

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 549**

51 Int. Cl.:

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 09013613 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2153870**

54 Título: **Composiciones que comprenden ornitina y fenilacetato o fenilbutirato para tratar encefalopatía hepática**

30 Prioridad:

**26.11.2004 GB 0426141**

**26.11.2004 GB 0426142**

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

**14.03.2014**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)  
THE NETWORK BUILDING 97 TOTTENHAM  
COURT ROAD  
LONDON, W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**JALAN, RAJIV y  
JALAN, KAMAL NAYAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 448 549 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 que comprenden ornitina y fenilacetato o fenilbutirato para tratar encefalopatía hepática

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que son útiles en la prevención o tratamiento de descompensación hepática o encefalopatía hepática.

10 **Antecedentes de la invención**

La hepatopatía crónica se caracteriza por la destrucción gradual del tejido hepático a lo largo del tiempo, con lo que el tejido hepático sano y que se regenera es sustituido lentamente por tejido cicatricial y necrótico. Esto se conoce como cirrosis hepática. La función hepática normal es alterada y el tejido cicatricial reduce progresivamente el flujo sanguíneo a través del hígado. A medida que el tejido hepático regenerante normal se pierde, los nutrientes, hormonas, fármacos y toxinas ya no se procesan de forma eficaz.

Esto puede dar como resultado síntomas incluyendo eliminación anormal de proteínas absorbidas a través del tracto intestinal, que conduce a la acumulación de amoniaco; excreción anormal, que conduce a una acumulación de bilirrubina en la sangre, produciendo ictericia; un aumento de la presión sinusoidal, que conduce a la acumulación de fluido en el abdomen (ascitis); e hipertensión portal (y derivación portosistémica) en la que el tejido hepático cicatricial actúa como barrera para el flujo sanguíneo, lo que conduce a un aumento de la presión sanguínea portal y a varices esofágicas.

Los pacientes con hepatopatía crónica pueden estar en un estado clínico bastante estable y mostrar pocos o ningún síntoma. Sin embargo, dichos pacientes corren el riesgo de un brusco deterioro de su estado que puede conducir a fallo hepático de agudo a crónico. Esta transición desde un estado "compensado", donde el hígado es capaz de funcionar, aunque a un nivel reducido, hasta un estado "descompensado", donde la función hepática falla, implica el efecto de eventos desencadenantes. Los eventos desencadenantes asociados con la hepatopatía crónica incluyen hemorragia gastrointestinal, infección (sepsis), trombosis de la vena porta y deshidratación.

Por ejemplo, el 50% de los pacientes con cirrosis hepática tienen varices esofágicas y, en un tercio de estos pacientes, las varices esofágicas estallarán y causarán hemorragia gastrointestinal en un plazo de dos años desde el diagnóstico (Grace ND (1992) Gastroenterol Clin North Am 21: 149-161). Se sabe que una hemorragia gastrointestinal superior aumenta la susceptibilidad a complicaciones potencialmente letales tales como peritonitis bacteriana, sepsis, fallo renal y encefalopatía hepática (Teran et al. (1997) Gastroenterology 112: 473-482; Garden et al. (1985) Br J Surg 72: 91-95; Pauwels et al. (1996) Hepatology 24: 802-806; Bleichner et al. (1986) Br J Surg 73: 724-726) dando como resultado la muerte de aproximadamente el 30% de los pacientes a pesar del adecuado control de la hemorragia (Grace 1992 *supra*).

La encefalopatía hepática (HE) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo que se produce en diversas situaciones clínicas tales como hepatopatía aguda o crónica y derivación venosa portosistémica espontánea. En las fases tempranas de la encefalopatía hepática se producen sutiles cambios mentales tales como mala concentración, confusión y desorientación. En casos graves, la encefalopatía hepática puede conducir a estupor, coma, hinchazón cerebral (edema cerebral) y muerte. En el caso de pacientes que desarrollan HE como resultado de hepatopatía crónica, el inicio de HE es a menudo el resultado de un evento desencadenante clínico tal como hemorragia gastrointestinal, sepsis (infección), trombosis de la vena porta o deshidratación.

La hemorragia gastrointestinal y la derivación portosistémica permiten que las sustancias tóxicas, que habitualmente son metabolizadas por el hígado, eviten el hígado, entren en la circulación sistémica y crucen la barrera hematoencefálica para ejercer efectos neurotóxicos directos o indirectos sobre el sistema nervioso central. Se piensa que la acumulación de amoniaco desempeña un papel importante en el avance de la encefalopatía hepática y el fallo multiorgánico (fallo respiratorio, fallo cardiovascular, fallo renal). Además del amoniaco, también es probable que la septicemia (o peritonitis bacteriana) que se desarrolla muy pronto después de una hemorragia gastrointestinal sea un factor que contribuya a la encefalopatía hepática.

La descompensación hepática puede conducir a continuación a fallo multiorgánico y encefalopatía hepática. En las fases tempranas de la encefalopatía hepática, se producen sutiles cambios mentales tales como mala capacidad de concentración o la incapacidad de construir objetos sencillos. En los casos graves, la encefalopatía hepática puede conducir a estupor, coma, edema cerebral y muerte.

El pronóstico para pacientes con hepatopatía crónica es difícil de estimar puesto que la afección tiene muchas causas. Las medidas preventivas para minimizar el avance del estado compensado al estado descompensado incluyen evitar agentes causantes adicionales que empeorarán la afección, tales como la completa abstinencia del alcohol y la vacunación contra hepatitis A y B.

Sin embargo, una vez que se produce la descompensación hepática, las posibilidades de supervivencia son reducidas y el trasplante de hígado es el único tratamiento que puede prolongar la vida. Puesto que es la descompensación hepática la que conduce a una esperanza de vida reducida, es altamente deseable evitar que se produzca la descompensación hepática.

5 Una terapia común para pacientes con encefalopatía hepática implica estrategias para reducir la concentración de amoniaco. Éstas incluyen restricción de la ingesta de proteínas en la dieta; administración de lactulosa, neomicina, L-aspartato de L-ornitina (LOLA), o benzoato sódico; y enemas limpiadores.

10 El documento US 2003/195255 describe fenilbutirato para su uso en el tratamiento de encefalopatías hepáticas crónicas. El documento WO 03/045372 describe formulaciones que comprenden riboflavina, efectores del ciclo de la urea y los aminoácidos alanina, glicina, serina, taurina, treonina y valina para su uso en la reducción de alteraciones tóxicas, nutricionales y metabólicas asociadas con cáncer y quimioterapia del cáncer. El documento CN-A-1383815 presenta composiciones que comprenden ornitina y ácido asparágico para su uso en el tratamiento de hepatitis aguda, hepatitis crónica y encefalopatía hepática. El documento US 4.228.099 describe compuestos preparados haciendo reaccionar ornitina o arginina con alfa ceto análogos de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.

20 El documento Iyer et al (2002) Mol Cell Biol 22: 4491-4498 describe ratones knockout para arginasa hepática. Se describe que esos ratones knockout muestran graves síntomas de hiperamonemia.

### Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere al uso de ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato para prevenir o tratar descompensación hepática o encefalopatía hepática (HE) en pacientes. También puede administrarse isoleucina a aquellos pacientes que tienen además una deficiencia de isoleucina atribuible, por ejemplo a hemorragia gastrointestinal. Por consiguiente, la invención proporciona:

30 una composición farmacéutica para administración a un ser humano, que comprende ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato en una proporción en peso de 2:1 a 1:2;  
una composición farmacéutica para administración a un ser humano, que está constituida por ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato en una proporción en peso de 2:1 a 1:2.

### Breve descripción de las Figuras

35 La Figura 1 muestra que la función de neutrófilos está alterada en pacientes con cirrosis y empeora al aumentar la gravedad de la hepatopatía.  
La Figura 2 muestra que el amoniaco reduce la fagocitosis de neutrófilos.  
La Figura 3 muestra que el amoniaco reduce la quimiotaxis de neutrófilos.  
40 La Figura 4 muestra que el efecto de amoniaco sobre la fagocitosis de neutrófilos puede invertirse mediante intervenciones.  
La Figura 5 muestra que una hemorragia gastrointestinal simulada reduce la quimiotaxis de neutrófilos que puede invertirse parcialmente mediante administración de isoleucina.  
La Figura 6 muestra que una hemorragia simulada reduce la síntesis de proteínas y estimula la oxidación de  
45 isoleucina de forma inapropiada.  
La Figura 7 muestra que la administración de isoleucina durante una hemorragia simulada potencia la síntesis de proteínas pero no reduce la concentración de amoniaco.  
La Figura 8 muestra que la administración con LOLA reduce la concentración de amoniaco pero permite que el amoniaco se regenere.  
50 La Figura 9 muestra que la retirada activa de glutamina previene un aumento secundario de la concentración de amoniaco.  
La Figura 10 muestra que el fenilacetato se une a glutamina para formar un compuesto excretable y previene el aumento secundario de amoniaco.  
La Figura 11 muestra el efecto de ornitina y fenilbutirato sobre los niveles de amoniaco en pacientes con cirrosis  
55 avanzada.  
La Figura 12 muestra el efecto de ornitina y fenilbutirato sobre los niveles de glutamina en pacientes con cirrosis avanzada.  
La Figura 13 muestra los cambios del estado mental de pacientes tratados con placebo, O, P u O+P.  
La Figura 14 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de amoniaco en pacientes  
60 con cirrosis avanzada.  
La Figura 15 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de glutamina en pacientes con cirrosis avanzada.  
La Figura 16 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de glicina en pacientes con cirrosis avanzada.  
65 La Figura 17 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de isoleucina en pacientes con cirrosis avanzada.

La Figura 18 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de ornitina en pacientes con cirrosis avanzada.

La Figura 19 muestra el efecto de ornitina y fenilbutirato sobre el amoniaco arterial en el modelo de rata con el conducto biliar ligado.

5 La Figura 20 muestra el efecto de ornitina y fenilbutirato sobre la ornitina en plasma en el modelo de rata con el conducto biliar ligado.

La Figura 21 muestra el efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina sobre los niveles de amoniaco en plasma arterial en un el modelo de rata con fallo hepático agudo hiperamoniémico.

10 La Figura 22 muestra el leve aumento de amoniaco arterial en el modelo en cerdo desvascularizado de fallo hepático agudo con tratamiento con OP.

La Figura 23 muestra que el amoniaco está siendo captado desde la sangre por el músculo en los animales tratados con O y OP (se tomaron muestras de la vena-arteria femoral). Por el contrario, los animales tratados con placebo y P en solitario muestran un aumento de la producción de amoniaco por el músculo.

15 La Figura 24 muestra que el amoniaco es producido por el intestino en todos los animales excepto el animal tratado con OP (se tomaron muestras de la víscera drenada por la vena porta-arteria).

La Figura 25 muestra que la liberación de glutamina por el músculo es aumentada por O pero no por P usado de forma aislada. OP causaba una liberación marcadamente mayor de glutamina del músculo (atrapando de este modo amoniaco en forma de glutamina en el músculo).

20 La Figura 26 muestra que la captación de glutamina en el intestino es potenciada por O, pero reducida por OP (reduciendo de este modo la generación de amoniaco en el intestino).

La Figura 27 muestra que los niveles de ornitina arterial aumentan en los dos animales (grupos de O en solitario y OP) a lo que ésta se administra.

La Figura 28 muestra que los niveles de glutamina arterial aumentan con O, pero menos con OP.

25 La Figura 29 muestra que la combinación de OP previene el aumento del aminoácido amoniogénico glicina.

La Figura 30 muestra que la ornitina en solitario causaba un aumento del agua cerebral, el fenilacetato inducía una pequeño reducción del agua cerebral, mientras que, en combinación, estos agentes producen una reducción sustancial del agua cerebral (% de control).

### 30 Descripción detallada de la invención

En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de forma inclusiva. Esto es, estas palabras pretenden conllevar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no mencionados específicamente, donde el contexto lo permita.

35 Las composiciones de la presente invención pueden usarse para el tratamiento temprano de pacientes con hepatopatía, antes del desarrollo de descompensación hepática y, por lo tanto, antes de que se haya producido la encefalopatía hepática, para prevenir o retrasar el inicio de la descompensación hepática. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de encefalopatía hepática reduciendo de forma eficaz la concentración de amoniaco y manteniendo la función de neutrófilos.

#### Sujetos a tratar

45 Las composiciones de la presente invención pueden usarse para la prevención o tratamiento de descompensación hepática o encefalopatía hepática. El hígado del sujeto puede estar, por lo tanto, en el estado compensado. El sujeto puede tener hepatopatía crónica. El sujeto puede tener cirrosis hepática. El sujeto puede tener fallo hepático agudo. El sujeto a tratar puede tener encefalopatía hepática.

50 El inicio de hepatopatía tanto aguda como crónica puede deberse a una causa xenobiótica. Por ejemplo, el sujeto puede haber estado expuesto a un producto químico, fármaco o algún otro agente que causa daño hepático. El sujeto puede tener una reacción a un fármaco sin receta, preceptivo o "recreativo" que causa daño hepático. El sujeto puede haber estado tomando Rezulin™ (troglitazona; Parke-Davis), Serzoner™ (nefazodona; Bristol-Myers Squibb) u otros fármacos que se piensa que causan daño hepático. El sujeto puede ser uno que ha sufrido una sobredosis de un fármaco particular o ha superado la dosificación recomendada de un fármaco capaz de causar daño hepático. Por ejemplo, el sujeto puede haber tomado una sobredosis de paracetamol. El sujeto puede haber estado expuesto a productos químicos que pueden causar daño hepático tales como, por ejemplo, en su lugar de trabajo. Por ejemplo, el sujeto puede haber estado expuesto a dichos productos químicos en un contexto industrial o agrícola. El sujeto puede haber consumido plantas que contienen compuestos que pueden causar daño hepático, en particular éste puede ser el caso cuando el sujeto es un animal, tal como un herbívoro. Por ejemplo, el sujeto puede haber consumido una planta que contiene alcaloide de pirrolizidina tal como senecio. El sujeto puede haber estado expuesto a toxinas ambientales que se piensa que causan hepatopatía.

65 La toxicidad hepática relacionada con fármacos comprende más del 50% de todos los casos con hepatopatía aguda (fallo hepático agudo). La toxicidad por acetaminofeno (también conocido como paracetamol y N-acetil-p-aminofenol) es la causa más común de fallo hepático agudo en los Estados Unidos y Gran Bretaña. Los consumidores a largo plazo de cantidades moderadas a abusivas de alcohol que toman acetaminofeno en dosis terapéuticas o

modestamente excesivas corren el riesgo de lesión hepática aguda y posiblemente fallo hepático agudo. El consumo de alcohol potencia los efectos tóxicos de acetaminofeno. La toxicidad idiosincrática del fármaco también contribuye al fallo hepático agudo. Se piensa que la toxicidad idiosincrática del fármaco es una respuesta de hipersensibilidad en la que el sujeto responde a un fármaco de una manera farmacológicamente anormal. Esta respuesta anormal puede conducir a fallo hepático agudo.

El fallo hepático agudo o hepatopatía crónica puede estar causado por infección por un organismo patógeno. Por ejemplo, la hepatopatía puede deberse a infección vírica. En particular, el sujeto puede estar infectado, o haber estado infectado, por un virus que causa hepatitis. El sujeto puede tener hepatitis vírica crónica. El virus puede ser, por ejemplo, virus de la hepatitis B, C o D. En algunos casos, y en particular cuando el sujeto tiene hepatitis vírica, el sujeto también puede estar infectado con VIH-I o II. El sujeto puede tener SIDA. Es posible que el sujeto pueda haber estado, o esté, infectado por otros organismos que causan hepatopatía y en particular aquellos que están presentes en el hígado durante alguna fase de su ciclo vital. Por ejemplo, el sujeto puede tener, o haber tenido, fasciola hepática.

El sujeto puede tener una enfermedad heredada que causa, o aumenta el riesgo de, hepatopatía crónica. Por ejemplo, el sujeto puede tener una o más de hemocromatosis hepática, enfermedad de Wilson o una deficiencia de  $\alpha$ -1-antitripsina. El sujeto puede tener un trastorno heredado que causa algún tipo de anomalía estructural o funcional en el hígado que aumenta la probabilidad de fibrosis hepática. El sujeto puede estar predispuesto genéticamente a desarrollar un trastorno autoinmune que daña al hígado y, por lo tanto, que puede contribuir a la fibrosis hepática.

