

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 355**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/198** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04769537 .4**  
96 Fecha de presentación: **30.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1670453**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54 Título: **Composiciones basadas en aminoácidos para tratamiento de estados patológicos caracterizados por una función mitocondrial insuficiente**

30 Prioridad:  
**07.10.2003 IT TO20030789**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2012**

73 Titular/es:  
**PROFESSIONAL DIETETICS S.R.L.**  
**VIA CIRO MENOTTI, 1/A**  
**20129 MILAN, IT**

72 Inventor/es:  
**DIOGUARDI, Francesco, Saverio**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 379 355 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

Composiciones basadas en aminoácidos para tratamiento de estados patológicos caracterizados por una función mitocondrial insuficiente.

5 La presente invención se refiere al uso de aminoácidos para la fabricación de composiciones para el tratamiento de enfermedades degenerativas del sistema nervioso.

Por el documento US-A-5.919.823 se conoce el uso de una mezcla de leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina y triptófano para usar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, acatisia y distonía tardía.

10 El documento WO 95/22909 da a conocer la administración de una composición que comprende leucina, isoleucina, valina, treonina, histidina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina y otros aminoácidos a personas que padecen la enfermedad de Parkinson, sin embargo, a diferentes relaciones de gramos-moles que las reivindicadas por la presente invención.

El documento DE-U-203 11 240 da cuenta del uso de L-leucina, L-isoleucina, L-valina y fenilalanina para estimulación del comportamiento mental.

15 El documento EP-A-0 341 896 menciona el uso de L-leucina, L-isoleucina, L-valina para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer).

El documento EP-A-0642 791 se refiere al uso de una mezcla de leucina, isoleucina y valina para el tratamiento de trastornos del movimiento anormales como síntomas de enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, demencias, etc.

20 El artículo *Long Term oral branched-chain amino acid treatment in chronic hepatic encephalopathy*. Marchesini y otros, *Journal of Hepatology*, vol. 11, 1990, págs. 92-101, da cuenta de un estudio que revela el beneficio de un suplemento oral con leucina, isoleucina y valina en estado de metal de pacientes cirróticos.

25 La identificación de patologías específicas de datos mitocondriales se remonta a hace aproximadamente cuarenta años, cuando se identificó un ADN mitocondrial específico. Sin embargo, fue sólo durante el decenio de los 1990 cuando se relacionó un mejor conocimiento de la síntesis, estructura y función de los mitocondrias con hallazgos clínicos específicos, y también con enfermedades degenerativas correlacionadas con la edad. Gracias al mencionado conocimiento se han identificado una serie de enfermedades mitocondriales primitivas y secundarias, así como los diversos órganos diana de lesiones mitocondriales, tales como el sistema nervioso central (y, por tanto, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer), el sistema cardiovascular en relación al envejecimiento, los músculos esqueléticos, la micro- macro-angiopatía, etc.

30 Los enfoques terapéuticos que derivan del mencionado conocimiento son todavía primitivos y contemplan, sobre todo, la prevención del daño oxidante (Luffh R. y London B.R., *J. Intern. Med.*, 1995: 238, 405-421). De hecho, la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), que son los productos de desecho del metabolismo oxidante, ha sido correlacionada con la acumulación progresiva de daño al ADN y proteínas a varios niveles de órganos y células, de acuerdo con la denominada Hipótesis de Harman (Harman G.V., *Am. Geriatr. Soc.*, 1972, 20, 145-147), así como con el envejecimiento. Hasta ahora los enfoques terapéuticos se han centrado en sustancias antioxidantes, tales como N-acetil-cisteína (Martínez Banaclocha M., *Brain Res.*, 2000:859, 173-175), glutatión (Viria y otros, 1992 en: *Free Radicals and Agents*, 136-144, Birkhansenverlag, Basilea), vitamina C (Ghosh M.K. y otros, *Free Radicals Res.*, 1996: 25, 173-179) y carnitina (Hagen T., *Metal*, 1998, *Proc. Math. Acad. Sci. USA*, 95:9562-9666). Parece que algunos resultados experimentales confirman que la vida media y máxima de las líneas de células se prolonga favorablemente cuando la cantidad de antioxidante es suficiente para eliminar la tensión mitocondrial oxidante, restableciendo la actividad mitocondrial de las mitocondrias.

40 La presente invención indica la posibilidad de un enfoque terapéutico absolutamente innovador para el problema antes mencionado, basado en el uso de cantidades específicas de determinados aminoácidos.

45 Tres cuartas partes de los requerimientos totales de nitrógeno están cubiertas por cinco aminoácidos: leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina. Esto significa que todos los otros aminoácidos, sean esenciales o no esenciales, contenidas en las proteínas dietéticas sirven para cubrir sólo el restante 25% del requerimiento de nitrógeno de los organismos de mamíferos. En la naturaleza no existen proteínas con un contenido de aminoácidos estequiométricamente similar al que es necesario para cubrir el nitrógeno requerido en seres humanos. Esto explica por qué una ingestión excesiva de proteína en el alimento es una posible fuente de muchos problemas médicos: la ingestión de un exceso de aminoácidos respecto a los necesarios y utilizables dará por resultado una sobrecarga funcional de los mecanismos de eliminación de desechos y no en una mejora de las funciones dependientes de la biodisponibilidad de aminoácidos.

