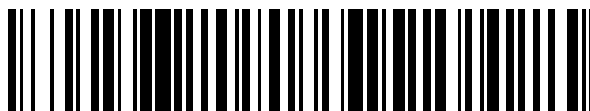


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 340**

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10786721 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2440200**

54 Título: **Tratamiento de la hipertensión portal usando L-ornitina y fenilacetato**

30 Prioridad:

08.06.2009 US 185158 P

19.01.2010 US 296377 P

09.09.2009 US 240748 P

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

03.11.2014

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (50.0%)

The Network Building 97 Tottenham Court Road

London W1T 4TP, GB y

OCERA THERAPEUTICS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

JALAN, RAJIV y

ANDERSON, KEITH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 517 340 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

Tratamiento de la hipertensión portal usando L-ornitina y fenilacetato

5 ANTECEDENTES

Campo

10 La presente solicitud se refiere a los campos de la química farmacéutica, la bioquímica y la medicina. Un aspecto se refiere al tratamiento y/o prevención de la hipertensión portal usando L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato. Otro aspecto se refiere a la recuperación de la función hepática en un paciente que sufre de hipertensión portal usando L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato.

Descripción de la técnica relacionada

15 La hipertensión portal es un aumento de la presión sanguínea dentro de la vena porta y sus afluentes. Es una afección que puede desarrollarse en pacientes con enfermedad hepática como cirrosis y fibrosis hepática. La hipertensión portal también puede estar causada por cicatrización hepática, trombosis o formación de coágulos en la vena porta.

20 Diversas estrategias de prevención, tratamiento y gestión de la hipertensión portal están actualmente en desarrollo dependiente de la intensidad de los síntomas. Existe una necesidad de terapias adicionales para tratar las afecciones anteriores.

25 RESUMEN

30 Algunas realizaciones se refieren al tratamiento de la hipertensión portal en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, reduciendo de este modo la hipertensión portal. En particular, la invención proporciona una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, para su uso en el tratamiento de la hipertensión portal, en el que el sujeto sufre preferiblemente una enfermedad hepática, una enfermedad hepática crónica, cirrosis o una insuficiencia hepática aguda.

35 Algunas realizaciones se refieren al retraso o reducción de la probabilidad de desarrollo de hipertensión portal en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, retrasando de este modo la aparición de la hipertensión portal. En particular, la invención proporciona una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, para su uso en el retraso o reducción de la probabilidad de desarrollo de hipertensión portal, en el que el sujeto sufre preferiblemente una enfermedad hepática, una enfermedad hepática crónica, cirrosis o una insuficiencia hepática aguda.

40 Algunas realizaciones se refieren a la recuperación de la función hepática en un sujeto que presenta una mala función hepática, que comprende la administración al sujeto de L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, reduciendo de este modo la hipertensión portal. En particular, la invención proporciona una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato para su uso en la recuperación de la función hepática en un sujeto, en el que el sujeto padece hipertensión portal.

45 Algunas realizaciones se refieren al tratamiento de la hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas en un sujeto que sufre hipertensión portal, que comprende la administración al sujeto de L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, reduciendo de este modo la hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas.

50 Algunas realizaciones se refieren al tratamiento de la ascitis en un sujeto que sufre hipertensión portal, que comprende la administración al sujeto de L-ornitina en combinación con al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, reduciendo de este modo la ascitis.

55 En particular, la invención proporciona una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, para su uso en el tratamiento de la hipertensión relacionada con hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas o ascitis en un sujeto, donde el sujeto sufre preferiblemente una enfermedad hepática,

una enfermedad hepática crónica, cirrosis o una insuficiencia hepática aguda.