La hepatopatía crónica puede estar inducida por el alcohol. Un hombre o mujer a tratar puede ser, o haber sido, un alcohólico/a. El o ella puede consumir, o haber estado consumiendo de media 50 o más unidades de alcohol a la semana, 60 o más unidades de alcohol a la semana, 75 o más unidades de alcohol a la semana e incluso 100 o más unidades de alcohol a la semana. El hombre o mujer puede consumir, o haber estado consumiendo de media hasta 100 unidades de alcohol a la semana, hasta 150 unidades de alcohol a la semana e incluso hasta 200 unidades de alcohol a la semana. La medición de una unidad de alcohol difiere de un país a otro país. En este documento, una unidad equivale a 8 gramos de etanol de acuerdo con el patrón del Reino Unido.

El hombre o mujer puede haber estado consumiendo dichos niveles de alcohol durante 5 o más años, 10 o más años, 15 o más años o 20 o más años. El sujeto puede haber estado consumiendo dichos niveles de alcohol durante hasta 10 años, hasta 20 años, hasta 30 años e incluso hasta 40 años. En casos de cirrosis hepática inducida por alcohol, el sujeto puede ser adulto, por ejemplo, de 25 años o más, 35 años o más, 45 años o más e incluso por encima de 60 años.

El sujeto puede ser hombre o mujer. Las mujeres pueden ser más susceptibles a los efectos adversos del alcohol que los hombres. Las mujeres pueden desarrollar hepatopatía crónica alcohólica en un marco temporal más corto y a partir de cantidades más pequeñas de alcohol que los hombres. No parece haber un único factor que explique la mayor susceptibilidad al daño hepático alcohólico en las mujeres, pero el efecto de las hormonas sobre el metabolismo del alcohol puede desempeñar un importante papel.

El sujeto puede tener una o más de varias otras afecciones que se sabe que dan como resultado daño hepático tales como, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica autoinmune, y/o esquistosomiasis (infección parasitaria). El sujeto puede tener o haber tenido un bloqueo del conducto biliar. En algunos casos, la causa subyacente de la hepatopatía crónica puede ser desconocida. Por ejemplo al sujeto se le puede haber diagnosticado que tiene cirrosis criptogénica. El sujeto puede ser sospechoso de tener cualquiera de las afecciones enumeradas en este documento.

Los métodos para diagnosticar hepatopatía crónica, fallo hepático agudo y encefalopatía hepática se conocen bien en la técnica y, en particular, por facultativos y veterinarios en este campo. Preferiblemente, al sujeto se le habrá diagnosticado que tiene una hepatopatía y encefalopatía hepática, por ejemplo por un profesional médico o veterinario. El sujeto puede presentar uno o más síntomas asociados con hepatopatía tales como uno o más de ictericia, ascitis, cambios cutáneos, retención de líquidos, cambios en las uñas, facilidad para la aparición de hematomas, hemorragias nasales, varices esofágicas y, en sujetos masculinos, pueden tener aumento del tamaño de las mamas. El sujeto puede presentar cansancio, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, debilidad y/o pérdida de peso. El sujeto puede presentar además uno o más síntomas asociados con encefalopatía hepática tales como uno o más de confusión, desorientación, demencia, estupor, coma, edema cerebral, fallo multiorgánico (fallo respiratorio, fallo cardiovascular o fallo renal), rigidez muscular, ataques o alteración del habla. El sujeto a tratar puede, o no, estar tomando otros fármacos para tratar la hepatopatía. El sujeto a tratar puede correr el riesgo de desarrollar encefalopatía hepática.

La hepatopatía puede haber sido, o ser, confirmada mediante examen físico incluyendo técnicas tales como ultrasonido. Pueden haberse tomado biopsias de hígado para buscar la aparición de fibrosis, células necróticas, degeneración celular y/o inflamación y otros elementos característicos de la hepatopatía. La función hepática puede haberse evaluado en el sujeto para determinar si ésta está comprometida en el sujeto. La naturaleza y la causa

subyacente de la hepatopatía pueden estar caracterizadas. Puede determinarse cualquier historial de exposición a agentes causantes de hepatopatía.

5 El sujeto a tratar puede correr el riesgo de episodios de encefalopatía hepática, por ejemplo pacientes que están esperando trasplantes de hígado, pacientes de hipertensión quirúrgica y/o portal. Una persona que corre el riesgo de episodios de encefalopatía hepática es una persona que no ha sufrido ningún episodio de encefalopatía hepática o que no ha sufrido ningún episodio de encefalopatía hepática durante un periodo de tiempo prolongado (aproximadamente 12 semanas o más), pero tiene un trastorno o afección médica que crea un riesgo de episodios de encefalopatía hepática. Un episodio de encefalopatía hepática es una afección clínica caracterizada por la presencia de disfunción cerebral en pacientes con hepatopatía o disfunción hepática. Existe un amplio espectro de alteraciones mentales en encefalopatía hepática que varían entre mínimas en las que los efectos principales son una reducción de la calidad de vida, hasta manifiestas que conducen a coma y finalmente a la muerte.

15 Pueden usarse sistemas de valoración para evaluar la gravedad de la hepatopatía y encefalopatía hepática y también el pronóstico de los sujetos. Pueden usarse los criterios de Child-Pugh, West Haven, Escala de Coma de Glasgow o el sistema de valoración de Child-Pugh modificado. Como alternativa, puede usarse el sistema de valoración (APACHE) II. Se asignan puntos a parámetros incluyendo niveles de bilirrubina en suero, niveles de albúmina en suero y a signos incluyendo la presencia de ascitis o encefalopatía. Los sujetos a tratar pueden clasificarse en Child-Pugh de clase A, B o C. Generalmente los sujetos a tratar se clasifican en Child-Pugh de clase C.

Un hombre o mujer a tratar puede ser adulto, por ejemplo de 25 a 80 años. El hombre o mujer puede tener una edad de 45 a 70 años.

25 El hombre o mujer puede tener una edad de 25 a 44 años. El hombre o mujer puede tener una edad por encima de 65 años.

#### *Formulación*

30 Los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser aminoácidos cristalinos puros. En general, los aminoácidos están en la forma L, en lugar de la forma D, o una mezcla de D y L. Típicamente se usan las formas aisladas de los aminoácidos. Cualquier forma activa del aminoácido puede usarse para prevenir o tratar la descompensación hepática o encefalopatía hepática. Puede usarse una forma farmacéuticamente aceptable del aminoácido. Los aminoácidos pueden emplearse como aminoácidos libres o sales o derivados de aminoácidos.

35 La ornitina puede estar en forma de aminoácido cristalino puro. En general, la ornitina está en la forma L, en lugar de la forma D, o una mezcla de D y L. Típicamente se usan formas aisladas de ornitina. Puede usarse cualquier forma activa de ornitina o puede usarse una forma farmacéuticamente aceptable de ornitina. La ornitina puede emplearse como un aminoácido libre o una sal o derivado de aminoácido.

40 Típicamente, la ornitina se usa como un único aminoácido monomérico. La ornitina puede usarse en forma de sal, por ejemplo puede usarse clorhidrato de ornitina. La ornitina puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable en forma libre. Por lo tanto, la ornitina o la sal de ornitina típicamente no están unidas químicamente, o enlazadas covalentemente a cualquier otro agente.

45 Pueden usarse derivados de ornitina. Por ejemplo, pueden administrarse ceto o hidroxí análogos de ornitina como sales de sodio o de calcio. Los ceto ácidos de ornitina incluyen cetoglutaratato de ornitina, ornitina cetoleucina y ornitina cetovalina. Pueden usarse sales o derivados de ornitina en lugar de o además de ornitina libre.

50 Puede usarse al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato. El fenilacetato y/o fenilbutirato pueden estar en forma de sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de metal alcalino o metal alcalinotérreo. La sal puede ser fenilacetato sódico fenilbutirato sódico. La forma de sal de fenilacetato y fenilbutirato puede estar en forma libre. Por lo tanto, el fenilacetato y fenilbutirato o sal de fenilacetato y sal de fenilbutirato típicamente no están unidas químicamente, o enlazadas covalentemente a cualquier otro agente.

55 Opcionalmente se usa isoleucina. La isoleucina puede estar en forma de aminoácido cristalino puro. En general, la isoleucina está en la forma L, en lugar de en la forma D, o una mezcla de D y L. Típicamente se usan formas aisladas de isoleucina. Puede usarse cualquier forma activa de isoleucina o puede usarse una forma farmacéuticamente aceptable de isoleucina. La isoleucina puede emplearse como un aminoácido libre o una sal o derivado de aminoácido.

60 Típicamente, la isoleucina se usa como un único aminoácido monomérico. La isoleucina puede usarse en forma de sal, por ejemplo puede usarse clorhidrato de isoleucina. La isoleucina puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable en forma libre. Por lo tanto, la isoleucina o la sal de isoleucina típicamente no están químicamente unidas, enlazadas covalentemente a ningún otro agente.

65

*Composiciones farmacéuticas*

- La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato se formulan típicamente para administración con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato pueden formularse, por lo tanto, como un medicamento con un vehículo(s) y/o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) convencional como es rutinario en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de la formulación dependerá de varios factores incluyendo la vía de administración deseada. Típicamente, la ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato se formulan para administración oral, intravenosa, intragástrica, intravascular o intraperitoneal.
- El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica tal como solución salina fisiológica. Las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, magnesio o estearato cálcico, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo almidones, goma arábica, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes desagregantes, por ejemplo almidón, ácido algínico, alginatos o almidón glicolato sódico; mezclas efervescentes; tintes; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas puede fabricarse de manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, granulado, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con película.
- Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.
- Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo una goma natural, goma de agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.
- Los medicamentos de la invención pueden comprender ornitina como el único componente de aminoácido. Los medicamentos de la invención pueden comprender ornitina e isoleucina como los únicos componentes de aminoácido. El medicamento puede estar constituido esencialmente por ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato. El medicamento puede estar constituido esencialmente por ornitina, isoleucina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato.
- El medicamento puede estar constituido esencialmente por ornitina, fenilacetato y/o fenilbutirato y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho medicamento, por lo tanto, no contiene sustancialmente ningún otro aminoácido además de ornitina. El medicamento puede estar constituido esencialmente por ornitina, isoleucina, fenilacetato y/o fenilbutirato y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho medicamento no contiene, por lo tanto, sustancialmente ningún otro aminoácido además de ornitina e isoleucina.
- La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato están presentes en una proporción en peso de 2:1 a 1:2. El fenilacetato puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 5 al 100%, por ejemplo del 10 al 50%, o del 20 al 40%, en peso del peso de ornitina siempre que la proporción en peso global de ornitina con respecto a fenilacetato y fenilbutirato sea de 2:1 a 1:2. El fenilbutirato puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 5 al 100%, por ejemplo del 10 al 50%, o del 20 al 40%, en peso del peso de ornitina siempre que la proporción en peso global de ornitina con respecto a fenilacetato y fenilbutirato sea de 2:1 a 1:2.
- Sin embargo, el medicamento puede comprender aspartato, glutamato o arginina libre en forma no peptídica, típicamente en una cantidad insustancial. Generalmente, la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina no supera la cantidad en peso de ornitina. Por una cantidad insustancial, se entiende que la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina, o una combinación de estos aminoácidos, no supera el 20% en peso de ornitina. Por lo tanto, el medicamento puede no comprender sustancialmente aspartato. En una realización, la composición no comprende aspartato, glutamato o arginina. En la composición pueden estar presentes cantidades mínimas de aspartato, glutamato o arginina. Por cantidad mínima, se entiende que la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina, o una combinación de estos aminoácidos, no supera el 1% en peso de ornitina. Preferiblemente, la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina no supera el 0,5% en peso de ornitina.
- En otra realización, la composición puede comprender otros aminoácidos más en forma no peptídica, típicamente como el aminoácido libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en forma libre. La cantidad de estos otros aminoácidos generalmente no supera la cantidad en peso de ornitina. Por ejemplo, los otros aminoácidos pueden estar presentes en una cantidad en peso de hasta el 20%, por ejemplo del 5 al 20%, del peso de ornitina. Dichos otros aminoácidos que pueden estar presentes en la composición incluyen aminoácidos esenciales y no esenciales. La composición puede comprender otros aminoácidos de cadena ramificada (BCAA). Los BCAA incluyen isoleucina, valina y leucina. Por lo tanto, una composición de la invención puede comprender además isoleucina y/o valina y/o leucina.

*Tratamiento*

La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato se administran en combinación a un sujeto para prevenir o retrasar el inicio de descompensación hepática o encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse por lo tanto en combinación para mejorar el estado de un sujeto, por ejemplo un sujeto que padece hepatopatía crónica después de un evento desencadenante. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para aliviar los síntomas asociados con hepatopatía crónica en un sujeto después de un evento desencadenante. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para combatir o retrasar el inicio de descompensación hepática o encefalopatía hepática.

La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación a un sujeto para el tratamiento de encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para mejorar el estado de un paciente que padece encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para aliviar los síntomas asociados con encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para combatir encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para prevenir un episodio de encefalopatía hepática inicial en una persona que corre el riesgo de episodios de encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para reducir la gravedad de un episodio de encefalopatía hepática inicial en una persona que corre el riesgo de episodios de encefalopatía hepática. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación para retrasar un episodio de encefalopatía hepática inicial en una persona que corre el riesgo de episodios de encefalopatía hepática.

El desarrollo de descompensación hepática y encefalopatía hepática implica "eventos desencadenantes" (o "ataques agudos"). Dichos eventos desencadenantes incluyen hemorragia gastrointestinal, infección (sepsis), trombosis de la vena porta y deshidratación. El inicio de dicho ataque agudo es probable que conduzca a la hospitalización. El paciente puede padecer uno de estos ataques agudos o una combinación de estos ataques agudos.

Un sujeto que ha tenido o del que se sospecha que ha tenido un ataque agudo puede ser tratado con ornitina y fenilacetato y/o fenilbutirato en combinación para prevenir el avance del hígado al estado descompensado. Las composiciones de la invención pueden usarse, por lo tanto, para prevenir las consecuencias médicas de la descompensación hepática tales como encefalopatía hepática. La ornitina y fenilacetato y/o fenilbutirato pueden usarse para conservar la función hepática. El uso de ornitina y fenilacetato y/o fenilbutirato puede prolongar, por lo tanto, la vida de un paciente con hepatopatía. En una realización, se previenen las consecuencias metabólicas de una hemorragia gastrointestinal tales como hiperamonemia, hiposoleuquemia y síntesis de proteínas reducida en el periodo posterior a la hemorragia.

Típicamente, el tratamiento de sujetos puede comenzar lo antes posible después del inicio o el inicio sospechado de un evento desencadenante (ataque agudo). Preferiblemente, el tratamiento del sujeto comienza antes de ataques agudos repetidos. Más preferiblemente, el tratamiento del sujeto comienza después del primer ataque agudo.

El tratamiento se administra típicamente inmediatamente después del comienzo de un ataque agudo. El tratamiento puede comenzar después de que los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado hayan sido detectados por ejemplo por un médico tal como un facultativo, un profesional paramédico o una enfermera. El tratamiento puede comenzar después de la hospitalización del sujeto. El tratamiento, por lo tanto, puede comenzar en 6 horas, en 3 horas, en 2 horas o en 1 hora después de que los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado hayan sido detectados. El tratamiento del sujeto puede comenzar, por lo tanto de 1 a 48 horas, por ejemplo de 1 a 36 horas o de 1 a 24 horas después de que los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado hayan sido detectados.

El tratamiento se puede prolongar durante hasta 8 semanas, por ejemplo hasta 6 semanas, hasta 4 semanas o hasta 2 semanas después de que los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado hayan sido detectados. El tratamiento se puede prolongar, por lo tanto, durante hasta 48 horas, por ejemplo durante hasta 36 horas o durante hasta 24 horas después de que los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado hayan sido detectados. Típicamente, el tratamiento se prolonga hasta el momento en el que la recuperación del evento desencadenante agudo es evidente.