50 En la perspectiva anterior, los aminoácidos se pueden comparar con las letras y las proteínas con las palabras. Las

síntesis se activan y se desarrollan sólo en condiciones en las que está presente una cantidad adecuada de todos los aminoácidos necesarios para la constitución de la proteína final entera; de otra manera, ni siquiera se iniciaría la síntesis. Consecuentemente, los aminoácidos no sólo serán necesarios en cuanto a las calidades correctas, sino que también serán necesarios en las cantidades necesarias de cada uno, como las letras para escribir una palabra dada.

5 Tómesese, por ejemplo, la palabra italiana “proteíne”; para escribirla se necesitará una p, una r, una o, una t, una i, una n pero dos es. La relación correcta entre aminoácidos no se puede expresar en gramos, sino en términos de un número de moléculas, en la relación correcta entre ellas, y en función de la concentración de aminoácidos presente en la proteína a sintetizar. Como resultado, las relaciones se expresan más correctamente como número de moléculas, por ejemplo gramos-moles. Esto es la manera más precisa de expresar la relación, refiriéndose la  
10 indicada relación a números de moléculas, apropiadamente a las estequiométricas entre aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas.

Otro nivel de complejidad se debe al hecho de que la síntesis de proteínas es un procedimiento extremadamente caro desde el punto de vista de la energía; consecuentemente, la síntesis no se realiza a menos de que haya una disponibilidad adecuada de energía en la célula y la energía se produce por las mitocondrias. Generalmente, la  
15 producción de energía se considera que depende de la glucólisis anaeróbica de glucosa y de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos libres (FFA), que proporcionan los dos sustratos principales para el mantenimiento de la actividad del ciclo de ácido cítrico (glucólisis aeróbica), un conjunto de enzimas que constituyen el productor principal de energía que nos permite vivir, que depende del oxígeno. Deriva de la glucólisis anaeróbica el piruvato, y a partir de él, por carboxilación, oxaloacetato, o, por descarboxilación, acetilCoA, que, por condensación con otro, da origen al citrato necesario para el mantenimiento de la actividad del ciclo. También se puede obtener acetilCoA por  $\beta$ -oxidación o por metabolismo de algunos aminoácidos que consecuentemente se denominan “aminoácidos cetogenéticos”, mientras que piruvato, citrato y oxaloacetato también se pueden obtener por metabolismo de otros aminoácidos, denominados “aminoácidos glucogenéticos” porque el hígado puede sintetizar glucosa a partir de estas moléculas. El uso de sustratos que derivan de aminoácidos o FFA permite un ahorro del consumo de glucosa. La glucemia fuera del período en el que la absorción de alimentos permite un aumento del nivel de glucosa de origen exógeno en la sangre, se mantiene por el hígado, con la liberación de glucosa del depósito de reserva, esto es, glucógeno, y con la neosíntesis continua de glucosa a partir de aminoácidos específicos (neoglucogénesis). La glucogenolisis y la neoglucogénesis son siempre simultáneamente activas en el período de postabsorción, aunque en diferentes relaciones (justamente como la glucogenogénesis, en parte alimentada por neoglucogénesis). Las células, los tejidos y los órganos, así como el propio cuerpo, son sistemas abiertos, en los que es necesario y, por tanto, posible, identificar una entrada de información, material y energía.

Sobre la base de estas premisas bioquímicas generales, el inventor se ha planteado la hipótesis de que la disponibilidad de aminoácidos específicos es capaz de transmitir a las células un mensaje doble: por una parte, la disponibilidad de material plástico, por otra parte, la disponibilidad de material energético. El inventor se ha planteado además la hipótesis de que un grado específico de disponibilidad, si se acopla adecuadamente a la duración y constancia de las variaciones de la concentración, constituye un mediador para las células de la información de que hay una disponibilidad adecuada de material y energía para activar la renovación o el desarrollo de estructuras intracelulares. Consecuentemente, para células en las que es posible esto, es útil o necesario activar la propia duplicación de células.

40 No existen hipótesis similares sobre las propiedades de control de la respuesta celular que una aportación adecuada es potencialmente capaz de proporcionar

Las consecuencias de este enfoque son interesantes: hay la posibilidad de identificar un denominador común energético-metabólico más bajo que es capaz de maximizar la respuesta de células, identificar clases y cantidades de una mezcla de aminoácidos capaz de suministrar el mensaje correcto a tejidos y órganos dados, o al cuerpo entero. Los niveles de respuesta presumiblemente serán diferentes dentro de las células y por tanto dentro de los tejidos, los órganos y el cuerpo entero. El corolario a esta hipótesis es la cuestión: qué pueden ser, dentro de las células, las estructuras capaces de recibir mensajes del ambiente y de transmitir a la célula y desde la célula al tejido, y así sucesivamente con una complejidad crecientemente mayor, el mensaje de que es posible poner en marcha nuevas síntesis, o emplear suficiente, pero mucha, energía y recursos plásticos en células nuevas.