En algunas realizaciones, el sujeto sufre de hipertensión portal. En algunas realizaciones, el sujeto con hipertensión portal también sufre una enfermedad hepática, como la cirrosis. En algunas realizaciones, el sujeto sufre enfermedad hepática. En algunas realizaciones, el sujeto con enfermedad hepática también sufre hipertensión portal. En algunas realizaciones, la enfermedad hepática en una enfermedad hepática crónica (por ejemplo, cirrosis) o una insuficiencia hepática aguda. En algunas realizaciones, el tratamiento de la hipertensión portal se consigue reduciendo el nivel de citoquinas proinflamatorias en el sujeto. En algunas realizaciones, el tratamiento de la hipertensión portal se consigue aumentando la actividad óxido nítrico sintetasa endotelial. En algunas realizaciones, la L-ornitina y el fenilacetato se administran como acetato de fenil L- ornitina. En algunos realizaciones, se administran al sujeto sales de L-ornitina fisiológicamente aceptables independientes y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato. En algunas realizaciones, la L-ornitina se administra como un aminoácido libre monomérico o una de sus sales fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato se administra como fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico. En algunas realizaciones, la administración es una administración oral, intravenosa, intraperitoneal, intragástrica o intravascular. En algunas realizaciones, mejorando la función hepática se reduce la hipertensión portal. En algunas realizaciones, la mejora de la función hepática comprende la mejora de la perfusión hepática. En algunas realizaciones, la dosis de la L-ornitina y el fenilacetato o fenilbutirato administrada está entre 20 g y 40 g.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1A-D. Expresión plasmática y de TNF- α : muestra que comparado con los controles pseudooperados, se observó **A**) un aumento significativo en plasma de TNF- α en ratas con ligadura del conducto biliar (LCB) (*p<0,05), que aumentaba notablemente mediante la administración de lipopolisacárido (LPS) (###p<0,01) y mejoría mediante la administración del tratamiento con L-ornitina fenilacetato (OF); **B**) un aumento significativo en el TNF- α en cerebro en ratas LCB (p<0,05), que aumentaba notablemente mediante la administración de LPS (#p<0,05) y mejoría mediante la administración de tratamiento OF (°p<0,05); **C**) un aumento prácticamente significativo en la IL-6 en plasma de ratas LCB se observó mediante la administración de OF (###p<0,01) y **D**) aunque se observó una tendencia similar en las concentraciones de IL-6 en cerebro con ratas LCB y la intervención del tratamiento con OF no conseguía alcanzar significación.

Figura 2A-B. Expresión de iNOS y NFkB en cerebro: se muestra que comparado con los controles pseudooperados, se observó **A**) un aumento significativo en la expresión de la proteína iNOS en cerebro en ratas LCB (***p<0,01), que mejoraba mediante la administración de OF (°p<0,01) y **B**) un aumento significativo en NFkB en ratas con LCB (***p<0,05) que también mejoraba mediante la administración de OF (°°°p<0,01). Estos se asociaron con una reducción significativa en el TNF α , IL-1 β e IL-6 arterial y de cerebro en animales tratados con OF.

Figura 3A-B. Niveles de TNF- α en plasma y cerebro: se muestra que comparado con controles pseudooperados, se observó **A**) una elevación significativa en el nivel de TNF- α en plasma de ratas LCB, que se revertía mediante la administración de OF y **B**) una elevación significativa en el nivel de TNF- α en plasma de ratas LCB, que también se revertía mediante la administración de OF.

Figura 4A-C. Actividad y expresión de la proteína eNOS y expresión de la proteína iNOS: se muestra que comparado con controles pseudooperados se observó **A**) una disminución significativa en la actividad eNOS en ratas LCB, que se revierte mediante la administración de OF; **B**) un aumento en la expresión de proteína eNOS en ratas LCB y **C**) un aumento significativo en la expresión de proteína iNOS en ratas LCB.

Figura 5A-C. Expresión de ADMA en plasma y de la proteína caveolina-1 cerebral: se muestra que comparado con controles pseudooperados se observó **A**) un aumento significativo en la ADMA en plasma en el plasma de ratas LCB, que no se reducía significativamente tras la administración de OF, **B**) un aumento significativo en ADMA plasmática en homogeneizados de cerebro de ratas LCB, que se reducía significativamente mediante la administración de OF y **C**) un aumento significativo en la expresión de proteína caveolina-1 en cerebro en ratas LCB, que se revertía con la administración de OF.

