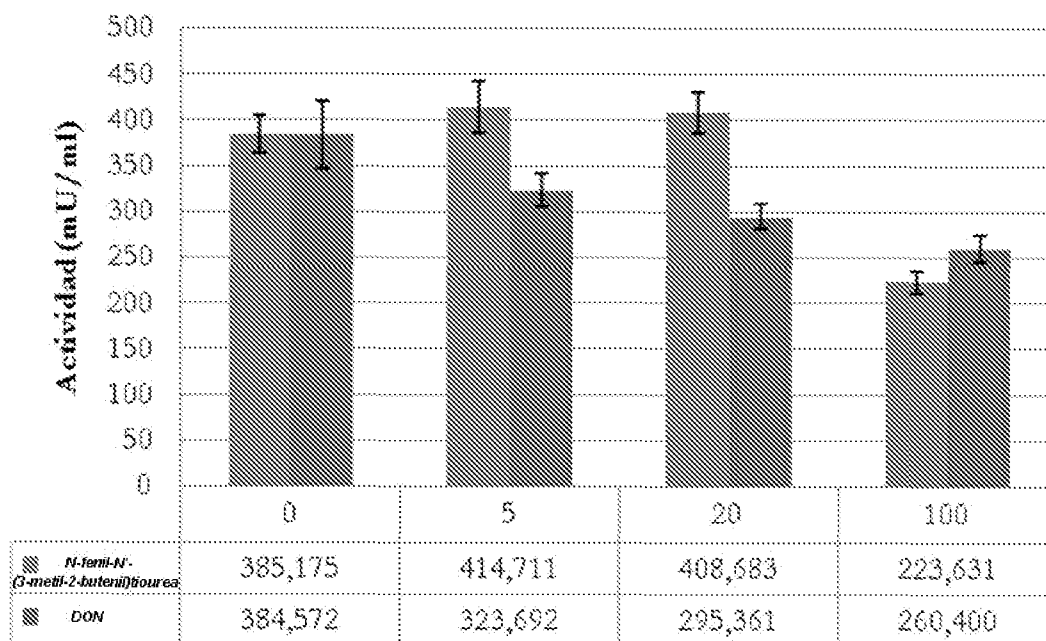
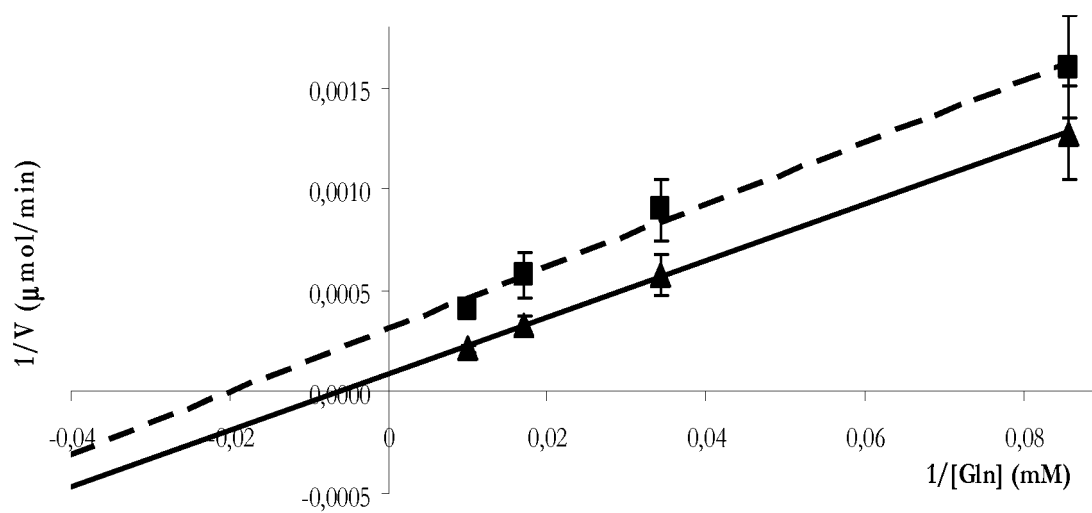


Fig.3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931265

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/17** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0528146 A1 (SANDOZ-ERFINDUNGEN) 24.02.1993, tablas páginas 12-19.	1-13
A	TAGO, K.: "Synthesis of plaunotol derivatives and their antibacterial activities against Helicobacter Pylori". Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, vol. 9, páginas 1781-1791, tabla 1.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.03.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, MEDLINE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0528146 A1	24.02.1993
D02	TAGO, K.: "Synthesis of plaunotol derivatives and their antibacterial activities against Helicobacter Pylori". Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, vol. 9, páginas 1781-1791.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso del compuesto N-fenil-N'-(3 metil-2 butenil)tiourea para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperamonemia, tales como cirrosis o encefalopatía hepática.

Los documentos D1 y D2 se refieren al uso farmacéutico de derivados de N-fenil tiourea en el tratamiento de la aterosclerosis (documento D1) o como antibacteriano (documento D2).

En ninguno de dichos documentos se cita el compuesto al que se refiere la reivindicación 1, ni el uso farmacéutico, por lo tanto la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-13 presenta novedad y actividad inventiva de acuerdo a los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.