50 La atención del inventor se ha centrado en los orgánulos clave en la producción de energía, esto es, la mitocondria. Una serie de recientes estudios ha demostrado que la supervivencia de células y la propia duración de la vida de células depende de la mitocondria. La presencia de oxidantes (ROS) producidos por metabolismo acorta la vida de la mitocondria y de las células. Un reciente estudio ha demostrado además que, en la miocardiopatía dilatadora, las mitocondrias que están más próximas a la parte exterior de las células son menos sensibles a los ataques oxidantes hacia la superficie (y que por tanto las síntesis transcurren por vía excéntrica), por debajo del sarcolema, que las que están hacia el centro de las células donde las mitocondrias son más fácilmente sensibles a experimentar apoptosis (Fannin S.W. y otros, Arch. Biochem., Biophys. 1999, 372:399-407), La propia apoptosis, por la vía de la cascada de caspasa, puede ser desencadenada por las mitocondrias (Dirks A. y Leeuwenburg C., Am. J. Physiol. Regulatory

Integrative Comp. Physiol., 2002:282, R519-527).

Como se ha dicho, tres cuartas partes del requerimiento de nitrógeno del organismo son cubiertas por cinco aminoácidos esenciales. Cuatro de estos son aminoácidos neutros de los que tres son aminoácidos de cadena ramificada: leucina (cetogenética), isoleucina (cetogenética y glucogénica) valina (glucogénica), y treonina (glucogénica), caracterizadas por un grupo hidroxilo en la posición  $\beta$ ; el quinto es un aminoácido básico, lisina, que tiene un grupo amina ( $\text{NH}_3^+$ ) en la posición  $\epsilon$ .

Partiendo de las premisas presentadas antes, los estudios en que se basa la presente invención han permitido la identificación de una mezcla estequiométrica de aminoácidos que permitiría el uso máximo para fines de síntesis, optimización, al mismo tiempo, satisfacer el requerimiento de energía del metabolismo de energía mitocondrial. De acuerdo con la invención:

1) La mezcla contempla el uso del aminoácido ramificado leucina en combinación con al menos uno y, preferiblemente los dos, de los aminoácidos ramificados isoleucina y valina. Las relaciones, expresadas en gramos-moles entre los aminoácidos en proporción a 1 gramo-mol de L-leucina se pueden identificar como sigue:

L-isoleucina: de 0,2 a 0,7, preferiblemente de 0,4 a 0,6;

L-valina: de 0,2 a 0,7, preferiblemente de 0,4 a 0,6.

2) La mezcla contempla como otros ingredientes activos, al menos uno, y posiblemente los dos, de los aminoácidos treonina y lisina. Las relaciones, expresadas en gramos-moles de L-leucina se pueden identificar como sigue:

L-treonina de 0,15 a 0,50, preferiblemente de 0,2 a 0,45;

L-lisina de 0,15 a 0,60, preferiblemente de 0,3 a 0,55.

En el estado actual de los estudios realizados por el inventor, la formulación que actualmente parece que presenta un mayor grado de actividad es una formulación que, estableciendo en 1 la suma de leucina, isoleucina y valina, en las dimensiones recíprocas basadas en el peso molecular en gramos-moles identificadas en el punto 1), la suma de treonina y lisina está entre 10% y 50% de la mencionada formulación (siempre sobre la base del peso molecular en gramos-moles de las sustancias en cuestión) y, preferiblemente, entre 25% y 45%.

3) La ingestión nutricional de la mezcla se puede integrar con uno o varios otros aminoácidos esenciales y, en particular, histidina, metionina, fenilalanina, triptófano. Estableciendo en 1 la suma de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina, los otros aminoácidos esenciales (histidina, metionina, fenilalanina, triptófano) se representan por una cantidad global (expresada nuevamente como relaciones de peso molecular en gramos-moles/peso molecular en gramos-moles) que varía de 2% a 25% y, preferiblemente, de 5% a 15%.

4) Posiblemente dos aminoácidos no esenciales pueden optimizar la mezcla de los aminoácidos antes mencionados por adición a ellos de:

4.1) tirosina (que fisiológicamente se produce por hidroxilación de fenilalanina), puesto que la derivación de tirosina de fenilalanina puede producirse sólo en el hígado, mientras que un uso importante se produce periféricamente en, por ejemplo, músculo o en el miocardio, donde la vía enzimática para la hidroxilación del mencionado aminoácido no existe; la cantidad óptima de tirosina se ha identificado como que varía de 15% a 60%, de la cantidad de fenilalanina presente en la mezcla madre y, preferiblemente, de 20% a 35%. Cuanto mayor es la alteración hepática, o el requerimiento periférico como función de una ingestión reducida de otras fuentes, mayor será la utilidad de aumentar las relaciones estequiométricas entre tirosina y fenilalanina, hasta un máximo indicativo de 50%.