El sujeto se trata con la ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato. La ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato pueden administrarse en combinación en un único medicamento, o por separado en dos medicamentos diferentes. Cuando ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato deben administrarse en un medicamento combinado, la combinación puede prepararse inmediatamente antes de la administración, o puede almacenarse como un medicamento combinado.

Cuando la ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato deben administrarse por separado, los medicamentos pueden administrarse simultánea o secuencialmente durante un periodo de tiempo. Pueden administrarse dos

medicamentos diferentes durante un periodo de tiempo.

5 Cuando se administran dos medicamentos, una combinación de ornitina y fenilacetato puede administrarse en primer lugar, seguida de la administración de fenilbutirato. Como alternativa, una combinación de ornitina y fenilbutirato puede administrarse en primer lugar, seguida de la administración de fenilacetato. En otra realización, fenilacetato puede administrarse en primer lugar, seguido de la administración de una combinación de ornitina y fenilbutirato.

10 Como alternativa, fenilbutirato puede administrarse en primer lugar, seguido de la administración de una combinación de ornitina y fenilacetato.

15 El segundo medicamento puede administrarse hasta 5 horas, tal como hasta 2 horas o hasta 1 hora, después de la administración del primer medicamento. El segundo medicamento puede administrarse por lo tanto de 15 minutos a 5 horas, por ejemplo de 30 minutos a 4 horas o de 1 hora a 3 horas, después de la administración del primer medicamento.

20 Los medicamentos de la invención pueden administrarse en el mismo sitio o en sitios diferentes. Los medicamentos de la invención pueden administrarse mediante la misma vía o diferentes vías. Un medicamento de la invención puede administrarse mediante cualquier vía adecuada. Preferiblemente éste se administra mediante vías oral, intravenosa, intragástrica, intraperitoneal o intravascular. Por ejemplo, cuando ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato se administran por separado, todos ellos pueden administrarse por vía oral o todos ellos pueden administrarse por vía intravenosa o la ornitina puede administrarse por vía oral y el fenilacetato y/o fenilbutirato puede administrarse por vía intravenosa, o el fenilacetato y/o fenilbutirato puede administrarse por vía oral y la ornitina puede administrarse por vía intravenosa.

25 Se administran cantidades terapéuticamente eficaces de ornitina, el fenilacetato y/o fenilbutirato y la isoleucina opcional al sujeto. Las dosis de la ornitina, el fenilacetato y/o fenilbutirato y la isoleucina pueden determinarse de acuerdo con diversos parámetros tales como la edad, el peso y el estado del sujeto a tratar; el tipo y la gravedad de la hepatopatía; la vía de administración; y el régimen requerido.

30 Una dosis típica de ornitina, de fenilacetato o fenilbutirato, o de isoleucina es de 0,02 a 1,25, por ejemplo de 0,1 a 0,5 g por kg de peso corporal, dependiendo de dichos parámetros. Por consiguiente, una dosificación de ornitina, de fenilacetato o fenilbutirato, o de isoleucina puede ser de 1 g a 50 g tal como de 5 g a 30 g. La dosificación de ornitina puede ser de 10 a 30 g. La dosis de isoleucina puede ser de 5 a 15 g. La ornitina y fenilacetato/fenilbutirato se administran en una proporción en peso de 2:1 a 1:2 tal como de aproximadamente 1:1. Un facultativo médico será capaz de determinar la dosificación requerida de ornitina y de fenilacetato o fenilbutirato y de la isoleucina opcional para cualquier sujeto particular.

40 Puede administrarse una dosis única de ornitina y una dosis única de fenilacetato y/o fenilbutirato. Opcionalmente, puede administrarse una dosis única de isoleucina. Como alternativa pueden administrarse múltiples dosis, por ejemplo dos, tres, cuatro o cinco dosis, de ornitina y/o del fenilacetato y/o fenilbutirato y/o de la isoleucina opcional. Dichas múltiples dosis pueden administrarse durante un periodo de un mes o dos semanas o una semana. En otra realización, puede administrarse diariamente una dosis única o múltiples dosis tales como dos, tres, cuatro o cinco dosis de ornitina y/o de fenilacetato y/o fenilbutirato.

45 Pueden administrarse otros aminoácidos a un sujeto como se ha indicado anteriormente. El o cada uno de dichos otros aminoácidos puede administrarse en el mismo medicamento que la ornitina y/o el fenilacetato y/o fenilbutirato, o puede administrarse por separado. Cuando se administran por separado, el o cada uno de los otros aminoácidos pueden administrarse simultáneamente con, o en un momento diferente tal como hasta 5 horas, hasta 2 horas o hasta 1 hora antes o después de, la administración de ornitina y/o fenilacetato y/o fenilbutirato. El o cada uno de los otros aminoácidos se administra típicamente por vía oral o por vía intravenosa.

50 Una cantidad terapéuticamente eficaz del o de cada uno de los otros aminoácidos se administra al sujeto. La dosis dependerá de diversos parámetros tales como aquellos indicados anteriormente para ornitina, fenilacetato y fenilbutirato. Una dosis típica del o de cada uno de los otros aminoácidos es de 0,02 a 1,25, por ejemplo de 0,1 a 0,5 g por kg de peso corporal. Una dosificación del o cada uno de los otros aminoácidos puede ser, por lo tanto, de 1 g a 50 g tal como de 5 g a 30 g.

60 Puede administrarse una dosis única del o de cada uno de los otros aminoácidos. Como alternativa, pueden administrarse múltiples dosis, por ejemplo dos, tres, cuatro o cinco dosis. Dichas múltiples dosis pueden administrarse durante un periodo de un mes o dos semanas o una semana. Puede administrarse diariamente una dosis única o múltiples dosis tales como dos, tres, cuatro o cinco dosis.

65 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

**Ejemplo 1: La función de neutrófilos está alterada en pacientes con cirrosis y empeora con el aumento de la gravedad de la hepatopatía****Método de medición de la Fagocitosis de Neutrófilos y estallido respiratorio**

5 *Phagotest* Se incubó sangre completa heparinizada con *E coli* y CD16 marcados con FITC opsonizado. Las células se analizaron a continuación mediante citometría de flujo (FACScan Becton Dickinson), se seleccionaron a través de dispersión frontal y lateral y posteriormente se evaluaron en base a la expresión del fluorocromo R-ficoeritrina (PE) [Immunotech, Marsella, Francia] para identificar células positivas para CD16. La población seleccionada se evaluó a continuación para la presencia de bacterias marcadas con FITC.

10 *Phagoburst*. Se incubó sangre completa heparinizada con suspensión de *E coli* opsonizada para estimular el estallido respiratorio. Se añadió una solución de sustrato para determinar la conversión de dihidrorrodamina (DHR) 123 al compuesto fluorogénico Rodamina (R) 123 La reacción se interrumpió y se fijó antes de la incubación con anticuerpo CD16 para la identificación de neutrófilos positivos. El análisis se realizó a continuación mediante citometría de flujo.

15 *Quimiotaxis de Neutrófilos*: La quimiotaxis de neutrófilos se midió usando un método de cámara de Boyden modificada usando interleuquina-8 como quimioatrayente para estimular la quimioquinesis.

**Pacientes y Métodos**

20 Estudiamos 30 pacientes con cirrosis (cirrosis alcohólica; edad media 53,2 (Error Estándar de la Media 4,6) y 20 voluntarios sanos. Los pacientes con cirrosis se clasificaron como aquellos con hepatitis alcohólica superpuesta (AH+) y aquellos con hígados descompensados y compensados. Se usó el Phagotest para determinar la capacidad fagocítica y se usó Phagoburst para determinar si las células eran capaces de generar estallido respiratorio cuando se exponían a *E coli*.

**Resultados**

30 Observamos que los neutrófilos de pacientes cirróticos tenían una capacidad de fagocitar bacterias significativamente reducida. También descubrimos que los pacientes con cirrosis tenían una reducida capacidad para responder a la estimulación de los neutrófilos por *E coli* en términos de aumento de la tasa de generación de estallido respiratorio (Figura 1). Esta reducción de capacidad se correlacionaba con la gravedad de la hepatopatía indicando que cuanto más avanzada sea la fase de la hepatopatía, menor será la capacidad de responder a y hacer frente a la infección.

**Ejemplo 2: El Amoniaco reduce la capacidad fagocítica en neutrófilos****Métodos de medición de fagocitosis de neutrófilos y estallido respiratorio**

40 Como en el Ejemplo 1.

**Pacientes y métodos**

45 Se recogió sangre de voluntarios sanos (n=15) y se incubó durante 1 hora con concentraciones en aumento de amoniaco. La capacidad de los neutrófilos para fagocitar bacterias se midió usando los ensayos Phagotest y de quimiotaxis de neutrófilos. Se usaron 10 ng/ml de IL-8 en el ensayo de quimiotaxis de neutrófilos.

**Resultados**

50 Con la incubación de concentraciones en aumento de amoniaco, existía una reducción significativa de fagocitosis de neutrófilos (Figura 2) y también de quimiotaxis de neutrófilos (Figura 3).

**Ejemplo 3: El efecto de amoniaco sobre fagocitosis de neutrófilos puede invertirse mediante intervenciones****Métodos de medición de fagocitosis de neutrófilos y estallido respiratorio**

60 Como en el Ejemplo 1.

**Pacientes y métodos**

65 Se recogió sangre de voluntarios sanos (n=15) y se incubó durante 1 hora con amoniaco y aminoácidos seleccionados. La capacidad de los neutrófilos para fagocitar bacterias se midió usando el ensayo Phagotest.

## Resultados

Observamos que la reducción de fagocitosis de neutrófilos inducida por amoniaco podía invertirse parcialmente mediante ornitina y glutamina (Figura 4). Sin embargo, la fagocitosis de neutrófilos empeoró mediante co-incubación de amoniaco con aspartato, pero permanecía sin cambios con L-aspartato de L-ornitina.

### **Ejemplo 4: Una hemorragia gastrointestinal simulada reduce la quimiotaxis de neutrófilos que puede invertirse parcialmente mediante la administración de isoleucina**

#### 10 Métodos

Diez pacientes metabólicamente estables, en ayuno durante una noche con cirrosis del hígado demostrada por biopsia [9 hombres y 1 mujer; de media 49,6 años (EEM 9,1); valor de Child-Pugh medio de 7,8 (EEM 1,2)] se estudiaron antes y dos horas después de una administración oral de 75 gramos de una mezcla de aminoácidos que imita la molécula de hemoglobina (Nutricia, Cuijk, Países Bajos). En otros siete pacientes [4 hombres y 3 mujeres; media 51,4 años (EEM 6,7); valor de Child-Pugh medio de 8,1 (EEM 1,4)], después de la administración de la mezcla de aminoácidos, se administró por vía intravenosa durante un periodo de 2 horas (solución isoosmótica que contiene 40 mg/l de isoleucina a una tasa de 100 ml/hora). La quimiotaxis de neutrófilos (véase el Ejemplo 1 para el método) y el amoniaco en plasma se midieron en muestras de sangre venosa periférica.

#### 20 Resultados

La quimiotaxis de neutrófilos era significativamente más baja en estos pacientes cirróticos en comparación con controles de la misma edad (53,3 EEM 4,6) y se reducía significativamente después de hemorragia simulada de 31 ( $\pm 4,2$ ) a 8 ( $\pm 5,4$ ) células/campo de gran aumento ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5). La concentración de amoniaco en plasma aumentaba significativamente de 75,1 ( $\pm 4,2$ ) a 124 ( $\pm 8,5$ ) ( $p < 0,001$ ). El cambio de la concentración de amoniaco se correlacionaba con el cambio de quimiotaxis de neutrófilos ( $r = 0,65$  y  $p < 0,05$ ). La reducción de quimiotaxis de neutrófilos observada con la hemorragia estimulada se anuló en el grupo de pacientes tratados con isoleucina 25,4 ( $\pm 6,0$ ) células/campo de gran aumento.

### **Ejemplo 5: Una hemorragia simulada reduce la síntesis de proteínas y estimula la oxidación de isoleucina de forma inapropiada**

#### 35 Métodos

Se reclutaron cinco pacientes con cirrosis de hígado en ayunas durante una noche. Se recogió una muestra de sangre y el aire expirado se muestreó antes del comienzo de la infusión de los isótopos estables para la medición del enriquecimiento en isótopos de fondo. A continuación los pacientes recibieron una infusión intravenosa continua a tasa constante de [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]-isoleucina (1 mg/kg peso corporal/h) hasta el final del experimento ( $t = 480$  minutos).

#### 40 Resultados

La figura 6 muestra la tasa media de aparición de isoleucina en sangre completa (Wb Ra) y la oxidación de isoleucina durante la última hora de infusión de solución salina (barras negras) y de aminoácidos (barras grises) (valores en media + EEM; # representa  $p < 0,05$ ). Una hemorragia del GI superior en pacientes con cirrosis dio como resultado una reducción de isoleucina y redujo marcadamente la síntesis de proteínas en sangre completa. La fracción del flujo de isoleucina usada para oxidación no cambiaba después de la hemorragia simulada a pesar de la marcada reducción de la concentración de isoleucina, lo que apuntaba a la aparición de antagonismo de BCAA.

### **Ejemplo 6: La administración de isoleucina durante una hemorragia simulada potencia la síntesis de proteínas pero no reduce la concentración de amoniaco**

#### 55 Métodos

Se estudiaron dieciséis pacientes metabólicamente estables con cirrosis de hígado demostrada por biopsia. Los pacientes se aleatorizaron a suplementación con isoleucina (solución de 40 mg/l; 50 ml/hora) o placebo durante una hemorragia simulada durante un periodo de 4 horas. La síntesis de proteínas (medida usando infusión continua a tasa constante de L-[anillo- $^2\text{H}_3$ ]fenilalanina), L-[anillo- $^2\text{H}_4$ ]tirosina y L-[anillo- $^2\text{H}_2$ ]tirosina) y amoniaco.

#### 60 Resultados

Los resultados mostraban que la infusión de isoleucina durante una hemorragia simulada en pacientes con cirrosis de hígado restaura la síntesis de proteínas alterada del hígado y músculo conduciendo un estado anabólico neto en estos órganos (Tabla 1). La concentración de amoniaco aumentaba significativamente en ambos grupos pero no era significativamente diferente entre aquellos a los que se administraba isoleucina o placebo (Figura 7).

**Ejemplo 7: Acumulación de aspartato después de la infusión de L-aspartato de L-ornitina en pacientes con cirrosis avanzada****Métodos**

5 5 pacientes con cirrosis avanzada que estaban esperando un trasplante de hígado (edad: 59; 3 hombres, enfermedad de Child de Clase C, ascitis grave, creatinina 102  $\mu\text{mol/l}$ ) estaban sometidos a tratamiento con 40 g/día de L-aspartato de L-ornitina.

**Resultados**

10 Durante un periodo de 3 días se producía un aumento significativo y progresivo de la concentración de aspartato aumentando hasta 5 veces el valor basal (Tabla 2).

15

**Tabla 2**

	PRE	Día 1	Día 2	Día 3
ASPARTATO ( $\mu\text{mol/l}$ )	72 (11,8)	178 (23,2)	289 (27,1)	354 (31,1)

**Tabla 1  
Cinética de proteínas determinada usando el modelo de Phe a t = 0 horas y al final del estudio**

	Tiempo	Síntesis de P	de P	Disolución de proteínas	P	Equilibrio neto	P	
Hígado	SB-solución salina	0	415 $\pm$ 120		263 $\pm$ 50		152 $\pm$ 76	
		Final	274 $\pm$ 250	0,445	108 $\pm$ 162	0,366	166 $\pm$ 231	0,836
	SB-isoleucina	0	218 $\pm$ 37		109 $\pm$ 25		98 $\pm$ 33	
		Final	839 $\pm$ 221	0,038	157 $\pm$ 204	0,412	682 $\pm$ 165	0,010
Pierna	SB-solución salina	0	117 $\pm$ 52		137 $\pm$ 51		-20 $\pm$ 19	
		Final	372 $\pm$ 211	0,189	288 $\pm$ 175	0,232	87 $\pm$ 140	0,694
	SB-isoleucina	0	-31 $\pm$ 201		196 $\pm$ 61		-185 $\pm$ 152	
		Final	377 $\pm$ 135	0,209	159 $\pm$ 100	0,535	261 $\pm$ 102	0,005

Los datos son la media  $\pm$  EEM en nmol/kg de masa de células corporal/min. Los valores del final representan los valores medios de la hora final de la infusión de aminoácidos. Los datos de la síntesis de proteínas de hígado y riñón están corregidos para hidroxilación (véase métodos). Estadísticas: valores p para el test U de Mann-Whitney para diferencias entre los grupos; no se encontraron diferencias significativas entre los grupos

**Ejemplo 8: La administración con LOLA reduce la concentración de amoníaco pero permite que el amoníaco se regenere****Pacientes y métodos**

25 Ocho pacientes con cirrosis (edad 56 (5,6), 5M, ALD-6; Grado 2 HE: 4; Grado 3-4 HE: 4) se trataron con una infusión de LOLA (40 g durante 8 horas). La sangre se muestreó para la medición de amoníaco y glutamina.