Figura 6A-C. Expresión y actividad de proteínas DDAH-1 y DDAH-2 en cerebro: se muestra que comparado con controles pseudooperados, se observó **A**) una disminución significativa en la expresión de la proteína DDAH-1 de cerebro en ratas LCB, que se revertía mediante la administración de OF; **B**) un aumento significativo en la expresión de la proteína DDAH-2 de cerebro en ratas LCB, que se revertía mediante la administración de OF y **C**) un aumento significativo en la actividad DDAH en cerebro de ratas LCB, que se revertía mediante la administración de OF.

Figura 7A-F. Actividad y expresión de proteína eNOS, expresión de proteínas DDAH-1, NFκB, caveolina-1 hepática y presión portal: se muestra que comparado con controles pseudooperados, se observó **A)** un aumento significativo en la actividad eNOS en ratas LCB, que también se revertía mediante la administración de OF, **B)** un aumento significativo en la expresión de la proteína eNOS en ratas LCB, que también se revertía mediante la administración de OF; **C)** un aumento significativo en la expresión de la proteína DDAH-1 en ratas LCB, que se revertía mediante la administración de OF; **D)** un aumento significativo en la expresión de la proteína NFκB en ratas LCB y el aumento se reducía significativamente mediante la administración de OF; **E)** un aumento significativo en la expresión de la proteínas caveolina-1 en ratas LCB y el aumento se redujo significativamente mediante la administración de OF y **F)** un aumento significativo en la presión portal en ratas LCB y la administración de OF daba lugar a una reducción del 30% de la presión portal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 Definiciones

Según se usa en este documento, un «sujeto» se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. «Animal» incluye vertebrados e invertebrados de sangre fría y caliente como peces, crustáceos, reptiles y, en particular, mamíferos. «Mamífero» incluye, sin limitaciones, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, primates, como monos, chimpancés y macacos y, en particular, humanos.

Según se usa en este documento, un «paciente» se refiere a un sujeto que está siendo tratado por un profesional de la medicina como un doctor en medicina (es decir, doctor en medicina alopática, o doctor en medicina osteopática) o un doctor en medicina veterinaria, para intentar curarlo o al menos aminorar los efectos de una enfermedad o trastorno en particular o para prevenir que se produzca una enfermedad o trastorno en primer lugar.

Según se usa en este documento, «administración» o «administrar» se refiere a un procedimiento para administrar una dosis de un principio farmacéuticamente activo a un vertebrado.

Según se usa en este documento, una «dosis» se refiere a una cantidad de agente terapéutico administrado a un paciente.

Según se usa en este documento, una «dosis diaria» se refiere a la cantidad total de agente terapéutico administrado a un paciente durante un día.

Según se usa en este documento, el término «agente terapéutico» significa una sustancia que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad o afección.

Según se usa en este documento, «cantidad terapéuticamente eficaz» o «cantidad farmacéuticamente eficaz» significa una cantidad de agente terapéutico, que tiene un efecto terapéutico. Las dosis de un principio farmacéuticamente activo que son útiles en el tratamiento son cantidades terapéuticamente eficaces. Por tanto, según se usa en este documento, una cantidad terapéuticamente eficaz significa aquellas cantidades del fármaco que produce el efecto terapéutico deseado según la evaluación de los resultados de ensayos clínicos y/o estudios en modelos animales.

Según se usa en este documento, un «efecto terapéutico» alivia, en cierto grado, uno o más de los síntomas de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, puede observarse un efecto terapéutico mediante una reducción de las molestias subjetivas comunicadas por un sujeto (p. ej. reducción de las molestias apreciadas en un cuestionario autoadministrado por el paciente).