4.2) La cist(e)ina (cistina y/o cisteína) que preferiblemente serán al menos el 100%, con una cantidad óptima identificada como comprendida entre 150% y 350% de la cantidad de metionina presente en la mezcla madre,

La presencia antes mencionada de la cisteína, que se puede transformar fácilmente metabólicamente en metionina, impedirá que la relativa escasez de cisteína, en el proceso de interconversión de metionina en cisteína, de origen en condiciones de un exceso relativo de metionina o escasez de folatos, al intermedio tóxico, esto es, homocisteína y a que se pare en este punto.

5) Se pueden contemplar uno o varios aminoácidos más como otros ingredientes activos de la mezcla, cuya suma en peso molecular en gramos estará en un porcentaje inferior a 20% en relación a los otros ingredientes activos e inferior a 10% para cada aminoácido individual adicional.

6) En su formulación preferida, la mezcla de acuerdo con la invención tiene un pH en solución acuosa entre 6,5 y 8,5, con o sin excipientes adecuados para la preparación de comprimidos, cápsulas, polvos, etc. y en cualquier forma farmacéutica de presentación adecuada para uso enteral o parenteral.

En las reivindicaciones anexas, que constituyen una parte integral de la presente descripción, se contienen otras

5 especificaciones en forma de cantidades y relaciones entre los diversos aminoácidos contemplados en las composiciones de acuerdo con la invención. Incluso aunque las relaciones se expresan sobre la base de peso molecular, las indicadas en las reivindicaciones anexas son aplicables, en términos generales, en el caso de cálculo basado en peso en gramos de los diversos aminoácidos (teniendo en cuenta, sin embargo, que la cantidad de lisina, expresada en gramos y no en moles, puede ser mayor que las cantidades individuales de isoleucina y valina).

En la tabla siguiente se da un ejemplo de formulación de la mezcla de aminoácidos de acuerdo con la invención, preparada de acuerdo con los principios indicados.

Tabla 1

Aminoácido	Peso molecular*	g/100 g	% del total	% del grupo
L-leucina	131,17	31,2500	31,25%	50,00%
L-isoleucina	131,17	15,6250	15,63%	25,00%
L-valina	117,15	15,6250	15,63%	25,00%
Totales Grupo A		62,5000	62,50%	100,00%
L-lisina	146,19	16,25000	16,25%	65,00%
L-treonina	119,12	8,7500	8,75%	35,00%
Totales – Grupo B		25,0000	25,00%	100,00%
L-histidina	155,16	3,7500	3,75%	46,86%
L-fenilalanina	165,19	2,5000	2,50%	31,25%
L-metionina	149,21	1,2500	1,25%	15,03%
L-triptófano	204,23	0,5000	0,50%	6,25%
Totales – Grupo C		8,0000	8,00%	100,00%
L-tirosina	181,19	0,7500	0,75%	
L-cistina	240,30	-3,7500	3,75%	
Totales para composición		100,0000	100,00%	

10 \* De *Amino Acids, Nucleic Acids & Related Compounds-Specification/General Texts*, 8ª edición, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

En la tabla siguiente la cantidad en gramos de la composición se refiere a las expresadas en la Tabla 1 sobre la base del peso molecular.

Tabla 2

Aminoácido	Peso molecular*	Moles	% del total	% del grupo
L-leucina	131,17	0,23824	31,97%	48,55%
L-iso-leucina	131,17	0,11912	15,98%	24,27%
L-valina	117,15	0,13338	17,90%	27,18%
Totales – Grupo A		0,49074	65,85%	100,00%
L-lisina	146,19	0,11116	14,92%	65,00%
L-treonina	119,12	0,07346	9,86%	35,00%
Totales – Grupo B		0,18461	24,77%	100,00%
L-histidina	155,16	0,02417	3,24%	48,21%
L-fenilalanina	165,19	0,01513	2,03%	30,19%
L-metionina	149,21	0,00838	1,12%	16,71%
L-triptófano	204,23	0,00245	0,33%	4,58%
Totales – Grupo C		0,05013	6,73%	100,00%
L-tirosina	181,19	0,00414	0,58%	
L-cistina	240,30	0,01561	2,09%	
Totales para composición		0,74522	100,00%	

5 Como se pondrá de manifiesto claramente en lo que sigue, la administración de una mezcla de acuerdo con la invención y, en particular, de acuerdo con la Tabla 1, es decisiva en el aumento del número de mitocondrias. Por una parte, esto conduce a una inhibición de la apoptosis mediante un mecanismo preciso mediado por caspasa, que es la inhibición de la activación de la caspasa específicamente resultante del sufrimiento mitocondrial; por otra parte, conduce a un incremento de la disponibilidad de energía para cada célula individual y, por tanto, a la mejora clínica a la que se refiere.

