

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 049**

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2004 E 08001078 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1920769**

54 Título: **Métodos y materiales para tratar afecciones asociadas con trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

28.07.2003 US 490473

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**PREKULAB LTD. A/S AF 8. MARTS 2004 (100.0%)
Revvej 41
4220 Korsor, DK**

72 Inventor/es:

MATALON, REUBEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 404 049 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

Métodos y materiales para tratar afecciones asociadas con trastornos metabólicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a métodos y materiales para tratar afecciones asociadas con trastornos metabólicos y, más particularmente, a métodos y materiales para tratar afecciones asociadas con trastornos metabólicos de aminoácidos particulares.

Antecedentes de la invención

10 Algunas afecciones que aquejan a los seres humanos así como a otros animales, pueden atribuirse a trastornos del metabolismo de aminoácidos particulares. En muchas de estas afecciones el tratamiento lleva consigo la restricción en la ingestión de la dieta del aminoácido o aminoácidos particulares asociados con la afección. Sin embargo, los tratamientos terapéuticos basados en la restricción dietética requieren la conformidad del paciente y también requieren que el paciente conozca si un determinado alimento contiene el aminoácido o aminoácidos particulares asociados con la afección a tratar.

15 Por ejemplo, la fenilcetonuria ("PKU") es la hiperaminoacidemia de fenilalanina (Phe) asociada con un error innato del metabolismo de la fenilalanina, una mutación del gen que codifica la fenilalanina-4-hidroxilasa ("PAH"), que convierte la fenilalanina en tirosina. En algunos casos tiene lugar un defecto metabólico adicional en el camino de la síntesis de o bien la dihidropteridina o bien la tetrahidrobiopterina ("BH4"), cofactores de la PAH, que contribuyen, además, a la hiperfenilalaninemia ("HPA"). Mientras que el nivel plasmático normal de Phe es, aproximadamente, 0,05 mM (Pardridge, "Blood-Brain Barrier Amino Acid Transport: Clinical implications", capítulo 6 en *Inborn Errors of Metabolism in Humans*, Cockburn et al., compiladores, Lancaster, Inglaterra: MTP Press Ltd. (1980), ("Pardridge"))
 20 los pacientes aquejados de PKU "clásicos" sin tratar tienen niveles plasmáticos de Phe superiores a 1 mM (p.ej., niveles plasmáticos de Phe de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2,5 mM o más), y, aun cuando el tratamiento con una dieta baja en Phe haya logrado el objetivo de reducir el nivel de Phe plasmática a un valor inferior a 0,3 mM, esto es difícil de alcanzar debido a problemas de obediencia a la dieta. En EE.UU. 1 de cada
 25 10.000 bebés ha nacido con PKU.

30 Los niveles excesivos de fenilalanina plasmática observados en PKU combinados con la afinidad relativamente alta de la Phe para sitios de unión existentes sobre la proteína transportadora del sistema de transporte de aminoácidos neutros de la barrera hemática cerebral ("BBB") conduce a (i) acumulación en el cerebro de Phe y sus metabolitos neurotóxicos (p. ej. fenilpiruvato, fenilacetato, fenil-lactato), y (ii) niveles disminuidos de aminoácidos neutros no Phe que entran en el cerebro, lo que por resultado alteración del desarrollo del cerebro y de la función cerebral, ya que los caminos que son la clave del metabolismo cerebral (p. ej. la síntesis de neurotransmisores) requieren aminoácidos precursores tales como la tirosina. Esta disminución es pronunciada para la tirosina, que es baja en el aporte plasmático debido al error metabólico en la PKU de la enzima responsable de la conversión de fenilalanina en tirosina. El pensamiento actual es que los déficits neurológicos de la PKU son debidos principalmente a la disminución de los niveles de los aminoácidos neutros no Phe que entran en el cerebro
 35 (Kaufman, "Some Facts Relevant to a Consideration of a Possible Alternative Treatment for Classical Phenylketonuria", *J. Inher. Metab. Dis.*, 21 (suplemento 3):4-19 (1998)("Kaufman")).

40 Aun cuando una dieta baja en fenilalanina puede reducir los niveles plasmáticos de Phe en la PKU "clásica" a un valor por debajo de 0,3 mM y mejorar el retraso mental asociado con la PKU sin tratar, la obediencia a la dieta llega a hacerse problemática a medida que los pacientes aquejados de PKU alcanzan la adolescencia, lo que lleva a una elevación de los niveles plasmáticos de Phe y tanto a pérdida de inteligencia como a cambios de la sustancia blanca del cerebro. Asimismo pueden resultar deficiencias alimentarias de las dietas restringidas en Phe. Por tanto, han sido desarrollados tratamientos alternativos. Por ejemplo, para obviar la reducción sospechada de los neurotransmisores dopamina y serotonina, los pacientes con PKU han sido tratados con los precursores de neurotransmisores
 45 neurotransmisores tirosina y triptófano (Lou, "Large Doses of Tryptophan and Tyrosine as Potential Therapeutic Alternative to Dietary Phenylalanine Restriction in Phenylketonuria", *Lancet*, 2:150-151 (1983)). Para reducir la entrada de Phe en el cerebro, se administró a pacientes de más edad aquejados de PKU un suplemento de aminoácidos neutros de cadena ramificada que contenía valina, isoleucina y leucina (Berry et al., "Valine, Isoleucine and Leucine. A New Treatment for Phenylketonuria". *Am. J. Dis. Child.*, 144:539-543 (1990)("Berry")), quien informó una mejoría importante en déficits de comportamiento. En la publicación de Kaufman, se propuso que la adición de los precursores de neurotransmisores, tirosina y triptófano, al suplemento de Berry podría conducir a una mejoría aun mayor. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos dietéticos con suplementos de aminoácidos ha sido objeto de controversia.