**Resultados**

30 Los resultados mostraban que la administración de LOLA dio como resultado una reducción significativa de la concentración de amoníaco con un aumento concomitante de la concentración de glutamina (Figura 8). Esta reducción de amoníaco tenía efectos beneficiosos sobre la gravedad de HE. Sin embargo, cuando se interrumpió la administración de LOLA, se producía un aumento de rebote de los niveles de amoníaco circulante, dando como resultado la recurrencia de HE en 3 de los 6 pacientes que habían mejorado.

**Ejemplo 9: La retirada activa de glutamina previene el aumento secundario de la concentración de amoníaco****Pacientes y métodos**

40 3 pacientes (edad 45 (4,1) 2M, ALD, todos HE de grado 3, HRS los 3) que estaban sometidos a hemofiltración (CVVH) se trataron con una infusión de LOLA (40 g durante 8 horas). La sangre se muestreó para la medición de

amoníaco y glutamina.

**Resultados**

5 Los resultados mostraban que LOLA daba como resultado una reducción de la concentración de amoníaco pero la adición de diálisis prevenía el aumento concomitante de la concentración de glutamina (Figura 9). Por lo tanto, creemos que había una reducción sostenida de la concentración de amoníaco.

**Ejemplo 10: El Fenilacetato se une a glutamina para formar un compuesto excretable y previene el aumento secundario de amoníaco**

**Pacientes y métodos**

6 6 pacientes con fallo hepático agudo (5 sin Hepatitis A, sin hepatitis B) y encefalopatía grave (Grado 3-4) se trataron con LOLA y fenilacetato (40 g/día durante 8 horas).

**Resultados**

20 No había aumento significativo en la concentración de glutamina y los niveles de amoníaco se redujeron con el tratamiento combinado (Figura 10). No se observó aumento rebote de amoníaco.

**Ejemplo 11: El efecto de ornitina y fenilbutirato en pacientes humanos con encefalopatía hepática**

**Pacientes**

25 1. Grupos de 3 pacientes por grupo. Total 12.

2. criterios de inclusión

- 30 - pacientes adultos de 18-80 años de edad, - cirrosis hepática documentada mediante histología o criterios clínicos  
 - HE de tipo C, - concentración de amoníaco de > 80 µmol/l, consentimiento/aprobación informada

35 3. Criterios de exclusión

- 40 - otro trastorno neurológico concomitante, - uso de otro fármaco que rebaja el amoníaco específico, - fallo respiratorio que requiere ventilación mecánica y sedación, - hemorragia gastrointestinal no controlada, - hipotensión que requiere inotropos, fallo renal manifiesto (creatinina >2 mg/dl), hemodiálisis, - soporte hepático extracorpóreo, hipersensibilidad conocida a cualquiera de los fármacos del estudio, - embarazo.

**Evaluaciones del Estado Mental**

Graduación de encefalopatía hepática (Criterios de West Haven)

Grado 0 (HE mínima)	Estado mental normal (una o más anomalías cuantificables en el test psicométrico)
Grado 1	Falta trivial de atención euforia o ansiedad capacidad de enfocar la atención durante periodos más cortos capacidad de sumar alterada
Grado 2	letargia o apatía mínima desorientación de tiempo o lugar sutil cambio de personalidad comportamiento inapropiado capacidad de restar alterada
Grado 3	somnolencia a semi-estupor, pero sensible a estímulos verbales confusión gran desorientación
Grado 4	coma (insensible a estímulos verbales o nocivos)

45

**Métodos**

En un estudio de etiqueta abierta, incluimos 8 pacientes con cirrosis e hiperamonemia. Se emparejaron para la gravedad de la hepatopatía (véase la Tabla 3). Se trataron con uno de los siguientes regímenes durante un periodo de 3 días y se realizaron observaciones durante 5 días. Los grupos de estudio eran:

- (i) Placebo: Dextrosa al 5% durante 4 horas;
- (ii) Ornitina en solitario: 20 g en 500 ml, dextrosa al 5% entre las 08:00 y las 12:00;
- (iii) Fenilbutirato: 10 g dos veces al día, por vía oral (08:00 y 16:00); y
- (iv) Ornitina + Fenilbutirato: 20 g en 500 ml, dextrosa al 5% entre las 08:00 y las 12:00 + 10 g dos veces al día, por vía oral (08:00 y 16:00).

Los pacientes se mantuvieron en ayunas durante una noche entre las 00:00 medianoche y las 08:00 am. Se les alimentó por vía intragástrica con una dieta de 25 KCal/kg que incluía 1 g/kg de dieta de proteína comenzando a las 08:00 y finalizando a medianoche. Se muestreó la sangre a las 07:30 am y a continuación a las 18:00 h para la medición de amoniaco y glutamina. Los pacientes se supervisaron estrechamente para detectar efectos secundarios. El fármaco era bien tolerado en cada uno de los grupos y no se observaron eventos adversos.

**Tabla 3.** Demografía de Pacientes

	Placebo	Ornitina en solitario	Fenilbutirato en solitario	OP
Edad	P1: 47 P2: 57	P3: 46 P4: 40	P5: 56 P6: 48	P7: 52 P8: 52
Sexo	P1 M P2 M	P3: F P4: F	P5: F P6: M	P7: M P8: F
Etiología de la hepatopatía	P1: HCV P2: HBV	P3: HBV P4: NASH	P5: NASH P6: HBV	P7: HBV P8: HBV
Gravedad de la hepatopatía (Valor Pugh)	P1: 9 P2: 12	P3: 13 P4: 13	P5: 14 P6: 13	P7: 14 P8: 12
Factor desencadenante	P1: Infección P2: Infección	P3: SBP P4: Infección	P5: SBP P6: Infección	P7: SBP P8: Infección
Gravedad de HE (criterios de West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 3 P4: 3	P5: 3 P6: 3	P7: 3 P8: 3
Gravedad de HE (valor de coma Glasgow)	P1: 9 P2: 8	P3: 8 P4: 8	P5: 9 P6: 10	P7: 9 P8: 9
Otro fallo orgánico	P1: ninguno P2: hipotensión	P3: pre-renal, hipotensión P4: hipotensión	P5: ninguno P6: pre-renal	P7: ninguno P8: ninguno
Muerto/Vivo	P1: V P2: V	P3: M P4: V	P5: V P6: V	P7: V P8: V
Complicaciones	P1: infección, SBP P2: infección, hemorragia de varices	P3: HRS P4: infección rec.	P5: sepsis, ICU P6: SBP recurrente	P7: ninguna P8: hemorragia, día 14
SBP: peritonitis bacteriana espontánea, esteatohepatitis no alcohólica, ICU: necesita soporte de cuidado intensivo, HRS: síndrome hepatorenal				

20

**Resultados**

La Figura 11 muestra que los niveles medios de amoniaco permanecieron en gran medida sin cambios durante el periodo de tratamiento en el grupo de placebo. En el grupo de L-ornitina y el de fenilbutirato, la concentración de amoniaco aumentaba desde niveles iniciales. En el grupo tratado con L-ornitina y fenilbutirato, había una reducción

25

sustancial de amoniaco. El aumento postprandial de amoniaco se redujo en los animales tratados con OP, además de la reducción de concentraciones de amoniaco. Ambos pacientes en el grupo de OP habían mejorado su valor de encefalopatía en 2 grados el día 3, lo que no se observó en ninguno de los otros 6 pacientes.

5 La Figura 12 muestra que los niveles medios de glutamina permanecieron en gran medida sin cambios durante el periodo de tratamiento en el grupo de OP a pesar de una reducción de amoniaco. Había una reducción de glutamina en el grupo de fenilbutirato, que bien puede ser perjudicial. En los grupos de L-ornitina y placebo había un aumento de las concentraciones de glutamina que se acentuaba marcadamente en el estado postprandial.

10 La Figura 13 muestra los cambios del estado mental en los grupos tratados con Placebo, O, P y OP.

**Ejemplo 12: El efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina en pacientes humanos con encefalopatía hepática**

**Pacientes**

- 15
1. Grupos 2 pacientes por grupo. Total 6
  2. Criterios de inclusión
  - 20 - Pacientes adultos de 18-80 años de edad, cirrosis hepática documentada mediante histología o criterios clínicos, Child B o C, hemorragia gastrointestinal reciente de varices (< 6 horas después de la presentación), consentimiento/aprobación informada.
  3. Criterios de exclusión
  - 25 - otro trastorno neurológico concomitante, uso de otro fármaco que rebaja el amoniaco específico, fallo respiratorio que requiere ventilación mecánica y sedación, hemorragia gastrointestinal no controlada, hipotensión que requiere inotropos, fallo renal manifiesto (creatinina >2 mg/dl), hemodiálisis, soporte hepático extracorpóreo, hipersensibilidad conocida a cualquiera de los fármacos del estudio, embarazo/lactancia.

**Métodos**

En un estudio de etiqueta abierta, incluimos 6 pacientes con cirrosis y que fueron admitidos para el tratamiento de hemorragia de varices. Se emparejaron por la gravedad de la hepatopatía (véase la Tabla 4). Se trataron con uno de los siguientes regímenes durante un periodo de 3 días y se realizaron observaciones durante 5 días. Los grupos del estudio eran:

- i. Placebo: dextrosa al 5% durante 4 horas (250 ml)
- ii. Isoleucina en solitario: 10 gm IV en 250 ml de dextrosa al 5% durante 2 horas en dos dosis divididas.
- 40 iii. Isoleucina + Ornitina + Fenilbutirato: isoleucina: 10 gm IV en 250 ml de dextrosa al 5% durante 2 horas en dos dosis divididas; Ornitina: 20 g en 250 ml, dextrosa al 5% (t = 0, 24, 48 horas); Fenilbutirato: 10 g dos veces al día, por vía oral (t = 0, 12, 24, 36, 48 horas).

Los pacientes se mantuvieron en ayunas durante una noche entre las 00:00 medianoche y las 08:00 am. Se alimentaron por vía intragástrica con una dieta de 25 KCal/kg que incluía 1 g/kg de dieta de proteínas comenzando a las 08:00 y finalizando a medianoche. La sangre se muestreó a las 07:30 am y a continuación a las 18:00 h para la medición de amoniaco y glutamina. Los pacientes se supervisaron estrechamente para detectar efectos secundarios. El fármaco era bien tolerado en cada uno de los grupos y no se observaron eventos adversos. Dado que los pacientes recibieron sedación para su endoscopia inicial, la evaluación del estado mental era imposible de interpretar. Un paciente en cada uno de los grupos de Placebo e Isoleucina murió de fallo multiorgánico en el hospital. El resto de los pacientes sobrevivió.

**Tabla 4**

	Placebo	Isoleucina en solitario	OIP
Edad	P: 43 P2: 62	P3: 57 P4: 42	P5: 43 P6: 45
Sexo	P1: M P2: M	P3: F P4: M	P5: M P6: M
Etiología de la hepatopatía	P1: ALD P2: HCV	P3: HBV P4: ALD	P5: HBV P6: NASH

	Placebo	Isoleucina en solitario	OIP
Gravedad de la hepatopatía (Valor Pugh)	P1: 13 P2: 14	P3: 13 P4: 11	P5: 14 P6: 10
Gravedad de HE (Criterios de West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 2 P4: 1	P5: 2 P6: 2
Pérdida de Sangre Estimada (u)	P1: 9 P2: 10	P3: 7 P4: 8	P5: 7 P6: 10
Muerto/Vivo	P1: M P2: V	P3: V P4: M	P5: V P6: V
Complicaciones	P1: infección, hemorragia recurrente P2: encefalopatía grave	P3: HRS P4: infección rec.	P5: infección torácica P6: ninguna
SBP: peritonitis bacteriana espontánea, esteatohepatitis no alcohólica, ICU: necesita soporte de cuidado intensivo, HRS: síndrome hepatorenal			

## Resultados

5 La Figura 14 muestra que no había cambios significativos en las concentraciones de amoniaco en los grupos de placebo e isoleucina. En el grupo tratado con OIP, había una reducción sustancial de la concentración de amoniaco.

La Figura 15 muestra que los niveles de glutamina no se alteran significativamente por la administración de isoleucina, placebo u OIP. Solamente en el grupo de OIP, el amoniaco se redujo sustancialmente.

10 La figura 16 muestra una alternativa mediante la cual OIP puede actuar, que es a través de una reducción del aminoácido amoniogénico, glicina. La reducción sustancial de glicina se observa solamente en el grupo de OIP.

15 La Figura 17 muestra que los niveles de isoleucina son muy bajos para comenzar en cada uno de los grupos pero aumenta hasta dos veces los valores normales en los grupos tratados con isoleucina. La concentración en el grupo de placebo sigue siendo baja y permanece sin cambios.

20 La Figura 18 muestra los cambios en los niveles de ornitina en los pacientes a lo largo del tratamiento mostrando un marcado aumento sostenido en las concentraciones de ornitina que se reducen significativamente a valores basales al interrumpir el fármaco, lo que indica captación en los diferentes tejidos.

### **Ejemplo 13: El efecto de ornitina y fenilbutirato en rata con el conducto biliar ligado**

#### Métodos

##### 25 Inducción de cirrosis mediante ligadura del conducto biliar (BDL)

30 Para este procedimiento se usaron ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g). Después de la anestesia, se realizó una laparotomía de la línea media, el conducto biliar se dejó expuesto, se ligó por triplicado con sutura de seda 4.0, y se cortó entre la segunda y la tercera ligadura. La herida se cerró en capas con sutura absorbible y se dejó que el animal se recuperara en una habitación tranquila antes de devolverlo a la instalación de almacenamiento de animales. Los animales se mantuvieron a temperatura constante (20°C) en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con acceso a agua y pienso para roedores convencional *ad libitum*.

35 Después de cinco semanas después de la BDL (o procedimiento simulado) se cambió a los animales de pienso para roedores a una dieta líquida completa (Liquidiet, Bio-Serv, Frenchtown NJ, Estados Unidos) a la que se añadió una mezcla de aminoácidos que imitaba la composición de hemoglobina (2,8 g/kg/día, Nutricia Cuijk, Países Bajos, N° de Producto 24143). A las seis semanas, con anestesia, se insertó un catéter en la arteria carótida derecha y se usó para recoger muestras de sangre repetidas. Siguiendo este procedimiento, se recogió una muestra inicial de sangre antes de la administración de las formulaciones del estudio mediante inyección IP. Los grupos del estudio eran:  
40 BDL control + Solución salina (n=5), BDL + ornitina (0,22 g/kg, n=6) en solución salina IP, BDL + fenilbutirato (0,3 g/kg, n=7) en solución salina IP, BDL + OP (0,22 g/kg / 0,3 g/kg, n=7) en solución salina IP.

Se recogieron muestras de sangre en tubos heparinizados enfriados previamente y se almacenaron en hielo antes del procesamiento. Se recogió plasma después del centrifugado (3.000 rpm, 10 minutos) y se almacenaron a -80°C antes de los análisis.

- 5 Se midieron el amoníaco, glucosa, lactato y urea usando un analizador COBAS Mira S de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los aminoácidos se cuantificaron mediante HPLC con detección de fluorescencia.