10 La mezcla es funcional para lograr este resultado en virtud de las peculiares relaciones estequiométricas entre “cúmulos” de aminoácidos, lo que también se puede inferir de la Tabla 2. Debe señalarse que éstos no son necesariamente “cúmulos” quimicofísicos ni que tengan cualesquiera características metabólicas comunes excepto para el resultado final al que las peculiares relaciones estequiométricas tienden: la cobertura de los requerimientos de energía y, en cualquier caso, permitir la disponibilidad de un sustrato de aminoácidos para los necesarios procesos de síntesis. Es la capacidad para satisfacer simultáneamente ambas necesidades lo que actúa en la acción antiapoptosis y de síntesis.

### 15 Estudios clínicos

El problema se enfocó por dos diferentes vías, esto es, desde el punto de vista clínico y desde el punto de vista experimental, procediendo en una secuencia lógica.

20 Sabiendo que con mayor edad se produce una reducción del número de mitocondrias en la estructura o masa muscular, se realizó un estudio clínico para verificar si los efectos beneficiosos de un suplemento con la mezcla de acuerdo con la invención pudieran confirmarse con proteínas en sujetos de edad avanzada que tienen problemas de limitación de la movilidad. En este tipo de pacientes, una movilidad reducida crea discapacidad para el movimiento, causando pérdida de trofismo muscular y ésta, a su vez, en un círculo vicioso, causa mayor reducción de la movilidad. En estos pacientes, la incapacidad para adaptar su función cardíaca a la mayor carga de trabajo requerida por la actividad física puede llegar a ser uno de los factores invalidantes.

25 Consecuentemente se reclutaron 40 pacientes de más de 65 años que tenían una vida sedentaria y que tenían una mala calidad de vida en relación a su estado de salud, con una eyección ventricular (VE) normal en descanso, sin angina o cualquier otra afección patológica invalidante. Su actividad física reducida se documentó por un ensayo de andadura durante 6 minutos y su percepción de dificultad de pasear mediante un cuestionario sobre la invalidez al andar. Además, usando un dinamómetro, se midió la fuerza muscular isométrica máxima. Además se midió la VE en

descanso y durante ejercicio isométrico por ecocardiografía bidimensional. Los datos se evaluaron antes y al final de 3 meses de administración oral de la mezcla de aminoácidos de acuerdo con la Tabla 1.

5 No se modificó por la terapia el índice de masa corporal (IMC), pero la distancia recorrida durante un paseo de 6 minutos aumentó de  $214,6 \pm 32$  m a  $262,8 \pm 34,8$  m ( $P < 0,001$ ) después del tratamiento y análogamente hubo una mejora en los datos del cuestionario de autoestima, como los de distancia, velocidad y número de tramos de escaleras ( $P < 0,001$ , con respecto a los valores basales). No se modificó con la terapia la VE, ni la presión sanguínea o la frecuencia cardíaca.

10 La capacidad de ejercicio isométrico medida con un dinamómetro (ensayo de agarre manual) aumentó de  $16,6 \pm 2,4$  a  $19,2 \pm 2,2$  ( $P < 0,001$ ). Bajo tensión la VE no variaría o aumentaría en condiciones normales, en más de 0,05 U. Antes de iniciar la terapia, 66% de los pacientes presentaban una disminución de la VE bajo tensión ( $P < 0,005$ ), mientras que el 34% restante tenía una respuesta normal. En el 93% de los pacientes con VE alterada, después de tres meses de terapia, la VE bajo tensión aumentó o permaneció inalterada respecto al valor basal, esto es, se había normalizado.

15 Se adaptaron varios modelos experimentales para interpretar y explorar el mecanismo por el que la mencionada mezcla de aminoácidos era capaz de activar un comportamiento energético mejor de las células musculares del miocardio en el estudio clínico descrito.

20 Un primer modelo experimental, usando el corazón perfundido aislado de una rata, proporcionó indicaciones indirectas que permitieron confirmar la hipótesis de que el mitocondrion era un orgánulo a estudiar como posible actor en el logro de los resultados encontrados. A este fin, en el corazón aislado de una rata, perfundido con una solución tampón estándar, siguió una fase de perfusión durante 30 min seguida de una fase de isquemia completa (ligación de las coronarias) y asistolia protractada durante 30 min; luego se reperfundió el miocardio y se hizo que volviera a latir.

Los grupos eran tres:

- a) un grupo de control;
- 25 b) un grupo similar al de control pero sin una perfusión aguda con la mezcla a que se hace referencia en la Tabla 1, en una cantidad de 0,25 mg/ml en la fase de 30 min que precedía a la de isquemia y en la de reperfusión isquémica,
- c) un grupo de animales tratados durante 20 días con 1 g/kg/d de la mezcla a la que se hace referencia en la Tabla 1, antes de aislar el miocardio.