55 La tirosinemia es otro ejemplo de una afección que puede atribuirse a un trastorno del metabolismo de aminoácidos particulares. Más especialmente, la tirosinemia es un trastorno ocasionado por un defecto en la enzima terminal del camino metabólico de la tirosina, que conduce a la acumulación de acetoacetato de fumarilo, que convierte en succinilacetona, que se acumula y es tóxica para el hígado. La tirosinemia está asociada con fallo hepático, enfermedades hepáticas y hepatocarcinoma. El trasplante de hígado puede restaurar la actividad enzimática normal

para el camino metabólico de la tirosina y se utiliza en casos avanzados. No obstante, esta es una terapia difícil y costosa. Otra terapia empleada actualmente para el tratamiento de la tirosinemia incluye un doble enfoque : (i) el uso de un nuevo inhibidor de la tirosina hidroxilasa, NTBC, ((2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona), que evita la formación de succinilacetona; y (ii) una dieta baja tanto en tirosina como en fenilalanina, ambas, para regular la cantidad de tirosina que debe ser metabolizada. Sin embargo, cuestiones de seguridad con respecto al NTBC no han obtenido respuesta hasta la fecha, y la restricción dietética de tirosina y fenilalanina depende del conocimiento y la obediencia del paciente, lo que, como se ha mencionado anteriormente, puede ser problemático, especialmente en adolescentes y adultos

La alcaptonuria es otro ejemplo de una afección que puede atribuirse a un trastorno del metabolismo de aminoácidos particulares. Los tratamientos terapéuticos actuales comprenden la restricción en la dieta de la ingestión de fenilalanina y tirosina, para reducir la acumulación del metabolito, ácido homogentísico. Algunos pacientes toman NTBC y vitamina C para reducir los agregados de ácido homogentísico. Sin embargo, cuestiones de seguridad referentes al NTBC no han tenido respuesta hasta la fecha, y la restricción en la dieta de tirosina y fenilalanina depende del conocimiento y de la obediencia del paciente, lo que, como se ha indicado anteriormente, puede ser problemático.

La homocistinuria es otro ejemplo de una afección que puede ser atribuida a un trastorno del metabolismo de aminoácidos particulares. Los pacientes con esta afección siguen frecuentemente una dieta restringida en metionina. No obstante, la restricción de metionina en la dieta depende del conocimiento y la obediencia del paciente, lo que, como se ha mencionado anteriormente, puede ser problemático.

Algunas afecciones pueden atribuirse a trastornos metabólicos que afectan al metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada ("BCAAs"), tales como leucina, isoleucina y valina. La leucina, la isoleucina y la valina son aminoácidos esenciales que deben ser obtenidos de las proteínas dietéticas. Un defecto en una de las etapas de un camino metabólico de varias etapas que convierta los BCAAs en energía, da como resultado la acumulación en niveles tóxicos de un metabolito intermedio del BCAA, lo que ocasiona enfermedad. Este es un grupo grande de enfermedades que comprende, por ejemplo, la enfermedad urinaria del jarabe de arce ("MSUD"), la acidemia isovalérica, la acidemia metilmalónica y la acidemia propiónica. Estas enfermedades son tratadas con fórmulas dietéticas especiales bajas en el BCAA que tiene el defecto metabólico. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, el tratamiento con éxito de tales enfermedades y afecciones por restricción en la dieta de un aminoácido particular o de un conjunto particular de aminoácidos, depende del conocimiento y de la obediencia del paciente, lo que puede ser problemático.

A la vista de lo anteriormente expuesto, existe la necesidad de métodos y materiales para tratar afecciones tales como la fenilcetonuria, que pueden atribuirse a un trastorno del metabolismo de aminoácidos particulares, y la presente invención, en parte, está dirigida a hacer frente a esta necesidad.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de un suplemento de LNAA para tratar a un paciente aquejado de fenilcetonuria y/o de fenilalanemia. En particular, la invención se refiere al uso de un suplemento de LNAA que incluye, por 600 mg de suplemento de LNAA:

de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 290 mg de Tyr;
 de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg de Trp;
 de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg de Met;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de iLeu;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Threo;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Val;
 de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 200 mg de Leu;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de His;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Arg; y
 de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg de Lys.

cuyo suplemento, además, está sustancialmente exento de fenilalanina, para preparar un medicamento para tratar mediante administración enteral a un paciente aquejado de fenilacetoneuria y/o fenilalanemia, por supresión en el paciente del transporte de Phe desde el tracto gastrointestinal (GI) a la sangre, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 100 a 10.000 mg por kg de peso del paciente.