Abreviaturas

LCB = ligadura del conducto biliar;

OF = ornitina, fenilacetato;

LPS = lipopolisacárido;

iNOS = óxido nítrico sintetasa inducible

eNOS = óxido nítrico sintetasa endotelial

Hipertensión portal

5

La hipertensión portal es un aumento de la presión dentro de la vena porta (vena que lleva la sangre de los órganos digestivos al hígado). Entre los principales síntomas y complicaciones de la hipertensión portal se incluyen, pero sin limitaciones, hemorragia gastrointestinal, por ejemplo heces negras y pegajosas o sangre en las heces, o vómitos de sangre debido a la rotura espontánea y hemorragia debido a varices; ascitis, por ejemplo, una acumulación de

10

líquido en el abdomen, encefalopatía, por ejemplo, confusión y falta de memoria causadas por una mala función hepática y el desvío del flujo sanguíneo fuera del hígado, y reducción de los niveles de plaquetas o disminución del recuento de leucocitos.

15

La hipertensión portal puede ser un síntoma o el resultado de una afección subyacente (p. ej., trastorno hepático) y, por tanto, un sujeto puede tener hipertensión portal que se asocia con una o más afecciones. En algunas realizaciones, la hipertensión portal se asocia con una enfermedad hepática.

20

Entre los ejemplos no limitantes de enfermedad hepática se incluyen colestasis intrahepática (síndrome de Allagile, cirrosis hepática biliar), hígado graso (hígado graso alcohólico, síndrome de Reye), trombosis venosa hepática, degeneración hepatolenticular, hepatomegalia, absceso hepático (absceso hepático amebico), cirrosis hepática (alcohólico, biliar y experimental), enfermedades hepáticas alcohólicas (hígado graso, hepatitis, cirrosis), parasítica (equinococosis hepática, fascioliasis, absceso hepático amebico), ictericia (hemolítica, hepatocelular y colestásico), colestasis, hipertensión portal, hipertrofia hepática, ascitis, hepatitis (hepatitis alcohólicas, hepatitis animal, hepatitis crónica (autoinmune, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, inducida por fármacos), hepatitis tóxica, hepatitis humana

25

vírica (hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E), enfermedad de Wilson, hepatitis granulomatosa, cirrosis biliar secundaria, encefalopatía hepática, varices, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, adenoma hepatocelular, hemangiomas, cálculos biliares, insuficiencia hepática (encefalopatía hepática, insuficiencia hepática aguda) y neoplasma hepáticas (angiomiolipoma, metástasis hepáticas calcificadas, metástasis hepáticas quísticas, tumores epiteliales, hepatocarcinoma fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, adenoma hepático,

30

cistadenoma hepatobiliar, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, hepatoma, cáncer hepático, hemangioendotelioma hepático, hamartoma mesenquimal, tumores hepáticos mesenquimales, hiperplasia regenerativo nodular, tumores hepáticos benignos (quistes hepáticos [quistes simples, enfermedad hepático poliquístico, cistadenoma hepatobiliar, quiste de colédoco], tumores mesenquimales [hamartoma mesenquimal, hemangioendotelioma infantil, hemangioma, peliosis hepática, lipomas, pseudotumor inflamatorio, misceláneo],

35

tumores epiteliales [epitelio conducto biliar (hamartoma del conducto biliar, adenoma del conducto biliar), hepatocito (adenoma, hiperplasia nodular focal, hiperplasia regenerativa nodular)], tumores hepáticos malignos [hepatocelular, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocelular, colangiocarcinoma, cistadenocarcinoma, tumores de los vasos sanguíneos, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma, otros tumores, sarcoma embrional, fibrosarcoma, leiomiomasarcoma, rabdomosarcoma, carcinosarcoma, teratoma, carcinoide, carcinoma epidermoide,

40

linfoma primario], peliosis hepática, porfiria eritrohepática, porfiria hepática (porfiria intermitente aguda, porfiria cutánea tarda), síndrome de Zellweger). En algunas realizaciones, el trastorno hepático es hepatitis, cirrosis, colestasis o insuficiencia hepática. En algunas realizaciones, un sujeto que sufre una enfermedad hepática tiene encefalopatía hepática.