Las variables medidas fueron:

- 30 - presión arterial sistólica y diastólica (PA),
- liberación de creatinfosfoquinasa (CPK) y lactato (ensayos enzimáticos),
- actividad mitocondrial (con electrodo de Clark),
- apoptosis de células endoteliales y cardiomiocitos (con TUNEL),
- la actividad de caspasa-3 y caspasa-9 en el endotelio y en los cardiomiocitos (con el ensayo fluorimétrico).

35 Los resultados se pueden resumir como se describe seguidamente.

40 El grupo "a" (controles) y el grupo "b" (perfusión aguda en un animal no tratado) se mostraron en conjunto similares para todos los parámetros examinados y, por tanto, sin efecto. A diferencia, los corazones de los animales del grupo "c" (pretatados durante 20 días con 1 g/kg/d de la mezcla a que se ha hecho referencia en la Tabla 1, antes de aislar el miocardio) presentaron una presión arterial diastólica claramente inferior (PA), así como una respuesta funcional a la reperfusión y una recuperación claramente más alta de la contracción ventricular.

Análogamente, hubo una reducción significativa de la liberación de CPK, lo que indica una integridad mayor de las membranas celulares, y de la liberación de lactato, reducción que indica un mayor uso de piruvato por el ciclo de ácido cítrico, aunque en ausencia total de contractilidad miocárdica de oxígeno puesto que ya no llegaba más con la sangre.

45 En este momento se hizo una comprobación para ver si había algún aumento en la producción de energía y de cómo podría influir esto sobre la contractilidad miocárdica durante la fase isquémica protractada y en la fase de reperfusión.

50 Usando la misma metodología y los mismos grupos de tratamiento, se estudió luego el contenido de ATP y fosfato de creatina (CF) en el tejido, así como la actividad mitocondrial, evaluando el  $VO_2$  y la producción de ATP mitocondrial.

Sólo el tratamiento crónico (grupo "c"; 1 g/kg/d de la mezcla referida en la Tabla 1 antes de aislar el miocardio) dio origen a modificaciones estadísticamente significativas de los parámetros examinados, induciendo una mejora, esto es, aumento, de la actividad de las mitocondrias.

5 Puesto que la integridad de las mitocondrias es fundamental para el mantenimiento de la integridad de células vivas, tenía un interés particular identificar si la mezcla referida en la Tabla 1 tenía efecto sobre la apoptosis y, con el fin de comprender los posibles mecanismos de control, se estudiaron diferentes niveles de la cascada de caspasas, esto es, los mecanismos enzimáticos que controlan la apoptosis intracelular.

10 Dado que la mitocondria es el orgánulo que produce energía, es fundamental para la vida de la célula. La pérdida de mitocondrias daría por resultado una pérdida progresiva de los activos de energía de la célula, con una alteración progresiva de los procesos de eliminación de material de desecho, de síntesis y de función celular. La célula se vuelve menos capaz de mantenerse por sí; consecuentemente, se produce el proceso de apoptosis (una forma de suicidio de la célula) para reducir el número de células ineficientes para dar a las otras la posibilidad de reemplazarlas o de sobrevivir en condiciones de baja competición sobre los sustratos. La apoptosis es controlada por varios mecanismos, algunos de los cuales son extracelulares, por actuación de receptores específicos, y algunos de los cuales son intracelulares, de los que el principal, que quizás es un mediador posreceptor indispensable también para los otros, está bajo control mitocondrial. La apoptosis de las mitocondrias libera citocromo al citoplasma y esto activa la caspasa-9, a lo que sigue la activación directa de la cascada apoptótica restante.

20 Esta observación tiene una importancia particular para entender el mecanismo de acción de diferentes enfoques terapéuticos sobre la apoptosis: el control de la mitocondria sobre la caspasa-9 es específico y, por tanto, con el fin de tener la certeza de no haber creado acontecimientos al azar u otra posible interferencia con otros mecanismos de activación de diferentes caspasas, también se estudió la caspasa -8 (cuya activación está unida principalmente a IL-1 y a TNF $\alpha$ ).

25 La caspasa-9 (administrada de modo ciego por un laboratorio externo) fue la única en demostrar una reducción significativa de su presencia en los animales del grupo "c" que fueron tratados crónicamente por vía oral durante 20 días, con 1 g/kg/d de la mezcla referida en la Tabla 1 antes de aislar el miocardio. No se observó modificación alguna en el estudio de caspasa-8 activada por receptores de membrana.

Esta serie de estudios posibilita entender cómo los resultados observados experimentalmente y en el estudio clínico en seres humanos referidos previamente son necesariamente atribuibles al mitocondrion, independientemente de la activación del receptor e influencias de la membrana.