Descripción detallada de la invención

Como se emplea en esta memoria, "suplemento de LNAA" significa que se refiere a una composición que incluye, como mínimo, uno o más aminoácidos neutros grandes (Large Neutral Amino Acid) tales como Phe, Leu, Tyr, Trp, Met, iLeu, Val y Threo. El suplemento de LNAA puede incluir, opcionalmente, otros componentes, tales como aminoácidos básicos (p. ej. Arg, His, Lys, etc.) y/u otros aminoácidos, vitaminas, minerales, aglutinantes, diluyentes, agentes dispersantes, y otros excipientes. De modo ilustrativo, el suplemento de LNAA puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis aminoácidos neutros grandes

El suplemento de LNAA puede estar sustancialmente exento de uno o más de los aminoácidos especificados, como en el caso, por ejemplo, de que el suplemento de LNAA está sustancialmente exento del aminoácido fenilalanina. Como se emplea en este contexto, ha de considerarse que un suplemento de LNAA está sustancialmente exento de un aminoácido Z cuando el aminoácido Z está presente en una cantidad que es menor que 10% (p. ej. menor que aproximadamente 9%, menor que aproximadamente 8%, menor que aproximadamente 7%, menor que aproximadamente 6%, menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 4%, menor que aproximadamente 3%, menor que aproximadamente 2%, y menor que aproximadamente 1%), en peso, del peso total de la totalidad de los aminoácidos neutros grandes presentes en el suplemento de LNAA.

“Tratar” como se emplea en esta memoria, significa que se refiere al tratamiento de la causa directa o indirecta de una afección; al tratamiento de los síntomas de una afección. o a ambas cosas.

“Paciente”, como se emplea en esta memoria, quiere decir que se refiere a un animal, tal como cualquier mamífero, p. ej. ratones, ratas, gatos, conejos, perros, cerdos, caballos y vacas así como primates, tales como seres humanos. Por modo ilustrativo, “paciente”, como se emplea en esta memoria, significa que incluye criaturas humanas, niños humanos, adolescentes humanos, adultos humanos, hombres, mujeres, seres humanos de menos de 2 años de edad aproximadamente, seres humanos de entre, aproximadamente, 2 años de edad y 5 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 5 y aproximadamente 10 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 10 y aproximadamente 18 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 18 y aproximadamente 30 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 30 y aproximadamente 40 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 40 y aproximadamente 50 años de edad, seres humanos de entre, aproximadamente, 50 y aproximadamente 60 años de edad, seres humanos de más de 60 años de edad, aproximadamente, seres humanos aquejados de fenilacetonuria y/o fenilalanemia.

Como se emplea en esta memoria, se entiende que “administración enteral” de una sustancia, se refiere a cualquier administración que suministre la sustancia a una o más partes del tracto gastrointestinal (“GI”), tal como el estómago, el intestino delgado, y el intestino grueso. Por ejemplo, la administración enteral puede llevarse a cabo por vía oral, por ejemplo, mediante ingestión de un comprimido, una cápsula u otra forma farmacéutica sólida, o por ingestión de una solución o suspensión líquida. Adicionalmente o alternativamente, la administración oral puede llevarse a cabo por sonda de alimentación, mediante alimentación forzada, o por otros métodos comunes de administración por vía enteral.

El uso según la invención comprende administrar al paciente por vía enteral, un suplemento de LNAA que incluye, por 600 mg de suplemento de LNAA:

de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 290 mg de Tyr;
 de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg de Trp;
 de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg de Met;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de iLeu;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Threo;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Val;
 de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 200 mg de Leu;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de His;
 de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Arg; y
 de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg de Lys.

Como podrán apreciar los expertos en la técnica, las cantidades de cada aminoácido presente en este suplemento de LNAA pueden variarse dentro de los límites establecidos. Además, como también podrán apreciar los expertos en la técnica, el suplemento de LNAA de este aspecto de la presente invención puede comprender, opcionalmente, uno o más de otros aminoácidos no citados anteriormente en esta memoria, o el suplemento de LNAA de este aspecto de la presente invención puede estar sustancialmente exento de uno o más de otros aminoácidos no citados anteriormente,

El uso de la presente invención anteriormente discutido puede llevarse a cabo mediante cualquier forma adecuada de administración enteral al paciente del suplemento de LNAA. Podrá apreciarse que la cantidad real preferida de suplemento de LNAA que ha de administrarse conforme a la presente invención, puede variar según el aminoácido o aminoácidos neutros grandes que están presentes en el suplemento de LNAA, la naturaleza de los otros componentes presentes en el suplemento de LNAA, y la forma de administración enteral. Muchos factores que pueden modificar la acción del suplemento de LNAA (p.ej. peso del cuerpo, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, afección del paciente, combinaciones de medicamentos, y sensibilidades e intensidades de la reacción) pueden ser tenidos en cuenta por los expertos en la técnica. La administración puede llevarse a cabo de modo continuo o periódicamente dentro de la dosis máxima tolerada. Los grados de administración óptimos para un conjunto dado de afecciones pueden ser determinados por los expertos en la técnica utilizando ensayos convencionales de administración de dosis, tales como los descritos en los ejemplos que figuran más adelante. En breve, la dosificación puede basarse en el nivel de fenilalanina plasmática. Por ejemplo, la dosificación puede basarse en el nivel de fenilalanina plasmática a la 0, 3 y/o 6 horas que siguen a la administración del suplemento de LNAA.