45

En algunas realizaciones, la hipertensión portal se asocia con una enfermedad hepática crónica. En algunas realizaciones, la enfermedad hepática crónica es cirrosis. En la cirrosis, el tejido cicatricial bloquea el flujo de sangre a través del hígado lo que, por consiguiente, tiene como resultado una hipertensión portal. El aumento de la presión en la vena portal hace que se desarrollen venas de gran calibre (varices) a lo largo del esófago y del estómago para bordear el bloqueo. La presión en las varices aumenta y estas pueden romperse. En algunas realizaciones,

50

reduciendo la hipertensión portal se reduce la probabilidad de aparición de encefalopatía hepática.

55

La hipertensión portal también puede estar causada por trombosis o formación de coágulos en la vena porta. La hipertensión portal en humanos y animales de laboratorio puede asociarse con una circulación hiperkinética, vasodilatación en el territorio esplácnico y un hiperesplenismo. El hiperesplenismo puede producir una pancitopenia importante.

Tratamiento de la hipertensión portal

La L-ornitina se administra conjuntamente con fenilacetato o fenilbutirato a un sujeto para tratar y/o prevenir la

hipertensión portal. En algunas realizaciones, la L-ornitina se administra conjuntamente con fenilacetato o fenilbutirato a un sujeto para retrasar o reducir la probabilidad de desarrollar hipertensión portal. En algunas realizaciones, el tratamiento da lugar a la recuperación de la función hepática (p. ej., aumento de la perfusión hepática) y mejora, por tanto, la hipertensión portal. En algunas realizaciones, se produce una recuperación parcial de la función hepática. En algunas realizaciones, se produce una recuperación completa de la función hepática. La recuperación de la función hepática (p. ej., aumento de la perfusión hepática) puede estar indicada por una o más de las siguientes medidas: la prueba de la alanina transaminasa (ALT), prueba de la aspartato aminotransferasa (AST), prueba de la alfa glutatión S-transferasa (GST), prueba de la albúmina (Alb), prueba de tiempo de protrombina y puntuaciones compuesta (por ejemplo, puntuación de Child-Pugh, puntuación MELD). Adicionalmente, la hemodinámica hepática puede medirse detectando el flujo de sangre hepática y/o la presión portal.

En algunas realizaciones, la administración conjunta de L-ornitina y fenilacetato o fenilbutirato tiene como resultado la modulación de la actividad óxido nítrico sintetasa (eNOS) endotelial y, por tanto, el tratamiento o mejoría de uno o más síntomas asociados con la disminución de la actividad eNOS. En algunas realizaciones, la disminución de la actividad eNOS se asocia con un aumento de los inhibidores de la óxido nítrico sintetasa endógena, incluyendo caveolina-1 y dimetilarginina asimétrica (ADMA). En algunas realizaciones, la disminución de la actividad eNOS se asocia con un aumento de NF κ B. En algunas realizaciones, la disminución de la actividad eNOS se asocia con un aumento del amoníaco. En algunas realizaciones, la disminución de la actividad eNOS se asocia con una enfermedad hepática, incluyendo enfermedad hepática crónica (por ejemplo, cirrosis) e insuficiencia hepática aguda. En algunas realizaciones, la administración conjunta se usa para tratar la inflamación hepática. En algunas realizaciones, la administración conjunta se usa para mejorar la función de los sistemas orgánicos que presentan una alteración de la señalización de óxido nítrico en la enfermedad hepática (por ejemplo, cirrosis).

En algunas realizaciones, la administración conjunta es útil para reducir las citoquinas proinflamatorias, lo que además promueve su capacidad para tratar o reducir la probabilidad de hipertensión portal. En algunas realizaciones, se previene la hipertensión portal en pacientes con enfermedad hepática crónica existente como la cirrosis, mediante la administración de la combinación. Por tanto, en algunas realizaciones, la combinación se administra a un paciente con enfermedad hepática crónica que también padece hipertensión portal. En algunas realizaciones, la administración conjunta se utiliza para recuperar una función hepática parcial o completa.