30 Finalmente, luego se verificó si la mayor eficiencia metabólica era debida a una actividad acrecentada de mitocondrias individuales u otras, y esto es una cuestión conocida como indispensable durante la duplicación celular, que está históricamente bien documentada y filmada en observaciones experimentales (Padoa E., 1967 en *Biología Generale*, 3ª edición, capítulo 4): *La Celula*, 116-118, Boringhieri Editore S.p.A, Turín), pero nunca se ha planteado, ni siquiera hipotéticamente, como inducible en condiciones fisiológicas o patológicas si se multiplicaron las mitocondrias, aumentando su número, en respuesta a la introducción de la mezcla de aminoácidos de acuerdo con la invención.

35 Esto condujo a la necesidad de contar el número de mitocondrias, antes y después de tratamiento, en condiciones patológicas que reducían su número y similares a aquellas en que se había realizado el estudio en seres humanos.

40 Se emplearon ratas Wistar de 18 meses de edad, se examinaron a los meses 22 y 24. Se comparó un grupo de control con un grupo que se había tratado con la mezcla de aminoácidos de acuerdo con la invención, adoptando un criterio de aleatorización. Antes de nada, se contó independientemente el número de mitocondrias (MT) usando procedimientos histoquímicos y ultraestructurales (por microscopía electrónica) en animales de seis meses como controles. El número de las mitocondrias en el músculo periférico, en el miocardio y en las células del córtex cerebral se redujo proporcionalmente de acuerdo con la edad (esto es, un número menor en los animales más viejos).

45 La administración de 0,3 g/kg/d de la mezcla referida en la Tabla 1 a los animales senescentes demostró ser extremadamente eficiente en mantener el patrimonio de mitocondrias más intacto, esto es, más alto, con un valor porcentual de 26 $\pm$ 5% y 31,7 $\pm$ 7% respectivamente, que para animales no tratados de edad comparable en las comprobaciones realizadas a 22 meses y a 24 meses.

Esto muestra que aumentar el número de mitocondrias, no sólo es posible sino terapéutico en diversas condiciones.

50 Posteriores análisis permitieron averiguar el hecho de que era posible una mejora de 23 $\pm$ 40% del número de mitocondrias con justamente 5 aminoácidos de la mezcla de la Tabla 1 usando una relación estequiométrica de aproximadamente 1:05 entre la suma de leucina, isoleucina y valina, (1) y la suma de treonina y lisina (0,5). Con la eliminación de treonina y/o lisina, no se modificó significativamente el número de mitocondrias en cualquiera de los animales. La reducción de leucina a menos de 15% del peso total de la mezcla condujo a invalidar significativamente los efectos positivos de la mezcla, si bien los efectos fueron menos marcados aunque



estadísticamente significativos, si la isoleucina o la valina se reducían en la misma proporción de la mezcla, con tal que se mantuviera constante la leucina (en la perspectiva mencionada, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contemplar hasta 60% de leucina pero no menos de 15% respecto a los otros dos aminoácidos ramificados, hasta 40% de isoleucina, pero no menos de 15% respecto a los otros dos aminoácidos ramificados, y hasta 40% de valina pero no menos de 15% respecto a los otros dos aminoácidos ramificados).

Los estudios preliminares realizados, en los que diferentes tipos de afecciones relativas a la ingestión nutricional y a la cantidad de ejercicio físico impuesto, permitieron confirmar cómo, en voluntarios, las relaciones estequiométricas reivindicadas entre los diferentes aminoácidos tienen en cuenta las necesidades más extremadas, minimizando la posibilidad de encontrar en exceso, o en defecto, un aminoácido individual, en relación recíproca con los otros, y que las mencionadas relaciones permiten un uso máximo de aminoácidos a fines de síntesis, optimizando simultáneamente la cobertura de los requerimientos de energía del metabolismo mitocondrial de energía.

De lo anterior se deduce claramente cómo las composiciones de acuerdo con la invención demuestran ser útiles para el tratamiento de afecciones patológicas caracterizadas por una función mitocondrial insuficiente en seres humanos y en animales, siempre que estén diseñadas para mantener intacto y/restablecer y/o aumentar el número de mitocondrias intracelulares, así como para modificar en sentido positivo la actividad de producción de energía intracelular. Las composiciones de acuerdo con la invención demuestran así ser útiles en cualquier afección en la que una reintegración de una actividad energética celular reducida puede modificar para favorecer la actividad de la propia célula y por tanto del tejido y el órgano que se forma por el conjunto de células, tal como un aumento de la actividad neuronal en enfermedades degenerativas del sistema nervioso (enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrópica, enfermedad de Alzheimer), en las que la actividad de las células decrece a causa de capacidad energética reducida, lo que implica una pérdida de actividad energética mitocondrial.

El campo de aplicación de la invención se extiende a proteínas obtenidas por ingeniería genética o cualquier otro procedimiento artificial, en el que haya una composición estequiométrica de aminoácidos según se ha descrito antes y se reivindica en las reivindicaciones anexas.