Según la invención, el suplemento de LNAA puede administrarse en una sola dosis oral desde aproximadamente 0,1 g a aproximadamente 10 g por kg de peso del paciente sustancialmente a la hora de comer. Tal como se emplea en esta memoria se entiende que “sustancialmente a la hora de comer” se refiere al período de tiempo desde aproximadamente 4 horas antes de la hora de la comida hasta aproximadamente 1 hora después de la hora de comida, tal como desde aproximadamente 4 horas antes de la hora de comida hasta aproximadamente la hora de comida, desde aproximadamente 3 horas antes de la hora de comida hasta aproximadamente la hora de comida, desde aproximadamente 2 horas antes de la hora de comida hasta aproximadamente la hora de comida, desde aproximadamente 1 hora antes de la hora de comida hasta aproximadamente la hora de la comida, y/o desde aproximadamente 0,5 horas antes de la hora de la comida hasta aproximadamente la hora de la comida. Por ejemplo, el suplemento de LNAA puede ser administrado en una sola dosis oral de aproximadamente 0,2 g a aproximadamente 5 g por kg, tal como de aproximadamente 0,3 g a aproximadamente 3 g por kg, de aproximadamente 0,4 g a aproximadamente 2 g por kg, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 1 g por kg de peso del paciente, sustancialmente a la hora de comer. Alternativamente, el suplemento de LNAA puede ser administrado, por ejemplo, en varias dosis orales espaciadas a lo largo del día (p.ej. administrado cada 2-6 horas). Opcionalmente, el suplemento de LNAA puede ser formulado para proporcionar cesión prolongada de los LNAAs durante un período de tiempo.

El uso de la presente invención tratado anteriormente puede comprender etapas adicionales. A modo ilustrativo, el uso de la presente invención puede incluir, además, restringir la ingestión de fenilalanina de la dieta del paciente. Para los fines de la presente invención, ha de considerarse que la ingestión de fenilalanina de la dieta del paciente está restringida si la dieta del paciente (i) ha sido escogida, en su totalidad o en parte, sobre la base del contenido de fenilalanina, o (ii) si la dieta del paciente contiene una ingesta diaria total de fenilalanina sustancialmente menor (más de 50% menor) que la ingestión diaria total de fenilalanina de la población general. Alternativamente, el uso de la presente invención puede comprender, además, no restringir la ingestión dietética de fenilalanina del paciente. Para los fines de la presente ha de considerarse que la ingestión dietética de fenilalanina del paciente no está restringida si la dieta del paciente contiene una ingesta diaria total de fenilalanina que es sustancialmente la misma (p. ej. más o menos menor que 50%) que la ingesta diaria total de fenilalanina de la población general.

Los ejemplos de los suplementos de LNAA de la presente invención comprenden los descritos anteriormente en la presente memoria con referencia al uso de la presente invención, Estos suplementos de LNAA pueden ser preparados empleando aminoácidos obtenidos de orígenes naturales, o los aminoácidos pueden ser preparados por síntesis por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los suplementos pueden tener cualquier forma farmacéutica adecuada, tal como alguna de las indicadas anteriormente en esta memoria, adecuada para administración enteral, y pueden contener, además de aminoácidos neutros grandes y otros aminoácidos, vitaminas, minerales, excipientes, y similares. Por ejemplo, las formas farmacéuticas adecuadas para administración oral comprenden comprimidos, polvos dispersables, gránulos, cápsulas, suspensiones, jarabes y elixires. Los diluyentes y excipientes inertes de comprimidos incluyen, por ejemplo, carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa y talco. Los comprimidos pueden contener también agentes de granulación y de desintegración, tales como almidón y ácido algínico; agentes aglomerantes tales como almidón, gelatina y goma arábiga; y agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico y talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retardar la desintegración y la absorción. Los diluyentes y excipientes inertes que pueden emplearse en las cápsulas incluyen, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico y caolín. Las cápsulas o los comprimidos que se citan pueden formularse, opcionalmente, para proporcionar una cesión prolongada de los LNAAs a lo largo de un período de tiempo. Las suspensiones, jarabes y elixires pueden contener excipientes convencionales, por ejemplo, metilcelulosa, goma tragacanto, alginato sódico, agentes humectantes tales como lecitina y estearato polioxitilénico, y agentes conservantes tales como p-hidroxibenzoato de metilo.

45 Ejemplos

Ejemplo 1 – La hipótesis

La disponibilidad de aminoácidos en el cerebro está determinada por (i) el aporte plasmático del aminoácido, y (ii) la competición de los aminoácidos suministrados en el plasma por un sitio o sitios de unión comunes de aminoácidos existentes en la proteína transportadora del transportador de aminoácidos neutros de la BBB. Se ha formulado la hipótesis de que la competición de los aminoácidos neutros en un sitio de unión común de la proteína transportadora, en afecciones fisiológicas, es única para el sistema nervioso central (Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia) y que tal competición es la base de la correlación de transporte de la BBB y de trastornos clínicos que afectan al cerebro (p.ej. PKU). Mientras que los estudios anteriores relacionados con la fenilcetonuria se han enfocado sobre el transporte competitivo de LNAAs no Phe a través de la barrera hemática cerebral para suprimir de este modo la entrada de Phe en el cerebro, se ha ignorado el transporte de LNAAs desde el tracto gastrointestinal a la sangre, lo que puede ser un determinante principal del suministro de aminoácidos desde el plasma.