### Resultados

- 10 En el modelo de rata con el conducto biliar cirrótico ligado, existe un aumento sustancial en el nivel de amoníaco en plasma arterial ( $205 \pm 11 \mu\text{moles/l}$ , media  $\pm$  EEM) en comparación con controles sanos ( $25,6 \pm 2 \mu\text{moles/l}$ ,  $p < 0,001$  no se muestran los datos). En este modelo descubrimos que no había cambios en los niveles de amoníaco arterial durante tres horas en el grupo de placebo tratado con solución salina.
- 15 La Figura 19 muestra el cambio en los niveles de amoníaco en plasma arterial en ratas cirróticas con BDL después de inyecciones IP de solución salina (BDL control,  $n=5$ ), ornitina (Orn,  $0,22 \text{ g/kg}$ ,  $n=6$ ), fenilbutirato (PB,  $0,3 \text{ g/kg}$ ,  $n=7$ ) y ornitina fenilbutirato (OP,  $0,22 \text{ g/kg} + 0,3 \text{ g/kg}$ ,  $n=7$ ). \* significa  $p < 0,05$  para OP frente a Orn a las 3 horas (ANOVA de 2 vías).
- 20 Esta figura muestra que en los animales tratados con ornitina se detectó un ligero descenso de la concentración de amoníaco, aunque no se descubrió que esto fuera diferente de placebo. En el grupo tratado con fenilbutirato se descubrió un aumento significativo del amoníaco en plasma después de 1 hora ( $p < 0,01$  frente a todos los demás grupos), aunque se descubrió que esta diferencia era más pequeña en el punto temporal de tres horas. Este descubrimiento encaja con la hipótesis de que fenilbutirato (fenilacetato) solamente es eficaz en sujetos con concentraciones de glutamina aumentadas. En los animales sin suplementación con ornitina que puede metabolizarse para formar glutamina, los efectos de P en solitario son indeseables y son potencialmente dañinos. Un nivel de amoníaco significativamente más bajo se observó en el grupo tratado con ornitina más fenilbutirato (OP). En estos animales, se midió una reducción sostenida de amoníaco a lo largo de la duración de tres horas del estudio, cuyos niveles se descubrió que eran significativamente más bajos que los del grupo de ornitina solamente al final del estudio ( $p < 0,05$ ).

Esto demuestra claramente que la combinación de OP tiene una mayor eficacia en la reducción del amoníaco en plasma que O o P en solitario. Además, los niveles aumentados de amoníaco en plasma pueden ser perjudiciales en los animales tratados con P en solitario.

- 35 En un subconjunto de muestras, examinamos la captación de ornitina en el torrente sanguíneo después de la inyección IP de O u OP. La Figura 20 muestra la concentración de ornitina arterial en los grupos suplementados. Puede verse claramente que en ambos grupos la concentración de ornitina en plasma ha aumentado marcadamente a 1 hora después de la inyección IP, que posteriormente se reduce a las 3 horas a medida que esta ornitina es metabolizada en el cuerpo. No se encontró ninguna diferencia significativa en la concentración de ornitina en plasma entre estos grupos en ningún punto temporal.

- 45 Este descubrimiento es importante, ya que demuestra que el método de administración elegido es eficaz para administrar ornitina en estos animales. Además, la rápida captación y la reducción observada en los niveles en plasma indican que el metabolismo activo de este aminoácido se está produciendo.

### **Ejemplo 14: El efecto de ornitina, fenilbutirato e isoleucina en la rata con el conducto biliar ligado**

#### Métodos

- 50 Para este procedimiento se usaron ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g). Durante las 48 horas antes del sacrificio, los animales se cambiaron de pienso para roedores convencional a una dieta líquida completa (Liquidiet, Bio-Serv, Frenchtown NJ, Estados Unidos) a la que se añadió una mezcla de aminoácidos que imitaba la composición de hemoglobina ( $2,8 \text{ g/kg}$ , Nutricia Cuijk, Países Bajos, N° de Producto 24143). Se indujo el fallo hepático agudo (ALF) 24 horas antes del sacrificio mediante inyección IP de galactosamina ( $1 \text{ g/kg}$ , Sigma, Poole Reino Unido) en solución salina ( $n=5$  en cada grupo). Tres horas antes del sacrificio, se trataron los animales con una formulación de OIP (ornitina  $0,22 \text{ g/kg}$ , isoleucina  $0,25 \text{ g/kg}$ , fenilbutirato  $0,3 \text{ g/kg}$ , en solución salina IP) o control con solución salina. Al finalizar el experimento se recogió sangre arterial en tubos heparinizados enfriados previamente y se almacenaron en hielo hasta el procesamiento. Se recogió plasma y se almacenó como anteriormente. Se determinó el amoníaco como anteriormente.

#### Resultados

- 65 Se descubrió que los niveles de amoníaco arterial estaban significativamente reducidos en ratas con fallo hepático agudo tratadas con OIP en comparación con controles con placebo (Fig. 21). Este estudio se diseñó para ensayar si isoleucina junto con ornitina y fenilbutirato (fenilacetato) sería capaz de rebajar de forma eficaz el amoníaco en

plasma. Se ha demostrado previamente que la isoleucina en solitario no afecta a los niveles de amoniaco en estudios humanos, aunque su eficacia junto con O y P no se ha ensayado previamente.

La Figura 21 muestra niveles de amoniaco en plasma arterial en un modelo de fallo hepático agudo hiperamoniaménico para grupos tratados con placebo de solución salina (ALF) y OIP (ALF + OIP). Se descubrió un nivel de significación de  $p < 0,01$  entre estos dos grupos (Test T).

Este descubrimiento apoya la hipótesis de que isoleucina junto con ornitina y fenilbutirato es eficaz en la reducción de los niveles de amoniaco. Esto además de los efectos beneficiosos de descritos anteriormente para la síntesis de proteínas.

### **Ejemplo 15: El efecto de ornitina y fenilbutirato en el modelo de cerdo desvascularizado**

#### **Métodos**

Se aleatorizaron cinco cerdos en cuatro grupos: fallo hepático agudo (ALF)+placebo+placebo (n=2); ALF+ornitina+placebo; ALF+fenilbutirato +placebo; ALF+ornitina y fenilbutirato. Los cerdos tenían catéteres insertados en la arteria y vena femoral, vena porta, vena renal y arteria pulmonar. El experimento comenzó a tiempo = -1 h, cuando se iniciaron las infusiones de placebo o tratamiento.

1. Placebo: dextrosa al 5% durante 3 horas, agua placebo oral
2. Ornitina en solitario: 0,3 g/kg, dextrosa al 5% tres horas 3 horas goteo intravascular
3. Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrosa al 5% durante 3 horas alimentación intragástrica Ornitina + Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrosa al 5% durante 3 horas goteo intravascular, 0,3 g/kg, dextrosa al 5% durante 3 horas alimentación intragástrica.

Se indujo el ALF mediante anastomosis de la vena porta a la vena cava inferior y la posterior ligadura de la arteria hepática (desvascularización) a tiempo = 0 horas, las infusiones se interrumpieron a  $t = +2$  horas y el experimento finalizó a tiempo = 8 horas. Se recogieron muestras de sangre y orina a tiempo = 0, 1, 3, 5, 7 y 9 horas para la medición de los cambios regionales de amoniaco y aminoácidos. Al final del experimento se retiró una sección de corteza frontal para las mediciones del agua cerebral.

#### **Resultados**

Después de la infusión de ornitina que genera glutamato intracelular, los resultados del suministro intragástrico de fenilacetato en conjugación sugieren una profunda alteración de los niveles de amoniaco globales y la utilización de glutamina en este modelo catastrófico de fallo hepático.

Existe un aumento consecuente de la concentración de amoniaco arterial con el tiempo desde la desvascularización en el animal tratado con placebo (Figura 22), con alguna producción del músculo (Figura 23) y una gran cantidad de amoniaco procedente del intestino (Figura 24). Este animal muestra una modesta liberación de glutamina en músculo (Figura 25) y una apreciable captación de glutamina en el intestino (Figura 26).

En el caso del animal tratado con ornitina en solitario, el temprano aumento de amoniaco es inicialmente leve, pero aumenta en adelante para ser el más alto al finalizar el experimento (Figura 22). Existe una clara captación de amoniaco por el músculo en este animal (Figura 24), con una cantidad comparable de glutamina siendo liberada desde el músculo - en comparación con el animal tratado con placebo (Figura 25) con una captación de glutamina en el intestino aumentada (Figura 26).

El fenilbutirato en solitario muestra además una mitigación inicial de los niveles de amoniaco arterial, que rápidamente aumenta hasta niveles comparables con ornitina en solitario en la finalización del experimento (Figura 22) con pocos cambios en la captación de amoniaco por el músculo (Figura 23), pero una apreciable producción de amoniaco en el intestino (Figura 24). Curiosamente, existe una clara retirada de glutamina por el músculo con tratamiento con fenilbutirato en solitario (Figura 25) con poco efecto manifiesto sobre la captación de glutamina en el intestino, en comparación con el animal tratado con placebo (Figura 26).

La combinación de ornitina y fenilbutirato tiene el mayor impacto sobre los niveles de amoniaco arterial con una impresionante reducción de los niveles circulantes al final del experimento en comparación con todos los demás animales (Figura 22). El amoniaco es retirado de forma activa de la sangre por el músculo en este animal (Figura 23) con una producción de amoniaco en el intestino reducida enormemente (Figura 24). Es interesante observar que la liberación de glutamina en el músculo aumenta en comparación con los animales tratados con placebo y ornitina en solitario (Figura 25). A pesar de esta producción de glutamina aumentada en el músculo, la captación de glutamina en el intestino se reduce sustancialmente (Figura 26).

Una demostración de los niveles circulantes aumentados de ornitina en los animales tratados con ornitina se muestra en la Figura 27.

El impacto de la desvascularización y las intervenciones de tratamiento sobre la glutamina arterial se muestra en la Figura 28. Existe un aumento del nivel circulante de glutamina en el animal tratado con ornitina, que mejora mediante la co-administración de fenilacetato. Un descubrimiento interesante era la mejora sustancial de los niveles de glicina arterial que se descubrió en el animal tratado con ornitina y fenilbutirato (Figura 29).

5 Al final del experimento la corteza frontal del cerebro se retiró y se midió el contenido de agua en el cerebro (Figura 30).

10 Un patólogo independiente describió la anatomía celular del cerebro en estos animales experimentales. Su informe se resume a continuación.

ALF: Microvasos con edema perivascular con vesículas circundantes. Neurona con cambios necróticos rodeada de vesículas.

15 ALF + O + P: Microvasos con edema perivascular con vesículas circundantes (menos que de ALF sin ningún tratamiento). Edema intracelular.

Simulado: Tejido cerebral con cambios ultraestructurales mínimos = tejido cerebral normal.

## 20 Conclusiones

25 Los inventores han descubierto que la simulación de algunos de los síntomas de un ataque agudo asociado con hepatopatía crónica, tales como aumentar la concentración de amoniaco o simular una hemorragia gastrointestinal, da como resultado la reducción de la función de neutrófilos y esta reducción puede invertirse parcialmente mediante ornitina o isoleucina. El rescate de la función de neutrófilos mediante ornitina e isoleucina desempeña un papel importante en la prevención de sepsis que es un factor desencadenante común en el avance de la descompensación hepática.

30 Además, los inventores han descubierto que la isoleucina no afecta al aumento de la concentración de amoniaco después de una hemorragia gastrointestinal simulada. Por lo tanto, al contrario que la hipótesis de que los niveles de amoniaco disminuirán después de la administración de isoleucina debido a la estimulación de la síntesis de proteínas, los niveles de amoniaco no resultan afectados. Por lo tanto, el uso de isoleucina junto con ornitina, que se sabe que rebaja los niveles de amoniaco, es particularmente ventajoso.

35 Por lo tanto, la administración de ornitina e isoleucina previene las consecuencias metabólicas de una hemorragia gastrointestinal. El aumento de los niveles de amoniaco se mitiga, la deficiencia de isoleucina se corrige y la función de neutrófilos es rescatada. El uso combinado de ornitina e isoleucina proporciona, por lo tanto, un nuevo tratamiento para pacientes después de un evento desencadenante para prevenir que se produzca la descompensación hepática.

40 Los inventores han descubierto, además, que L-aspartato de L-ornitina (LOLA), que se usa para reducir el amoniaco en pacientes con encefalopatía hepática, no invierte el efecto de amoniaco sobre la función de neutrófilos. Por lo tanto, el uso de ornitina en solitario es más ventajoso que el uso de LOLA, puesto que la ornitina puede reducir el amoniaco y rescatar la función de neutrófilos. Además, el componente de aspartato de LOLA se acumula en el cuerpo. Esta acumulación de aspartato puede ser verdaderamente perjudicial para los pacientes, dado que el aspartato empeora el efecto del amoniaco sobre la función de neutrófilos, reduciendo además la función de neutrófilos. Por consiguiente, la prevención o el retraso del inicio de descompensación hepática puede conseguirse usando ornitina junto con isoleucina, preferiblemente en ausencia de aspartato.

50 Además, los inventores han descubierto que el tratamiento de pacientes con encefalopatía hepática (HE) con L-aspartato de L-ornitina (LOLA) reduce los niveles de amoniaco y, como consecuencia, aumenta los niveles de glutamina. Sin embargo, la glutamina es solamente un amortiguador del amoniaco temporal, dado que puede reciclar y regenerar amoniaco en el riñón y el intestino delgado. Por lo tanto, el tratamiento con LOLA en solitario puede conducir a un aumento secundario de los niveles de amoniaco, contribuyendo adicionalmente a la patología de encefalopatía hepática.

60 El uso de fenilacetato o fenilbutirato en niños con trastornos del ciclo de la urea reduce los niveles anormalmente altos de glutamina. Por el contrario, los pacientes que padecen HE tienen niveles normales de glutamina a menos que, como se muestra en el Ejemplo 1, estén siendo tratados con LOLA que reduce los niveles de amoniaco pero aumenta los niveles de glutamina. Por lo tanto, el uso de fenilacetato y/o fenilbutirato permite la retirada de glutamina para prevenir el aumento secundario de los niveles de amoniaco en pacientes con HE.

65 Por consiguiente, un tratamiento mejorado para encefalopatía hepática puede conseguirse mediante administración de ornitina junto con al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato, preferiblemente en ausencia de aspartato.

5 Nuestras exhaustivas investigaciones en modelos animales y también en seres humanos con cirrosis apoyan el punto de vista de que el principal órgano que retira amoniaco en pacientes con cirrosis es el músculo, convirtiendo el amoniaco en glutamina, una reacción en la que se utiliza glutamato. En el fallo hepático, la enzima responsable de esta reacción, la glutamina sintetasa, se induce y la provisión de glutamato aumentaría la destoxicación de amoniaco.

10 La ornitina, un precursor de glutamato, destoxifica el amoniaco mediante la transformación en glutamina. Sin embargo, nuestros estudios preliminares han demostrado que esta glutamina, recircula y regenera el amoniaco. Nuestra investigación proporciona un nuevo método para, no solamente, destoxificar amoniaco en glutamina sino también para eliminar el exceso de glutamina que se genera. Por lo tanto, OP reduce la concentración de amoniaco en pacientes con cirrosis e hiperamonemia de forma significativamente más marcada que cualquiera de ellos en solitario. El efecto es claramente sinérgico en lugar de aditivo. Además, el aumento postprandial de amoniaco es suprimido por la administración de OP. Esto puede permitir la alimentación de pacientes con cirrosis descompensada con dietas ricas en proteínas sin riesgo de hiperamonemia. La reducción de amoniaco estaba asociada con una mejoría en el estado mental. Esto consigue la reducción de la concentración de amoniaco previniendo un aumento de glutamina. Esto es coherente con la hipótesis de que la ornitina está impulsando la producción de glutamina en el músculo (atrapando de este modo 1 molécula de amoniaco) pero esta glutamina se excreta (posiblemente como un aducto de fenilacetato) previniendo un aumento de glutamina sistémica, previniendo de este modo una hiperamonemia de rebote.

20 El conocimiento establecido de que fenilacetato reduce el amoniaco en el lactante hiperamoniémico que se presenta con trastornos del ciclo de la urea es que el amoniaco queda atrapado en glutamina y que la glutamina es transportada a los riñones para la excreción como el aducto fenilacetatoglutamina. Estos lactantes presentan amoniaco alto y, de forma importante, alta glutamina. A la inversa, el paciente cirrótico presenta alto amoniaco y glutamina de normal a baja. El modelo en cerdo descrito anteriormente no tiene una glutamina elevada y los niveles de amoniaco aumentan drásticamente después de que se aísla el hígado.