Sin querer estar ligado a ninguna teoría en particular, en algunas realizaciones, la administración conjunta previene o alivia la afección de hipertensión portal mediante sus efectos sobre las vías inflamatorias. En algunas realizaciones, la disminución del nivel de citoquinas inflamatorias y/o de iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) tiene como resultado la recuperación parcial o total de la función hepática y el tratamiento de la hipertensión portal.

La L-ornitina y el fenilacetato o fenilbutirato puede administrarse independientemente o en una única forma de dosificación. En una realización, la combinación se administra como la sal fenilacetato de L-ornitina o como una solución de la sal fenilacetato de L-ornitina.

En la publicación de patente de EE. UU. N $^{\circ}$. US2008/0119554 y la solicitud de patente de EE. UU. N $^{\circ}$. 12/753763 presentada el 2 de abril de 2010 se describen diferentes formas de composición de L-ornitina en combinación con al menos uno entre fenilacetato (o sales de fenilacetato) y fenilbutirato. En algunas realizaciones, la L-ornitina y el fenilacetato se presentan y/o administran como fenilacetato de L-ornitina o su sal fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, la L-ornitina se presenta y/o administra como un aminoácido libre monomérico o una sal fisiológicamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato se presenta y/o administra como fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico. En algunas realizaciones, se administran al sujeto una sal de L-ornitina fisiológicamente aceptable y una sal fisiológicamente aceptable de al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato.

50 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva se refiere a una composición farmacéutica que comprende agentes tensioactivos, vehículos, diluyentes, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión, sustancias formadores de películas y auxiliares de recubrimiento fisiológicamente aceptables, o una combinación de los mismos, y un compuesto descrito en este documento. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 $^{\text{a}}$ Ed., Mack Publishing Co., Easton, FA (1990). En la composición farmacéutica pueden proporcionarse agentes conservantes, estabilizantes, colorantes, edulcorantes, fragancias y aromatizantes. Por ejemplo, pueden añadirse como conservantes benzoato sódico, ácido ascórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además,

pueden usarse agentes antioxidantes o de suspensión. En diversas realizaciones, pueden usarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similares como agentes tensioactivos; azúcar, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato de aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato cálcico, carbonato ácido de sodio, fosfato cálcico de hidrógeno, carboximetilcelulosa 5 cálcica y similares pueden usarse como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite hidrogenado y similares pueden usarse como agentes suavizantes; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceites de cacahuete, soja pueden usarse como agentes de suspensión o lubricantes; acetato ftalato de celulosa como derivado de un hidrato de carbono como celulosa o azúcar, o copolímero de metilacetato-metacrilato como derivado de polivinilo pueden usarse como agentes de suspensión y plastificantes como ésteres de ftalatos y similares pueden usarse 10 como agentes de suspensión.

La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato pueden formularse para su administración con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato pueden formularse como un medicamento con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales según se considera rutinario en la 15 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 su administración por vía oral, intravenosa, intragástrica, intravascular o intraperitoneal.

El término «composición farmacéutica» se refiere a una mezcla de un compuesto o compuestos descritos en este documento con otros compuestos químicos, como diluyentes o vehículos. La composición farmacéutica facilita la 20 administración de los compuestos a un organismo. Existen en la materia múltiples técnicas para administrar un compuesto incluyendo, pero sin limitaciones, la administración por vía oral, inyección, aerosol, parental y tópica. Las composiciones farmacéuticas también pueden obtenerse haciendo reaccionar los compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, 25 ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares.