Nueve sistemas de transporte separados han sido identificados en la BBB (Oldendorf, “Measurement of Brain Uptake of Radiolabelled Substances Using a Tritiated Water Internal Standard.” Brain Res. 24(2):372-376 (1970), que se incorpora en esta memoria por referencia). El transporte de un sustrato dado a través de la barrera hemática cerebral, BBB, está caracterizado por su constante de afinidad, K_m . Un valor más bajo de K_m corresponde a una

mayor afinidad para el sitio de unión de la proteína transportadora. Cada sistema de transporte de BBB media el flujo transcápilar de un grupo de sustratos. Por ejemplo, un sistema de transporte media el transporte de LNAAs, otro media la transferencia de hexosas, etc.

5 Tres de los sistemas de transporte de BBB median el transporte de los aminoácidos comunes, con proteínas transportadoras separadas de LNAAs, de aminoácidos básicos y de aminoácidos ácidos. Los valores de la constante de Michaelis, Km, para las tres clases de aminoácidos comunes están expuestos en la Tabla 1 que figura a continuación (Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia).

TABLA 1

Sistema	Aminoácido representativo u otro sustrato	Km (mM)
Aminoácidos neutros	Phe	0,12
Aminoácidos básicos	Lys	0,10
Aminoácidos ácidos	Glu	0,04
Hexosas	Glucosa	9
Hormona tiroidea	T3	0,0011

10 Aún cuando se ha obtenido mucha información cuantitativa sobre los sistemas de transporte de la BBB, se conoce relativamente poco con respecto a la modulación de las proteínas transportadoras. Podría esperarse que la inducción o represión de la actividad del transportador relativa al desarrollo o trastorno, influyera fuertemente en los caminos del metabolismo cerebral, que están limitados por la disponibilidad de precursores.

15 Los valores de Km, absolutos y aparentes, de los aminoácidos neutros en la BBB han sido determinados experimentalmente (Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia.) El valor absoluto de Km es el valor de Km en ausencia de competición con otros aminoácidos neutros por el sitio de unión existente en la proteína transportadora de LNAA. La "Km aparente" es el valor de Km en presencia de otros LNAAs que compiten por el sitio de unión existente en la proteína transportadora de LNAA. El valor de la Km aparente ("Km(app)") de un aminoácido dado se calcula a partir del valor de la Km absoluta y de la suma de las razones del nivel plasmático de cada LNAA dividido por su valor Km, como indica la Ecuación 1 que sigue.

20
$$Km(app) = Km (1 + \sum[aa] / Km) \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Los valores experimentales de la Km(app) para el sistema de transporte de LNAA en la BBB están expuestos en la Tabla 2 que figura seguidamente (Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia)

TABLA 2

Aminoácido	Nivel plasmático típico (mM)	Km (mM)	Km (app) (mM)
LNAAs			
Phe	0,05	0,12	0,45
Leu	0,19	0,15	0,53
Tyr	0,09	0,16	0,58
Trp	0,10	0,19	0,71
Met	0,04	0,19	0,77
iLeu	0,07	0,33	1,3
Val	0,14	0,63	2,5
Threo	0,19	0,73	3,0
aa's básicos			
His	0,05	0,28	1,1
Arg	0,10	0,09	0,40
Lys	0,30	0,10	0,25

25 La Ecuación 1 predice que, si el nivel plasmático de un LNAA es mucho menor que el valor de su Km, tal aminoácido no podrá competir eficazmente por el sitio de unión de la proteína transportadora. La Km para la unión de LNAAs a proteínas transportadoras en órganos distintos del cerebro, es 5-10 mM (véase la Tabla 3), que es 50-100 veces mayor que la concentración plasmática fisiológica de LNAAs. La Ecuación 1 predice que no tendrán lugar efectos de competición importantes, en afecciones fisiológicas normales, in vivo, de los LNAAs en tejidos diferentes del cerebro. Sin embargo, ha sido demostrada competición en tejidos periféricos *in vitro* en concentraciones plasmáticas de aminoácidos de 5-50 M. A partir de estas observaciones, el solicitante supuso que niveles altos de suplementos de aminoácidos no Phe podrían competir posiblemente con Phe en el transportador del tracto GI.

30

35 Valores experimentales para Km del transporte en el epitelio intestinal, están presentados en la Tabla 3 que figura a continuación (Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia).

TABLA 3

Aminoácido	Km (mM) del epitelio intestinal
Phe	1
Leu	2
Met	5
His	6
Val	3

Puesto que los LNAAs están asociados con diversos trastornos clínicos, y dado que los LNAAs penetran en el cerebro por medio del transportador de LNAAs de la BBB, la eliminación de estos aminoácidos del cerebro está sometida a los efectos de la competición anteriormente mencionada. Ya que la Phe posee una afinidad relativamente alta para el transportador de LNAAs (Tabla 1), y puesto que los niveles plasmáticos de Phe están sumamente elevados en la fenilcetonuria, la fenilcetonuria da por resultado la saturación por Phe de los sitios de unión de la proteína transportadora de la BBB y, por tanto, niveles excesivos de Phe en el cerebro y niveles disminuidos de los otros LNAAs en el cerebro (Pardridge, "Blood-Brain Barrier Carrier-Mediated Transport and Brain Metabolism of Amino Acids." Neurochem. Res. 23:635-644 (1998), que se incorpora en esta memoria por referencia).