30 El tratamiento con ornitina en solitario aumenta la glutamina en sangre mientras que los niveles de amoniaco no resultan afectados. El fenilbutirato en solitario aumenta marginalmente la glutamina y de nuevo tiene efectos insignificantes sobre los niveles de amoniaco. Muy al contrario, en este modelo catastrófico de aumento a escala de hiperamonemia, la combinación de ornitina y fenilbutirato (OP) produce una apreciable reducción en el amoniaco circulante y mejora el aumento de glutamina observado con ornitina en solitario. La glicina, un aminoácido que genera amoniaco aumentó en todos los animales, sin embargo, el aumento de este aminoácido se mitigó sustancialmente solamente en el animal tratado con OP, sugiriendo un beneficio adicional para esta forma de intervención. Una consecuencia establecida del amoniaco elevado es el edema cerebral a medida que el contenido de agua del cerebro aumenta. El cerebro de cerdos tratados con ornitina en solitario muestra un considerable aumento del contenido de agua mientras que ornitina y fenilbutirato combinados reducen el contenido de agua en el cerebro. Histológicamente, existe una lesión menos evidente en la microestructura del cerebro del animal con tratamiento de ornitina y fenilbutirato combinados en comparación con el animal tratado con placebo.

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para administración a un ser humano, que comprende ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato en una proporción en peso de 2:1 a 1:2.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además isoleucina.
- 10 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha isoleucina está presente como un aminoácido monomérico libre o sal fisiológicamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que no comprende sustancialmente ningún otro aminoácido.
- 15 5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que no comprende sustancialmente aspartato o no comprende aspartato.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha ornitina está presente como un aminoácido monomérico libre o sal fisiológicamente aceptable.
- 20 7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha ornitina es L-ornitina.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato está presente como fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico.
- 25 9. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está formulada para administración intravenosa u oral.
- 30 10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que está formulada para administración intraperitoneal, intragástrica o intravascular.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato es fenilacetato.
- 35 12. Una composición farmacéutica para administración a un ser humano, que está constituida por ornitina y al menos uno de fenilacetato y fenilbutirato en una proporción en peso de 2:1 a 1:2.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende de 1 g a 50 g de ornitina y de 1 g a 50 g de fenilacetato o fenilbutirato.
- 40 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende de 5 g a 30 g de ornitina y de 5 g a 30 g de fenilacetato o fenilbutirato.

Figura 1

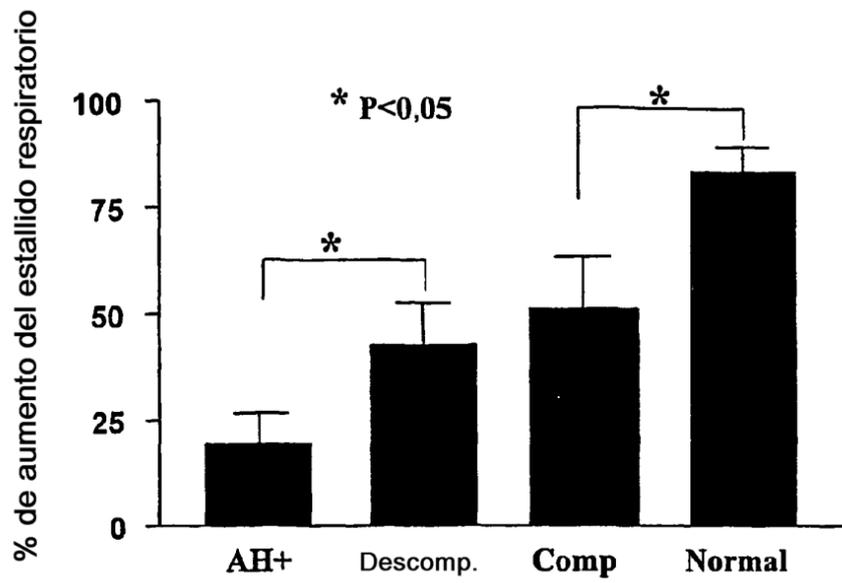
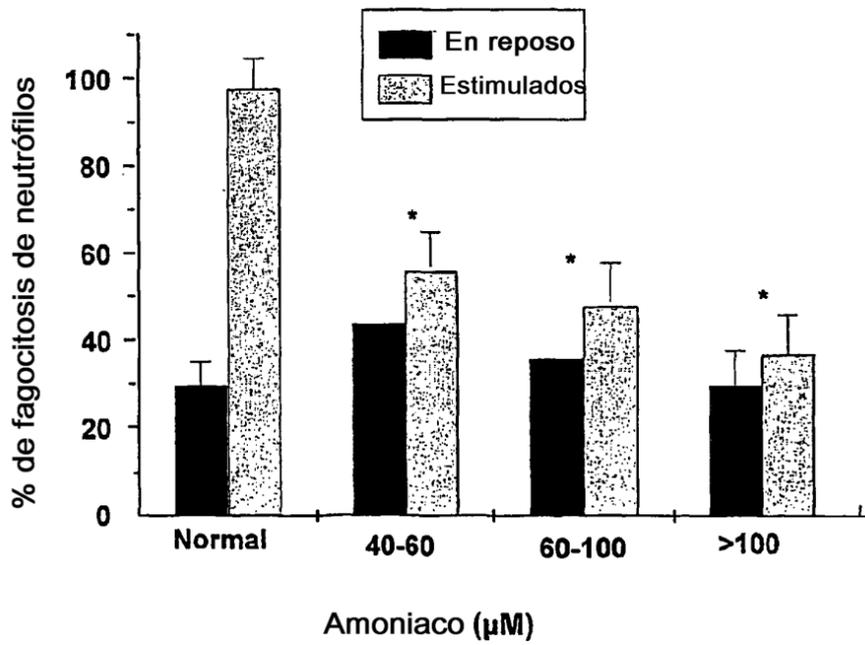
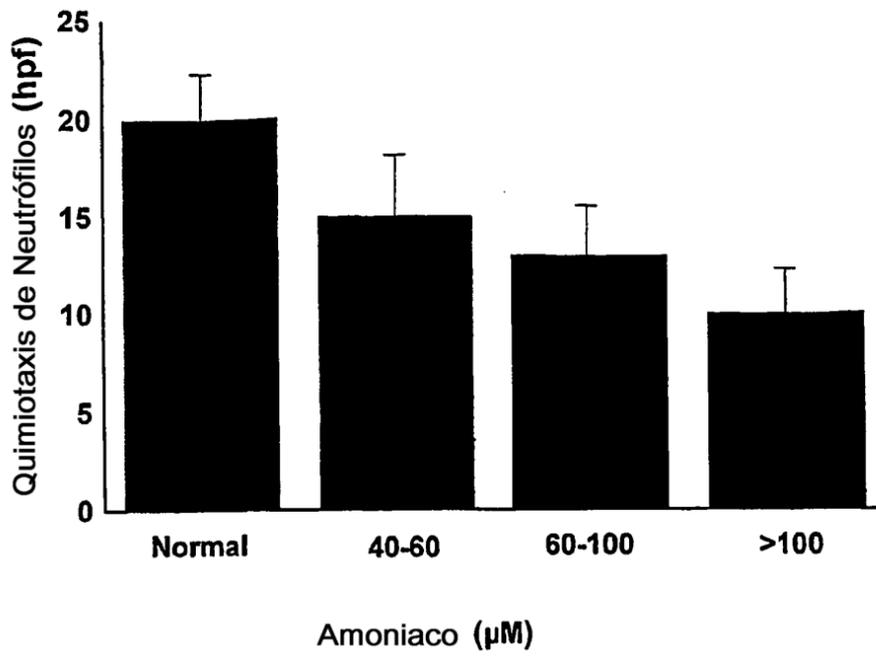


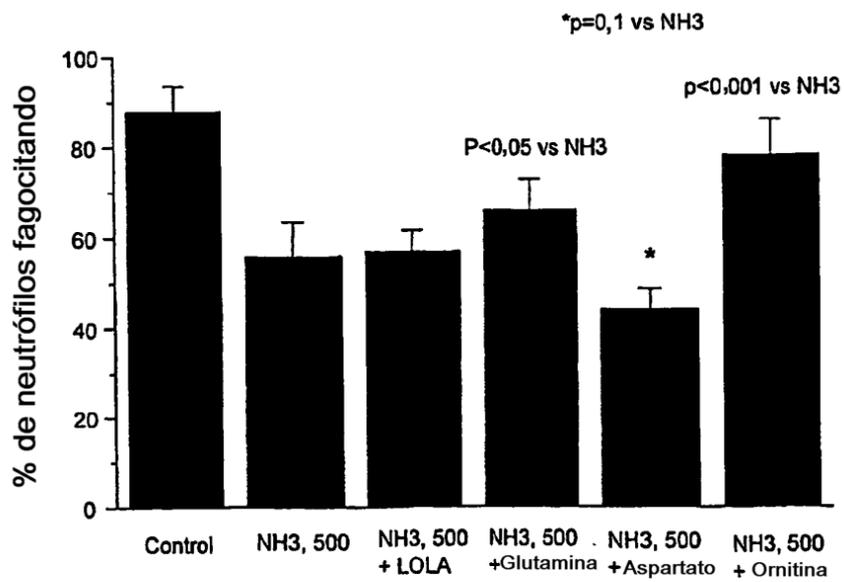
Figura 2



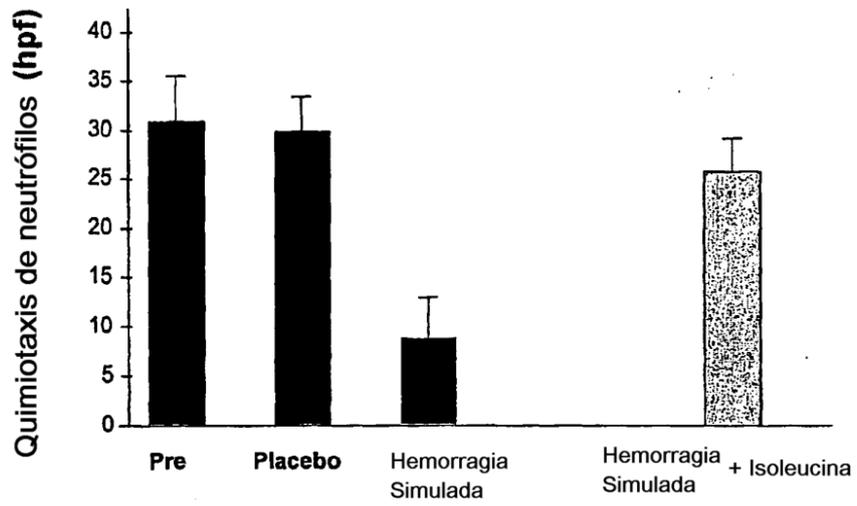
**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