El término «vehículo» define un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto a células o tejidos. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) es un vehículo utilizado con frecuencia ya que facilita la captación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo. 30

El término «diluyente» define un compuesto químico diluido en agua que disolverá el compuesto de interés al tiempo que estabiliza la forma biológicamente activa del compuesto. Las sales disueltas en soluciones tamponadas se utilizan en la técnica como diluyentes. Una solución tamponada utilizada con frecuencia es la solución salina tamponada con fosfato porque mimetiza las condiciones salinas de la sangre humana. Puesto que las sales tampón 35 pueden controlar el pH de una solución a concentraciones bajas, un diluyente tamponado raramente modifica la actividad biológica de un compuesto.

El término «fisiológicamente aceptable» define un vehículo o diluyente que no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto. 40

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden administrarse a un paciente humano *per se*, o en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con otros principios activos, como en politerapia, o vehículos o excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración del compuesto o combinación de compuestos descritas en este documento pueden encontrarse en «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack 45 Publishing Cl., Easton, FA, 18ª edición, 1990.

Algunas realizaciones proporcionan los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento en formas de dosificación de comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, comprimidos oblongos, pastillas, cápsulas de gel, pellas, perlas o grageas. Preferiblemente, las formulaciones descritas en este documento pueden 50 proporcionar calidades de procesamiento de fármacos favorables, incluyendo, por ejemplo pero sin limitaciones, velocidades de prensado de comprimidos rápidas, reducción de la fuerza de compresión, reducción de las fuerzas de eyección, uniformidad de mezclado, uniformidad del contenido, dispersión de color uniforme, aceleración del tiempo de desintegración, disolución rápida, baja friabilidad (preferiblemente para procesamiento posterior como empaquetado, envío, selección y empaquetado, etc.) y características físicas de la forma de dosificación (p. ej., 55 peso, dureza, espesor, friabilidad) con pequeñas variaciones.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden formularse fácilmente, por ejemplo, combinando la sustancia farmacéutica con cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, pero sin limitaciones, aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, cargas, vehículos, recubrimientos,

deslizantes, sabores, aditivos de color, y similares como se muestra a continuación. Dichas composiciones pueden prepararse para su almacenamiento y posterior procesamiento.

Excipientes

- 5 Los excipientes aceptables para el uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo en Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición (Raymond C Rowe, Paul J Sheskey y Siân C Owen, eds. 2005) y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición (Lippincott, Williams & Wilkins (2005)). El término material «vehículo» o «excipiente» en este documento puede significar cualquier sustancia, no el agente
- 10 terapéutico en sí, usado como vehículo y/o diluyente y/o adyuvante, o vehículo para la administración de un agente terapéutico a un sujeto o añadir a una composición farmacéutica para mejorar su manejabilidad o propiedades de conservación, o para permitir o facilitar la formación de una unidad de dosis de la composición en un artículo discreto como una cápsula, comprimido, comprimido recubierto, comprimido oblongo, cápsula de gel, píldora, pella, perla y similar adecuada para la administración oral. Entre los excipientes pueden incluirse, a modo de ilustración y sin
- 15 limitaciones, diluyentes, desintegrantes, agentes de unión, agentes humectantes, polímeros, lubricantes, deslizantes, recubrimientos, edulcorantes, agentes solubilizantes, sustancias añadidas para enmascarar o contrarrestar un sabor u olor desagradable, aromatizantes, colorantes, fragancias y sustancias añadidas para mejorar la apariencia de la composición.
- 20 Las composiciones y formulaciones pueden incluir cualquier otro agente que proporcione una mejora de la transferencia, administración, tolerancia y similares. Entre estas composiciones y formulaciones se pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (como Lipofectina™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhídrido, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y
- 25 mezclas semisólidas que contienen carbowax.

Cualquiera de las mezclas mencionadas anteriormente pueden ser apropiadas en tratamientos y terapias según la memoria descriptiva de este documento, siempre que el principio activo de la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también

30 Bladrick P. «Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance». Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Charman WN «Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts». J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000), y las referencias en éste sobre información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

- 35 En algunas realizaciones, uno o más, o cualquier combinación de los excipientes enumerados pueden incluirse o excluirse específicamente de las formulaciones y/o procedimientos descritos en este documento. Como apreciarán los expertos en la materia, se determinarán las cantidades de excipientes por dosis de fármaco y tamaño de forma de dosificación.