Por tanto se supuso que la suplementación con LNAAs no Phe podría competir eficazmente con la Phe en el sistema de transporte de la BBB, reduciendo el transporte de Phe al cerebro y aumentando el transporte de los otros LNAAs, moderando, por consiguiente, los síntomas de PKU (Andersen et al., "Lowering Brain Phe Levels by Giving Other LNAAs," Arch. Neurol., 33(10):684-686 (1976) y Kaufman, "Phenylketonuria Biochemical Mechanisms." páginas 1-132 en Advances in Neurochemistry, Agranoff et al., compiladores, Nueva York: Plenum Press (1977), que se incorporan en esta memoria por referencia). Para reducir la entrada de Phe en el cerebro, se administró un suplemento de aminoácidos neutros de cadena ramificada que comprendía valina, isoleucina y leucina, a pacientes mayores aquejados de PKU (Berry, que se incorpora en esta memoria por referencia), quien ha indicado una mejoría importante en déficits de comportamiento. Kaufman ha propuesto que la adición de los precursores de neurotransmisores, tirosina y triptófano, al suplemento de Berry, podría conducir a una mejoría adicional (Kaufman, que se incorpora en esta memoria por referencia).

Esta hipótesis fue ensayada experimentalmente por medida cuantitativa mediante NMR de los niveles de Phe en el cerebro de pacientes aquejados de PKU durante enfrentamiento oral con Phe (0,1 g/kg) con y sin suplementación con 0,15 g/kg de LNAAs no Phe (Pietz et al., "Large Neutral Amino Acids Block Phenylalanine Transport into Brain Tissue in Patients with Phenylketonuria." J. Clin. Invest., 103(8):1169-1178 (1999) ("Pietz") que se incorpora en esta memoria por referencia). El suplemento de LNAAs contenía valina, metionina, isoleucina, tirosina, histidina y triptófano. El nivel plasmático de Phe de la línea de base era 1 mM y el nivel de Phe en el cerebro 0,25 mM. Sin la suplementación con LNAAs, Pietz, cuya referencia se incorpora en esta memoria por referencia, observó el aumento de Phe en el cerebro a 0,4 mM después de enfrentamiento con Phe, acompañado de actividad cerebral alterada de un EEG. Sin embargo, con la suplementación de LNAAs concurrente, la entrada de Phe en el cerebro se había bloqueado completamente y no había alteración de la actividad manifestada en un electroencefalograma (EEG). Estos estudios de investigación llevaron a Nilab a desarrollar Prekuniil, un suplemento comercial de LNAAs utilizado para el tratamiento de PKU.

35 Ejemplo 2 . Formulación de suplementos de LNAAs

Como se ha indicado anteriormente, el presente inventor supuso que un suplemento dietético de LNAAs destinado tanto para competir con el transporte de Phe desde el tracto GI a la sangre, como para suprimirlo, y para competir con el transporte de Phe desde la sangre, a través de la BBB, al cerebro, y suprimirlo, podría emplearse como tratamiento de la PKU. Más particularmente, se supuso que la administración oral del suplemento de LNAAs en cada comida podría suprimir el transporte de Phe desde el tracto GI a la sangre, por lo que el sistema transportador de BBB no se vería afectado en exceso por los altos niveles de Phe típicamente presentes en la sangre de un paciente aquejado de PKU.

Como ilustra la Ecuación 1, el término $[(aa)/Km]$ de cada aminoácido representa la capacidad de un aminoácido para competir con la fenilalanina en un sitio de unión de la proteína transportadora. Como se aprecia en la Tabla 1, Leu, Tyr, Trp y Met son LNAAs que podrían competir eficazmente con Phe en la proteína transportadora de la BBB.

Aun cuando poco trabajo se ha llevado a cabo para caracterizar la afinidad de los LNAAs para el sitio de unión de la proteína transportadora en el tracto GI, una medida *in vitro* de la inhibición por LNAAs del transporte de Phe en células epiteliales intestinales humanas (Hidalgo et al., "Transport of a Large Neutral Amino Acid (Phenylalanine) in a Human Intestinal Epithelial Cell Line: Caco-2" Biochim. Biophys. Acta, 1028:25-30 (1990) ("Hidalgo"), que se incorpora en esta memoria por referencia) indicó que la Leu era un inhibidor potente e, interesantemente, que LNAAs y aminoácidos básicos ponían de manifiesto compartir un sitio de unión de una proteína transportadora de las células intestinales, mostrando la Lys una fuerte inhibición del transporte de Phe. La Tabla 4 expone los resultados de experimentos realizados para determinar la inhibición por aminoácidos del transporte de Phe en las

células Caco-2, en cuyos experimentos se aplicó Phe, 10 μ M, en el seno de solución tampón, a monocapas, en presencia de una concentración 1 mM de cada aminoácido y se determinó la razón del transporte de Phe a través de la monocapa con respecto al producido en ausencia del aminoácido en competición.