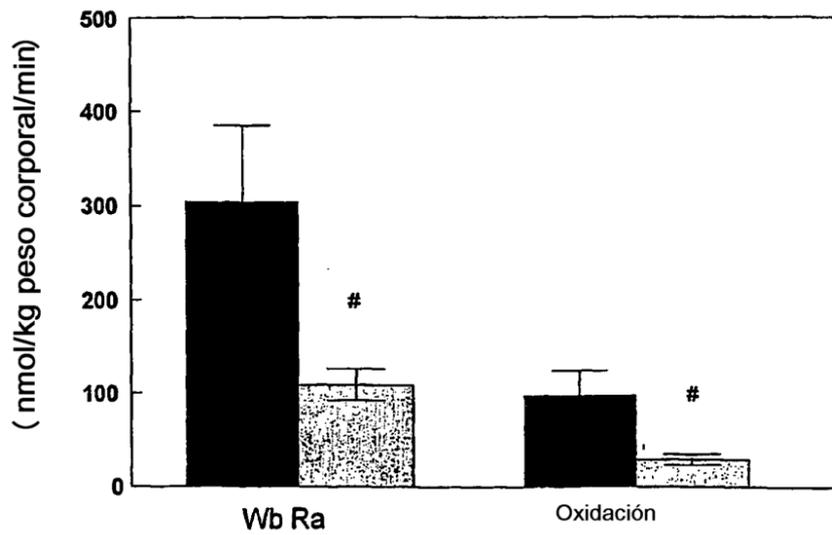


Figura 7

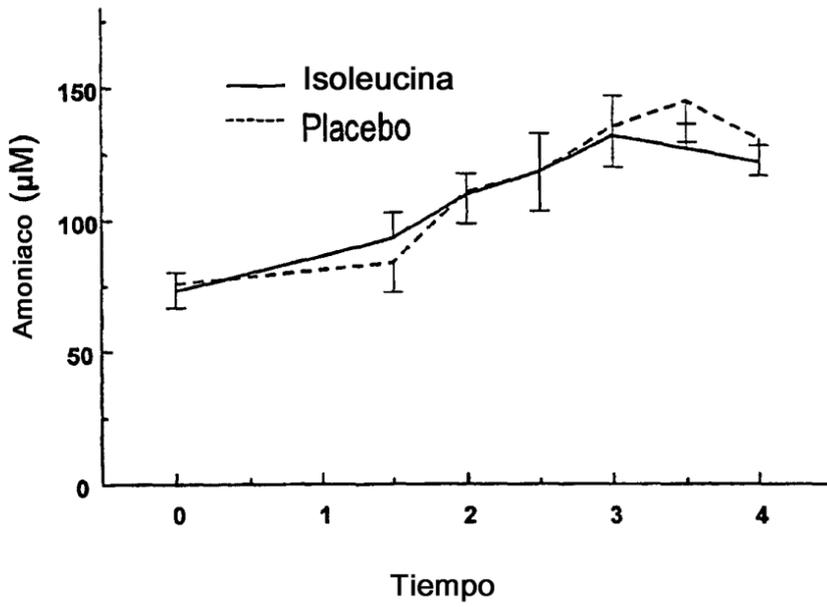


Figura 8

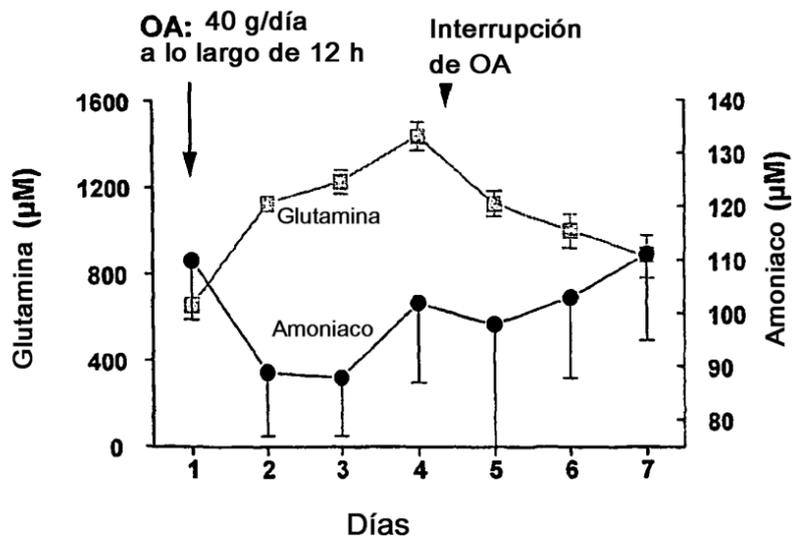


Figura 9

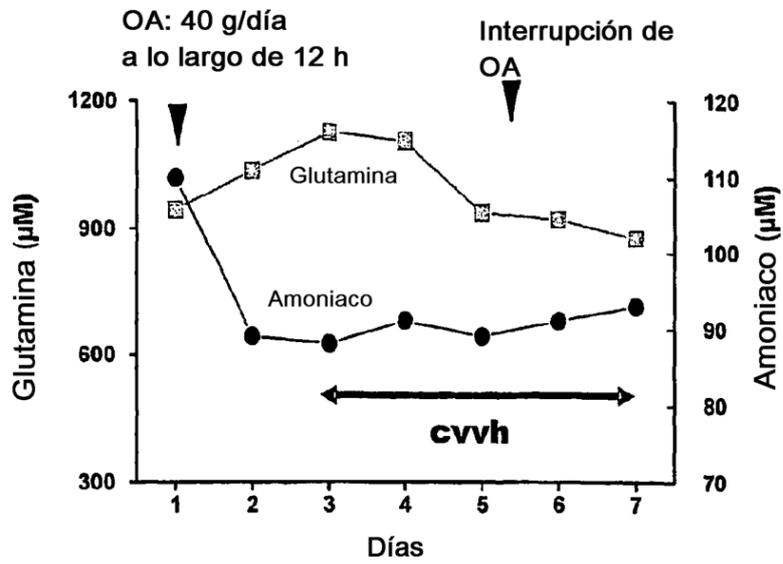


Figura 10

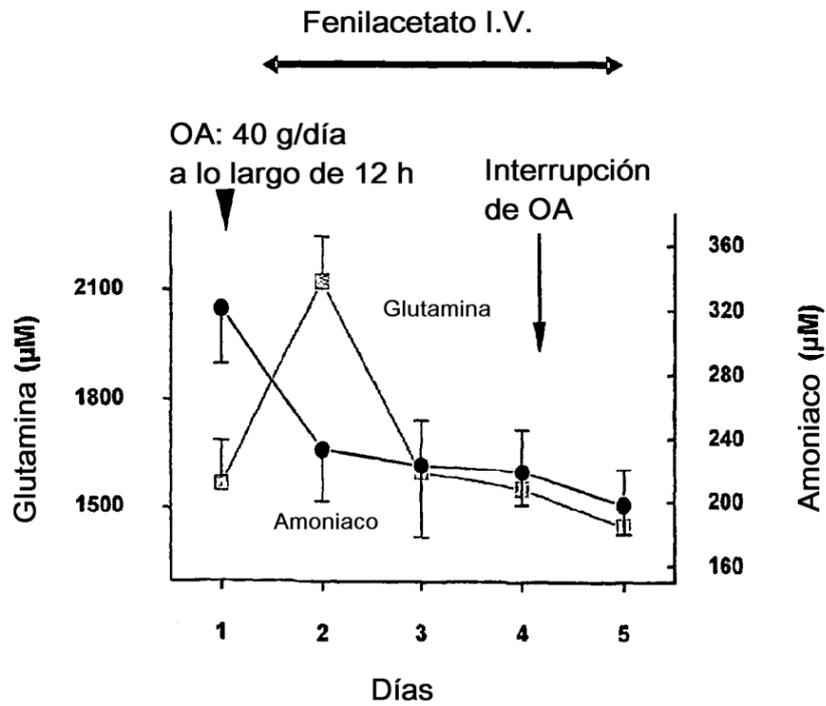


Figura 11

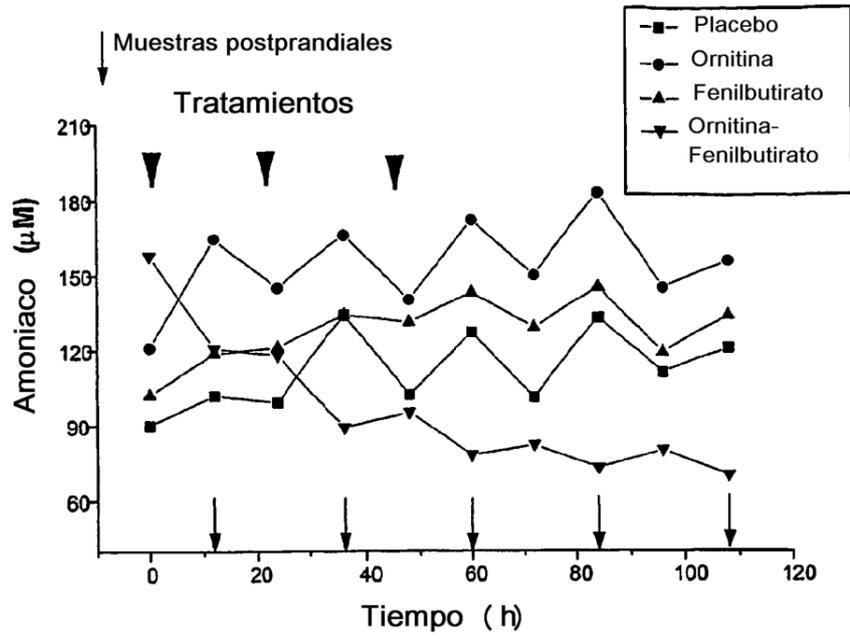


Figura 12

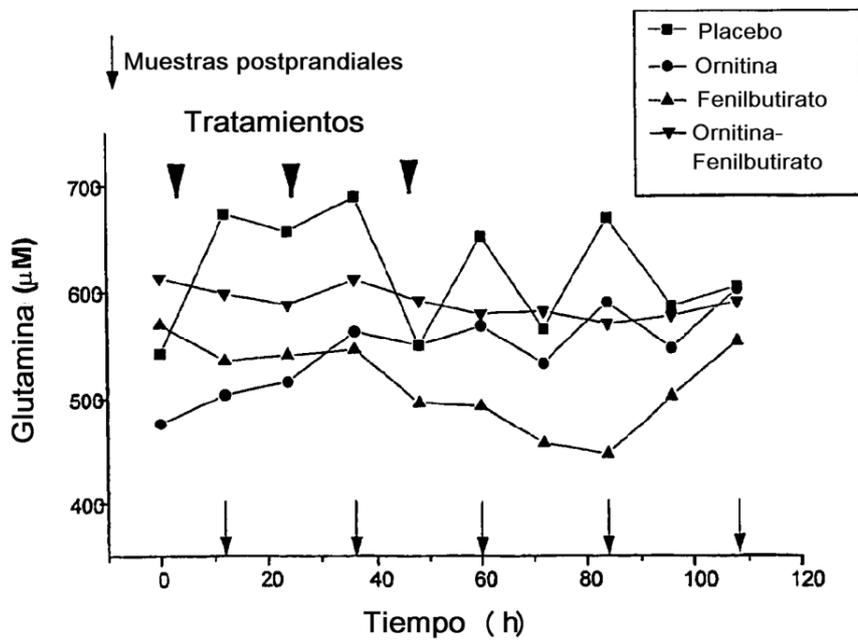


Figura 13

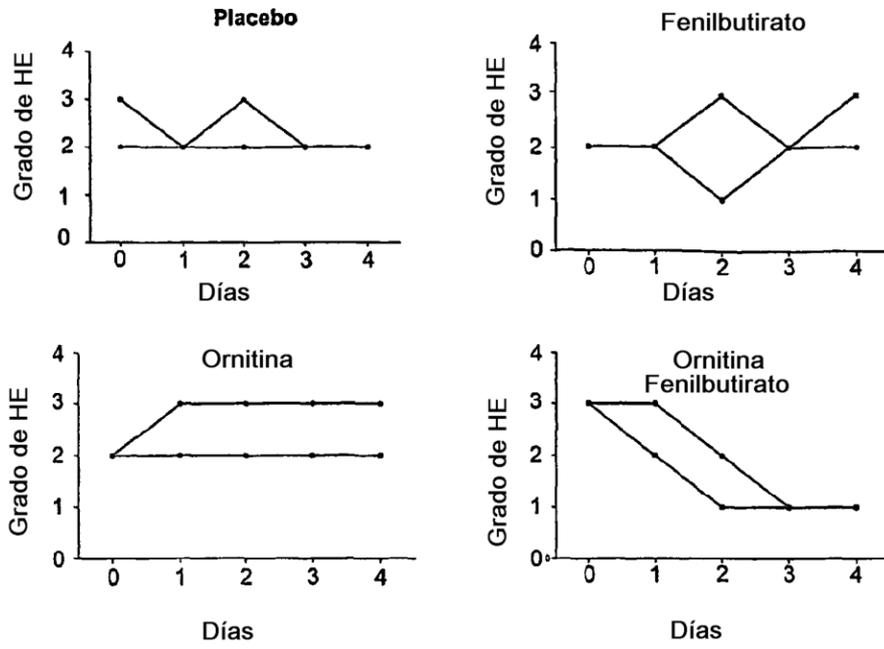


Figura 14

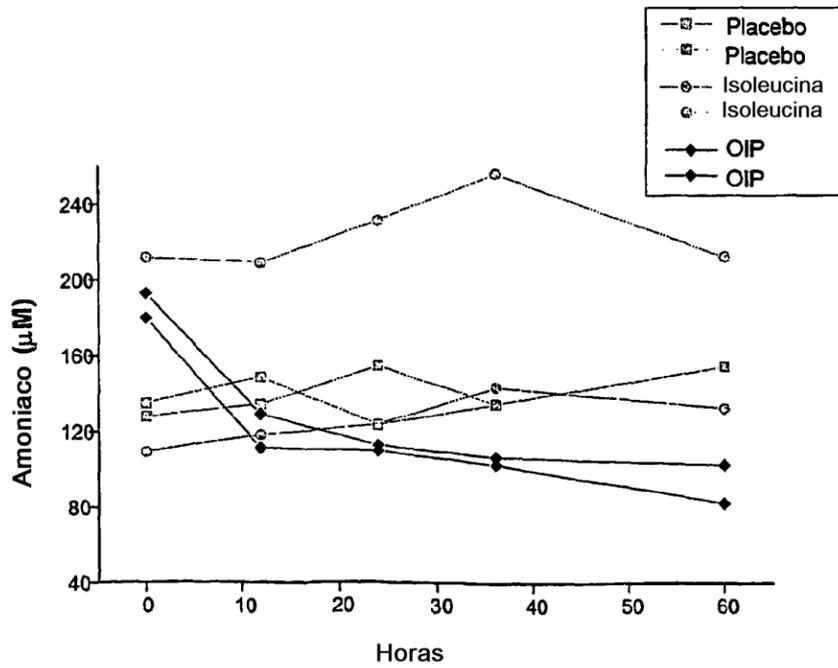


Figura 15

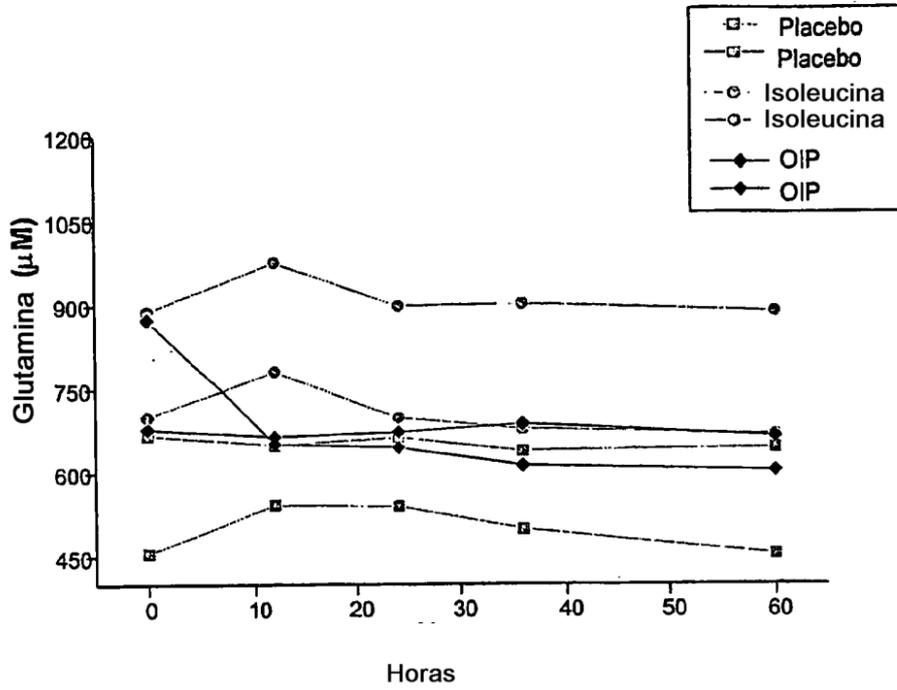


Figura 16

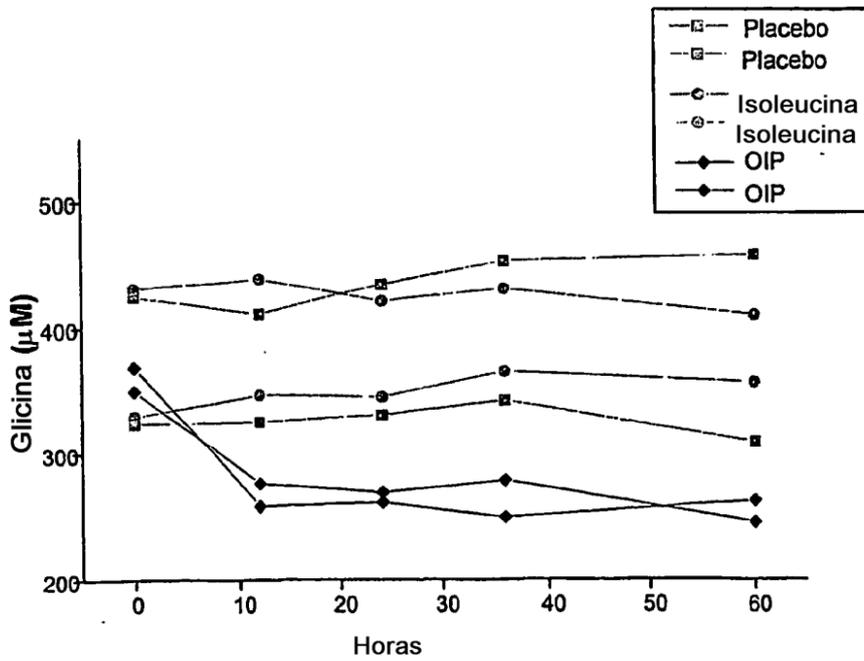


Figura 17

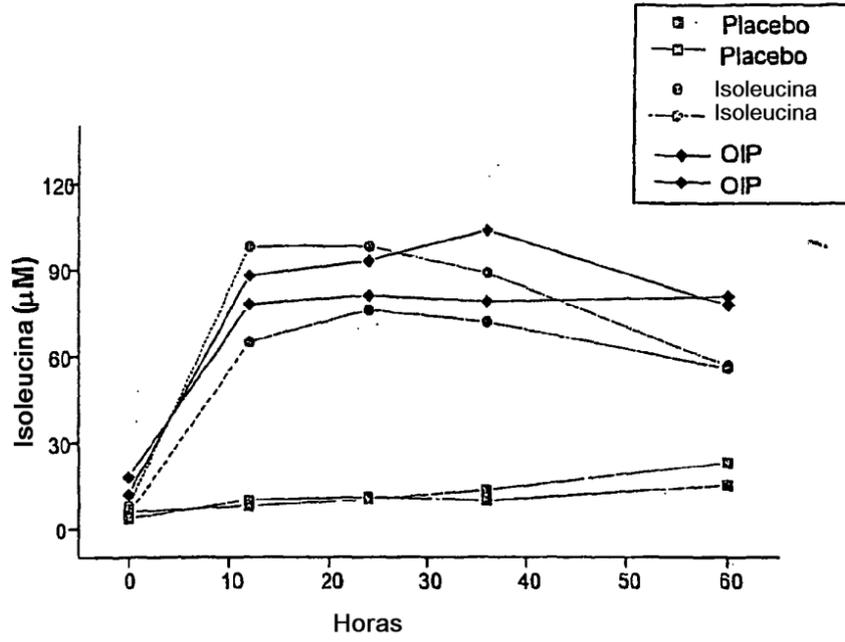


Figura 18

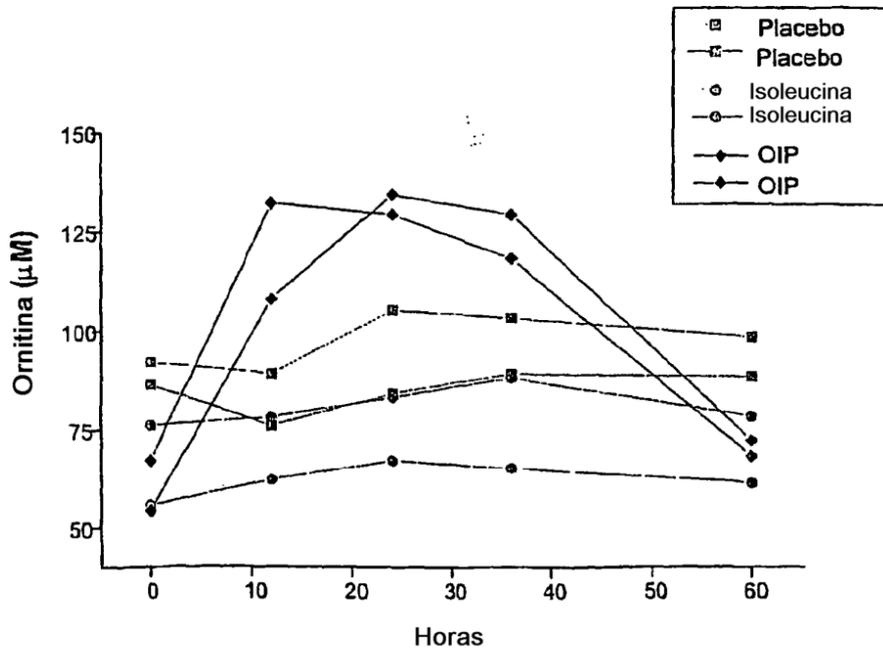