Con el fin de implementar la invención, los aminoácidos indicados antes pueden ser reemplazados por respectivos derivados farmacéuticamente aceptables, esto es, sales.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina, o sus sales farmacéuticamente aceptables en las siguientes relaciones en gramos-moles:

- isoleucina: de 0,2 a 0,7,

5 - valina/leucina: de 0,2 a 0,7,

- treonina/leucina: de 0,15 a 0,50,

- lisina/leucina: de 0,15 a 0,80,

para la preparación de una composición para tratamiento de pacientes que padecen enfermedades degenerativas del sistema nervioso.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suma de las cantidades en gramos-moles de treonina y lisina, o sus sales, está entre 10% y 50% de la suma de la cantidad en gramos-moles de leucina, isoleucina y valina o sus sales.

15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la leucina, la isoleucina, la valina, la treonina y la lisina, o sus sales están en combinación con uno o varios otros aminoácidos esenciales, o sus sales farmacéuticamente aceptables, seleccionados entre el grupo constituido por histidina, metionina, fenilalanina, triptófano.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la leucina, la isoleucina, la valina, la treonina y la lisina, o sus sales, están en combinación con histidina, metionina, fenilalanina, triptófano, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la suma de las cantidades en gramos-moles de histidina, metionina, fenilalanina, triptófano, o sus sales, es de 2% a 25% de la suma de la cantidad en gramos-moles de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina, o sus sales.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la leucina, la isoleucina, la valina, la treonina y la lisina, o sus sales, están también en combinación con al menos una entre tirosina y cist(e)ina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

25 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cantidad en gramos-moles de tirosina, o una de sus sales, es de 15% a 50% de la cantidad en gramos-moles de fenilalanina, o una de sus sales.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cantidad en gramos-moles de cist(e)ina, o una de sus sales, es de como mínimo 100% de la cantidad en gramos-moles de metionina, o una de sus sales.

30 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la suma de las cantidades individuales en gramos-moles de treonina y lisina, o sus sales, es menor que la suma de las cantidades individuales en gramos-moles de leucina, isoleucina, valina, o sus sales, pero mayor que la suma de las cantidades individuales del (los) otro(s) mencionados aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

35 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la cantidad en gramos-moles de treonina o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales en gramos-moles de lisina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la cantidad o cantidades individual(es) en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

40 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la cantidad en gramos-moles de lisina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales de leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la cantidad o las cantidades individual(es) en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la cantidad en gramos-moles de treonina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales en gramos-moles de lisina, leucina y valina, o sus sales, pero mayor que la cantidad o cantidades individual(es) del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

45 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la cantidad en gramos-moles de lisina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales de leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la suma de la cantidad o las cantidades individual(es) en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

50 14. Una composición que comprende, como ingredientes activos, los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades degenerativas del sistema nervioso, estando la isoleucina, la valina, la treonina y la lisina en las

siguientes relaciones en gramos-moles con la leucina;

- isoleucina: de 0,2 a 0,7,
- valina/leucina: de 0,2 a 0,7,
- treonina/leucina: de 0,15 a 0,50,
- 5 - lisina/leucina: de 0,15 a 0,60,

15. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la suma de las cantidades en gramos-moles de treonina y lisina, a sus sales, está entre 10% y 50% de la suma de la cantidad en gramos-moles de leucina, isoleucina y valina, o sus sales.

10 16. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, que además comprende uno o varios aminoácidos esenciales, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, seleccionados entre el grupo constituido por histidina, metionina, fenilalanina, triptófano.

17. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16, que además comprende histidina, metionina, fenilalanina, triptófano, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 18. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que la suma de las cantidades en gramos-moles de histidina, metionina, fenilalanina, triptófano, o sus sales, es de 2% a 25% de la suma de la cantidad en gramos-moles de leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina, o sus sales.

19. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16, que además comprende al menos una de lisina y cist(e)ina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

20 20. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la cantidad en gramos-moles de tirosina, o una de sus sales, es de 15% a 50% de la cantidad en gramos-moles de fenilalanina, o una de sus sales.

21. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la cantidad en gramos-moles de cist(e)ina o una de sus sales, es como mínimo 100% de la cantidad en gramos-moles de metionina, o una de sus sales.

25 22. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en la que la suma de las cantidades individuales en gramos-moles de treonina y lisina, o sus sales, es menor que la suma de las cantidades individuales en gramos-moles de leucina, isoleucina, valina, o sus sales, pero mayor la suma de las cantidades individuales del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

30 23. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en la que la cantidad en gramos-moles de treonina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales en gramos-moles de lisina, leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor la cantidad o cantidades individuales en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

35 24. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en la que la cantidad en gramos-moles de lisina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales de leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la cantidad o cantidades individuales en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

25. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en la que la cantidad en gramos-moles de treonina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales en granos-moles de piridina, leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la suma de la cantidad o cantidades individuales del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.

40 26. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en la que la cantidad en gramos-moles de lisina, o una de sus sales, es menor que las cantidades individuales de lisina, leucina, isoleucina y valina, o sus sales, pero mayor que la suma de la cantidad o cantidades en gramos-moles del (los) otro(s) mencionado(s) aminoácido(s) esencial(es), o sus sales.