TABLA 4

5

Inhibidor	% de inhibición
LNAAAs	
Leu	55%
Tyr	45%
Trp	36%
Aminoácidos básicos	
Lys	50%
His	33%

Puede observarse que el valor de Km para la fenilalanina en el sistema de transporte de las células intestinales medido por el método de Hidalgo, que se incorpora en esta memoria por referencia, resultó ser 0,56 mM, próximo al valor de 1 mM indicado por el método de Pardridge, que se incorpora en esta memoria por referencia. Puede apreciarse también que la variación de Km entre diferentes LNAAAs en el epitelio intestinal (Tabla 3) es mayor que en la BBB. Por ejemplo, la razón de valores de Km para Phe/Leu/Me en el epitelio intestinal es 1/2/5, mientras que en la BBB es 1/1,25/1,58.

El suplemento de LNAA empleado actualmente para el tratamiento de PKU es el del preparado Prekunil, cuya composición, basada en el conjunto de aminoácidos de la leche humana, se expone en la Tabla 5. Basándose en las observaciones de inhibición del transporte de Phe en células Caco-2 (Hidalgo, que se incorpora en esta memoria por referencia), el inventor de la presente invención ha diseñado suplementos alternativos (expuestos, asimismo, en la Tabla 5 como SuppM1 y SuppM2) en los que los niveles de Leu y Lys del Prekunil habían sido aumentados significativamente. Se opina que el aumento de Leu suprime aun más el transporte de Phe desde el tracto GI a la sangre, y desde la sangre al cerebro. Se opina que el aumento de Lys suprime adicionalmente el transporte de Phe desde el tracto GI a la sangre.

TABLA 5

Aminoácido	Prekunil		SuppM1		SuppM2	
	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)	(mg)	(mmol)
L-Tyr	194,1	1,07	194,1	1,07	195	1,08
L-Trp	61,1	0,30	61,1	0,30	51	0,25
L-Met	49,7	0,33	49,7	0,33	32	0,21
L-iLeu	31,5	0,24	31,5	0,24	35	0,22
L-Threo	32,8	0,28	32,8	0,28	32	0,27
L-Val	32	0,27	32	0,27	35	0,30
L-Leu	30	0,24	130	1,00	80	0,61
L-His	31,3	0,20	31,3	0,20	20	0,13
L-Arg	34	0,20	34	0,20	0	0
L-Lys	0	0	0	0	20	0,14
Aminoácido total	496,5	3,13	596,5	3,89	500	3,21
FOM-Km(app) para Phe		18,3		23,4		19,95

Dado que el término $[\Sigma(aa)/Km \text{ de cada aa}]$ de la Ecuación 1 expresa el grado en que cada aminoácido de un suplemento compite con la fenilalanina en un sistema transportador dado, y puesto que la Km de Phe ha sido medida en el sistema de transporte de la BBB, puede expresarse una cifra de mérito para la Km aparente de Phe en presencia de cada uno de los suplementos de aminoácidos de la Tabla 5, sumando las razones del número de milimoles de cada aminoácido existente en cada suplemento, dividido por su Km. Esta "cifra de mérito" (a la que se hace referencia también en esta memoria como "FOM") es una aproximación de "primer orden" al grado en que el suplemento puede suprimir la transferencia de Phe desde el plasma hasta el cerebro, e indica que los suplementos de la presente invención serían 28% (SuppM1) y 9% (SuppM2) más eficaces en la supresión del transporte de Phe desde el plasma hasta el cerebro, que el Prekunil. No obstante, puede apreciarse que el suplemento SuppM2 está destinado a optimizar la competición con Phe en el transportador del tracto Gi, con solamente una pequeña mejoría de FOM-Km(app) para competir con Phe en el transportador de la BBB.

Los valores de Km de LNAAAs no Phe en el sistema transportador del tracto GI, no son conocidos para todos los LNAAAs no Phe (Tabla 3) y, por tanto, no pueden calcularse términos de competición similares para los suplementos de la presente invención. Sin embargo, bajo la hipótesis actual, los resultados obtenidos con el método de Hidalgo

en la células Caco-2, que se incorpora en esta memoria por referencia, cuyos resultados están expuestos en la Tabla 4, sugieren que Leu y Lys serían eficaces para suprimir el transporte de Phe desde el tracto GI hasta el cerebro. Así pues, el aumento de un suplemento tal como el Prekunil con leucina y lisina adicionales, como en el caso del suplemento SppM2, aumentaría la competición con Phe en el transportador del GI, reduciendo el aporte de la Phe plasmática a la BBB.

5

Ejemplo 3 – Efecto de Prekunil, SuppM1 y SuppM2 sobre los niveles plasmáticos de Phe en el ratón

Los suplementos SuppM1 y SuppM2 fueron administrados a ratones con PKU, genotipo ENU 2/2 con características de PKU clásica, en dosis orales solas de 0,5 g/kg, y se determinaron los niveles plasmáticos de Phe a las 0, 3, 6 y 24 horas después de administrar las dosis. Ha de apreciarse que 0,5 g/kg es una dosis relativamente baja de suplemento, ya que el Prekunil se administra típicamente a 1 g/kg. Es sabido que los suplementos de LNAA suprimen, típicamente, niveles plasmáticos de fenilalanina durante varias horas después de la ingestión, con el efecto posterior de disminución, de modo que puede necesitarse dosificación en cada comida. Por consiguiente, se tomó el valor de la fenilalanina a las 6 horas como indicador del grado en que la acumulación de fenilalanina había sido suprimida.