Figura 19

Amoniaco arterial en ratas con BDL

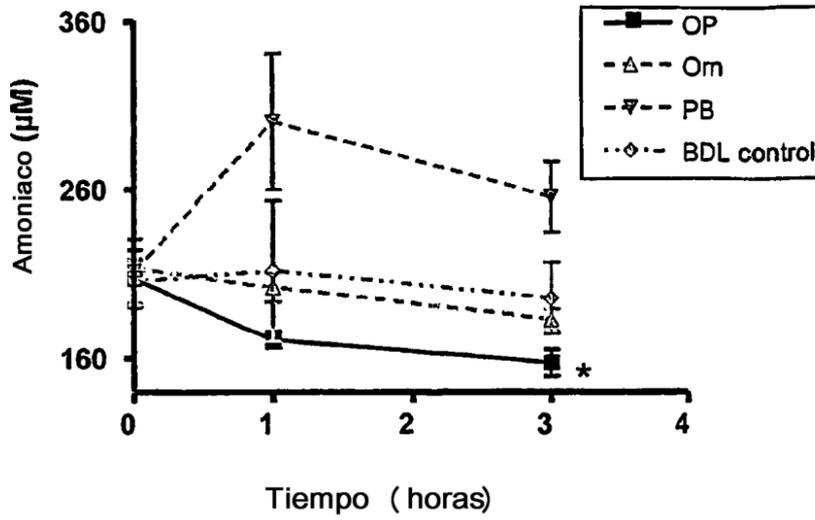


Figura 20

Ornitina en Plasma ( $\mu\text{M}$ )

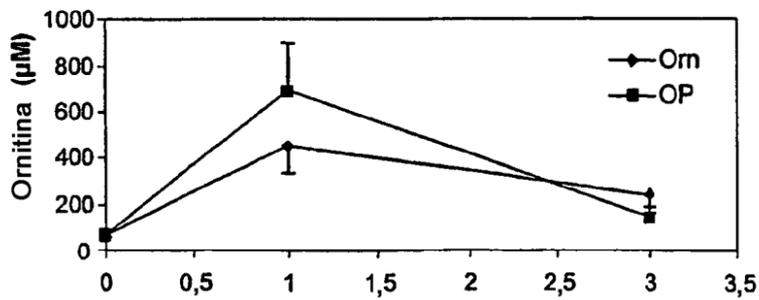


Figura 21

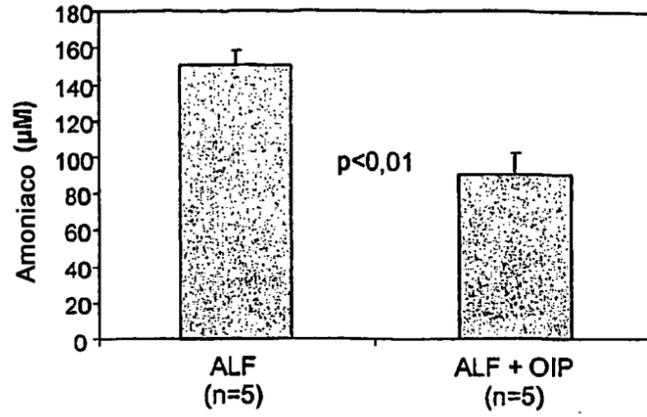


Figura 22

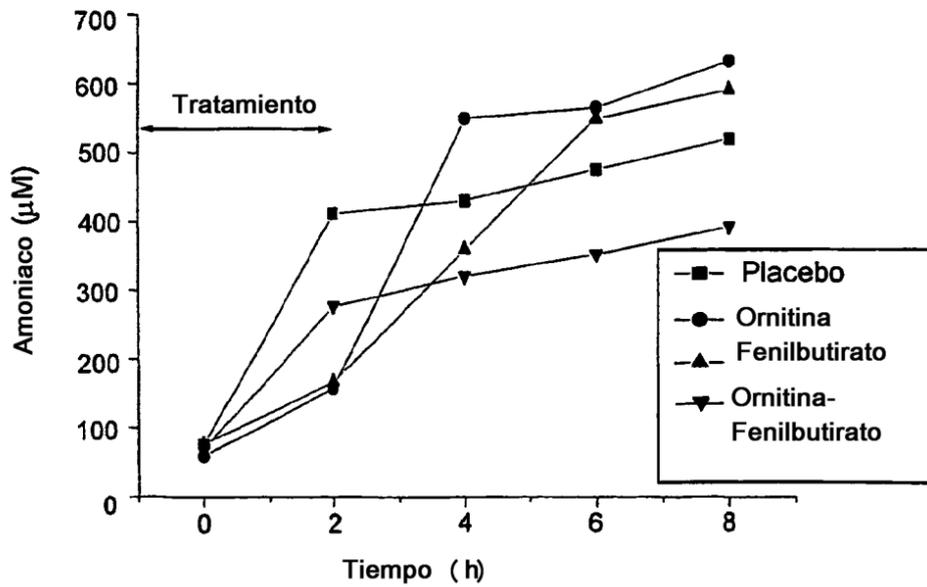


Figura 23

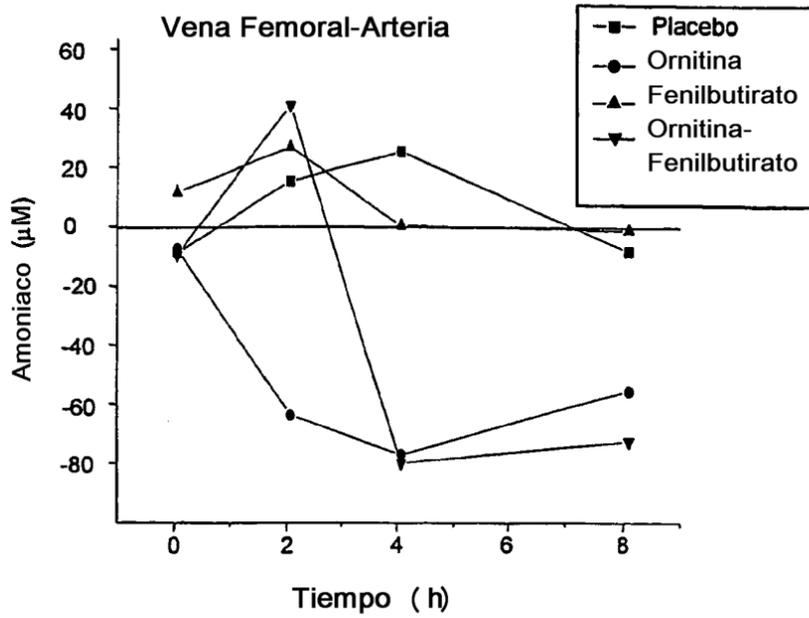
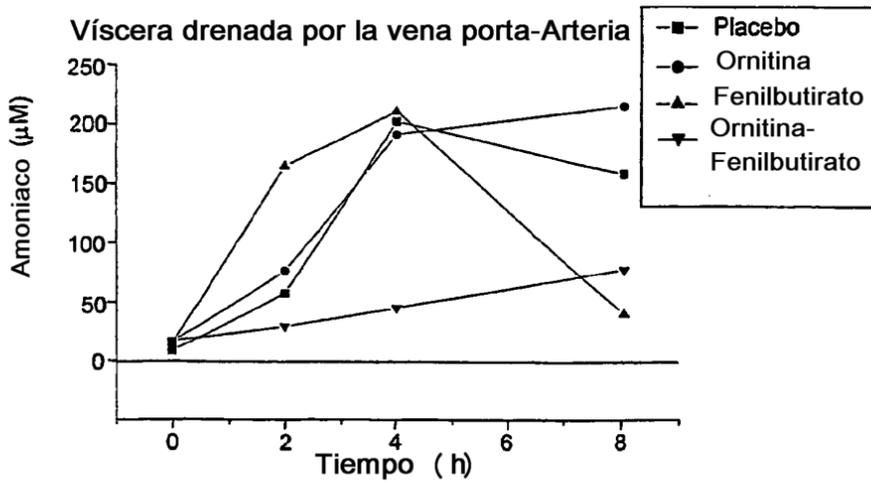
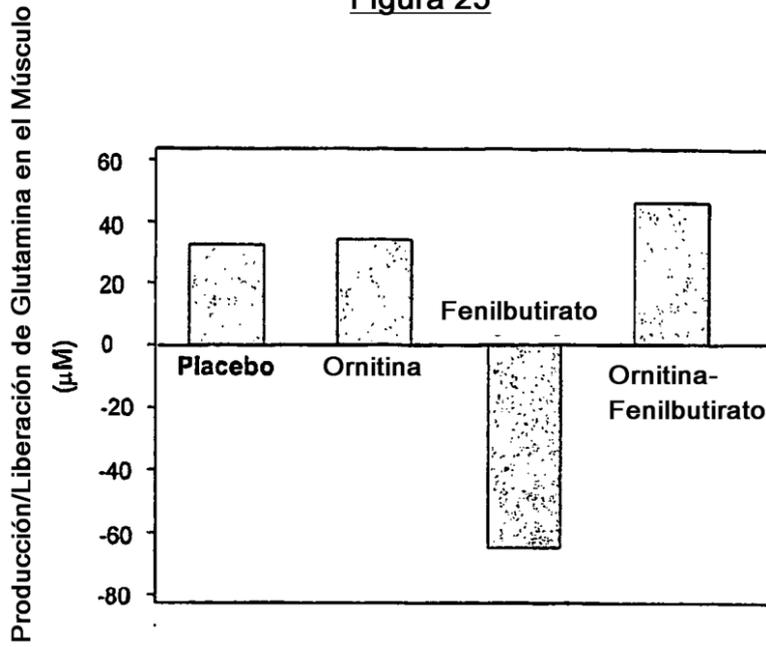


Figura 24



**Figura 25**



**Figura 26**

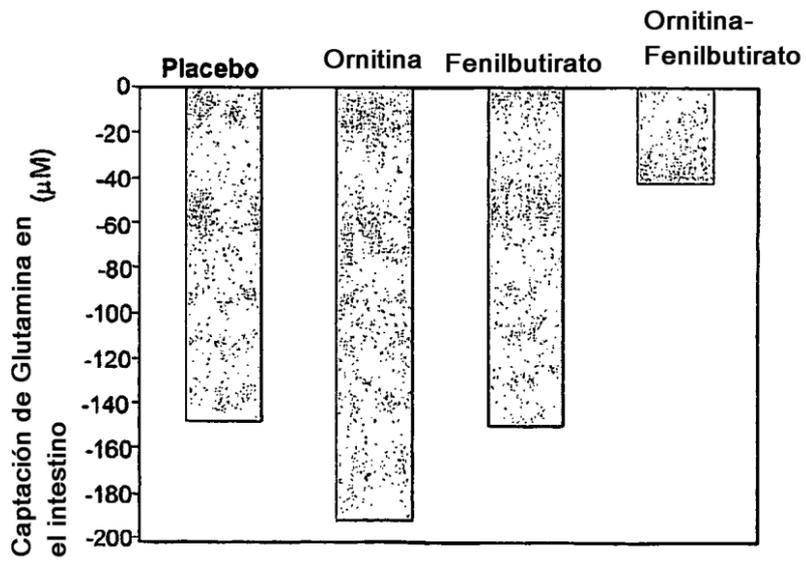


Figura 27

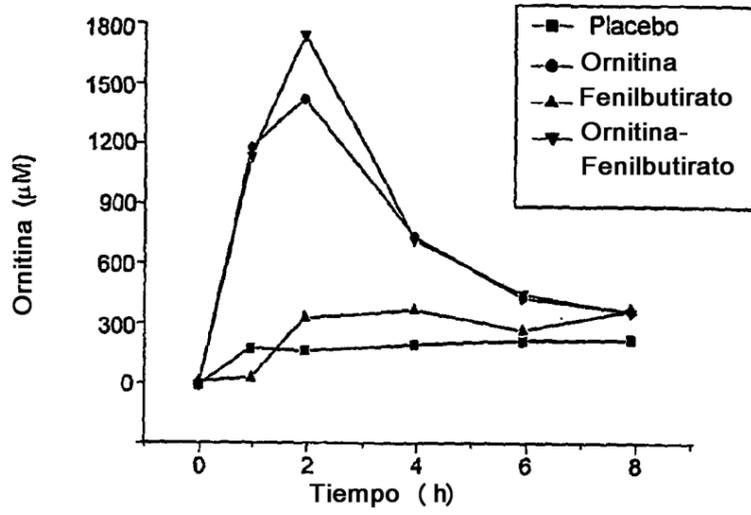


Figura 28

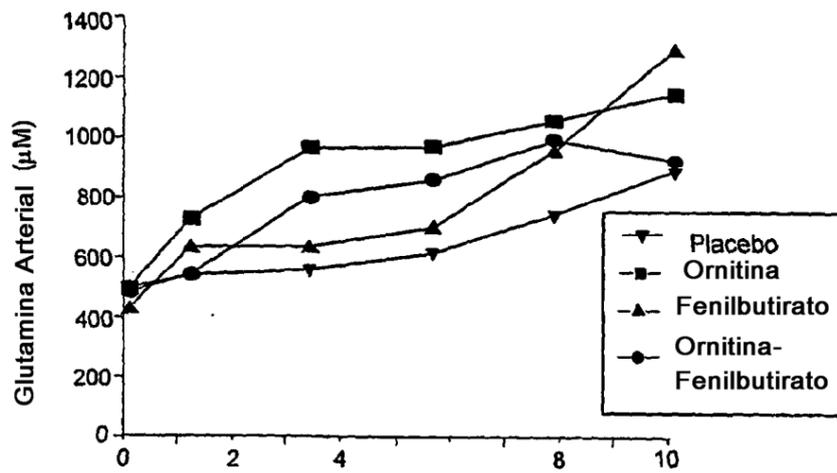


Figura 29

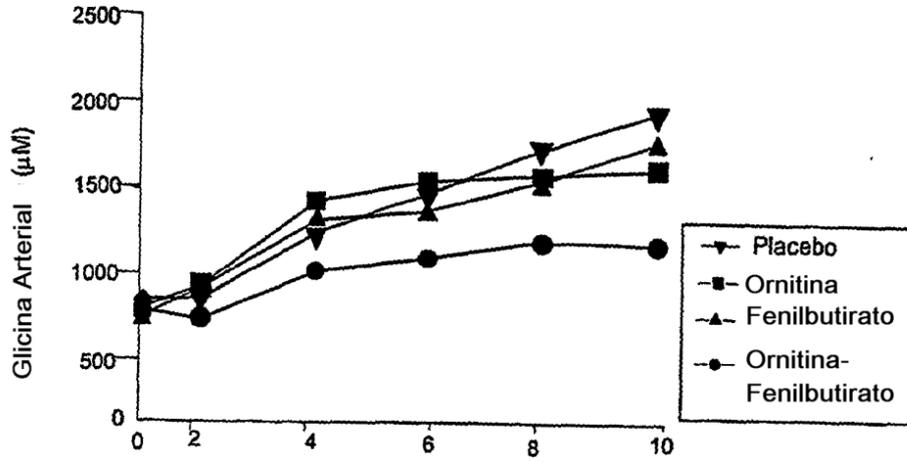


Figura 30