10

Los resultados obtenidos de un solo ratón (P448), que no había recibido suplemento alguno, de un solo ratón (P455), al que se había administrado la dosis del suplemento comercial Prekunil, de un solo ratón (P430), al que se había administrado Prekunil reforzado con 35 mg de Leu, de dos ratones (P456 y P259) a los que se había administrado Prekunil más 100 mg de Leu (es decir, el SuppM1), y de dos ratones (P433 y P472), a los que se había administrado el suplemento SuppM2, se indican en la Tabla 6 que sigue. Más particularmente, la Tabla 6 expone los niveles plasmáticos de Phe (mg/dl) de ratones a los que se había administrado suplementos de LNAA (0,5 g/kg, una sola dosis), a las 0, 3, 6 y 24 horas después de administrar la dosis.

15

20

TABLA 6

Tiempo (horas)	Control	Prekunil	Prekunil + 35 mg Leu	Prekunil+100 mg Leu (SuppM1)		SuppM2	
	P448	P455	P430	P456	P259	P433	P482
0	33,20	27,14	27,23	25,37	27,22	18,69	21,10
3	30,91	24,23	26,02	23,20	25,57	14,63	16,86
6	28,91	22,17	25,21	17,49	19,02	13,68	15,39
24	30,14	20,89	27,13	20,88	21,42	20,06	23,78

El refuerzo del suplemento Prekunil con 100 mg de Leu (SuppM1), un aminoácido que podría competir eficazmente con Phe por los sitios de unión de proteínas transportadoras tanto del epitelio intestinal como de la BBB, tuvo el efecto, por tanto, de una supresión importante del nivel plasmático de Phe. Mientras que el propio Prekunil produjo una reducción de 20% de Phe, el suplemento SuppM1 había producido en ambos ratones tratados una reducción de 30% de la Phe plasmática a las 6 horas después de administrar la dosis. El refuerzo del suplemento con leucina y lisina, ambos, para hacer diana en el transportador del GI, como en SuppM2, produjo una reducción de 70% de la Phe plasmática al cabo de 6 horas después de administrar la dosis, para ambos ratones tratados. La excelente supresión de Phe del suplemento SuppM2 es indicativa de su capacidad para competir con el transporte de Phe en el transportador del GI, más eficazmente que los otros suplementos, al tiempo que mantiene la aptitud de competir similarmente en el transportador de la BBB.

25

30

El análisis de la tirosina plasmática en los ratones a los que se había suministrado SuppM2, indicó niveles estables de 0,58-0,50 mg/dl y de 0,44-0,40 mg/dl de tirosina en el experimento de 24 horas, para los ratones P433 y P482, respectivamente.

35

Podrá apreciarse que el SuppM1 y el SuppM2 pueden no representar composiciones óptimas de suplementos de LNAA para el tratamiento de PKU. Por ejemplo, los suplementos de LNAA pueden ser modificados para mantener los niveles requeridos en el cerebro de aminoácidos precursores de neurotransmisores, tales como tirosina y triptófano, al tiempo que mejoran la competición del suplemento con la Phe en el transportador del tracto GI, y mantener la competición del suplemento con la Phe en el transportador de la BBB.

40

Ejemplo 4 – Formulación de un suplemento adicional de LNAA

La formulación de un suplemento adicional, denominado SuppM3, se expone en la Tabla 7. Esta formulación de un suplemento ilustra, además, las composiciones y métodos de la presente invención.

45

TABLA 7

Aminoácido	SuppM3 (mg)
L-Tyr	195,0
L-Trp	51,0
L-Met	32,0
L-iLeu	35,0
L-Threo	32,0
L-Val	35,0
L-Leu	130,0
L-His	30,0
L-Arg	30,0
L-Lys	30,0
Aminoácido total	600,0

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un suplemento de LNAA que comprende por 600 mg de suplemento de LNAA

de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 290 mg de Tyr;
de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg de Trp;
de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg de Met;
de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de iLeu;
de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Threo;
de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Val;
de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 200 mg de Leu;
de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 45 mg de His;
de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg de Arg; y
de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg de Lys,

cuyo suplemento, además, está sustancialmente exento de fenilalanina, para preparar un medicamento para tratar mediante administración enteral a un paciente aquejado de fenilcetonuria y/o fenilalanemia, por supresión en el paciente del transporte de Phe desde el tracto gastrointestinal a la sangre, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 100 a 10.000 mg por kg de peso del paciente.

2.- Uso según la reivindicación 1, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 200 a 10.000 mg por kg de peso del paciente.

3.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 500 a 10.000 mg por kg de peso del paciente.

4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 200 a 2000 mg por kg de peso del paciente.

5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el suplemento se administra en una sola dosis oral de 500 a 1000 mg por kg de peso del paciente.

6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el medicamento se administra sustancialmente a la hora de comer.

7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el medicamento comprende vitaminas, minerales y excipientes.

8.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medicamento es una forma farmacéutica adecuada para administración oral.

9.- Uso según la reivindicación 8, en donde el medicamento es un comprimido, un polvo dispersable, gránulos, una cápsula, una suspensión, un jarabe o un elixir.