Lubricantes

- En algunas realizaciones, se emplean lubricantes en la fabricación de determinadas formas de dosificación. Por ejemplo, a menudo se empleará un lubricante cuando se fabriquen comprimidos. En algunas realizaciones, puede añadirse un lubricante justo antes del paso de formación de comprimidos, y puede mezclarse con la formulación
- 45 durante un periodo de tiempo para obtener una buena dispersión. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más lubricantes. Entre los ejemplos de lubricantes adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, talco, behenato de glicerilo, polietilenglicol, polímeros de óxido de polietileno (por ejemplo, los disponibles con las marcas comerciales registradas Carbowax® para el polietilenglicol y Polyox® para el óxido de polietileno de Dow Chemical Company, Midland, Mich), dodecil
- 50 sulfato sódico, dodecil sulfato de magnesio, oleato sódico, estearil fumarato sódico, DL-leucina, sílice coloidal y otros conocidos en la materia. Los lubricantes típicos son estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc y mezclas de estearato de magnesio con dodecil sulfato sódico.

Aditivos de color

- 55 En algunas realizaciones, también pueden incluirse aditivos de color. Los colorantes pueden usarse en cantidades suficientes para distinguir las concentraciones de la forma de dosificación. Preferiblemente, los aditivos de color aprobados para su uso en fármacos (21 CFR 74) se añaden a las formulaciones comerciales para diferenciar las concentraciones de los comprimidos. El uso de otros colorantes farmacéuticamente aceptables y de sus

combinaciones se contempla en la actual memoria descriptiva.

Aglutinantes

- 5 Pueden usarse aglutinantes, por ejemplo, para impartir cualidades cohesivas a una formulación y asegurarse, por tanto, de que la forma de administración resultante sigue intacta tras la compactación. Entre los materiales aglutinantes adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, celulosa microcristalina, gelatina, azúcares (incluidas, por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa y maltodextrina), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, povidona, polímeros celulósicos (incluidas, por ejemplo,
- 10 hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, hidroxietilcelulosa y similares), hidroxipropilcelulosa (HPC) y similares. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las formulaciones descritas en este documento pueden incluir al menos un aglutinante para potenciar la compresibilidad de los principales excipientes. En algunas realizaciones, los aglutinantes se echan sobre la solución, por ejemplo, granulación húmeda, para aumentar la actividad de unión.

15

Desintegrantes

- En algunas realizaciones, se usan desintegrantes, por ejemplo, para facilitar la desintegración del comprimido tras la administración y generalmente son almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas o polímeros entrecruzados. Entre
- 20 los desintegrantes adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, polivinilpirrolidona entrecruzada (PVP-XL), glicolato sódico de almidón, ácido algínico, ácido metacrílico DYB, celulosa microcristalina, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato sódico de almidón, almidón, almidón pregelatinizado, croscarmellosa sódica y similares. Si se desea, la formulación farmacéutica también puede contener cantidades poco importantes de sustancias auxiliares no tóxicas como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH y similares, por ejemplo, acetato sódico,
- 25 monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, dodecil sulfato sódico, dioctilo sulfosuccinato sódico, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, etc., y similares.

Agentes de recubrimiento

- 30 En algunas realizaciones, las formulaciones pueden incluir un recubrimiento, por ejemplo, una película. Cuando se requieren recubrimientos en película, las preparaciones de recubrimiento pueden incluir, por ejemplo, un polímero formador de películas, un agente plastificador o similar. También los recubrimientos pueden incluir pigmentos y/o agentes opacificadores. Entre los ejemplos no limitantes de polímeros que forman películas se incluyen hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona y almidones. Entre los ejemplos no
- 35 limitantes de plastificadores se incluyen polietilenglicol, citrato de tributilo, sebacato de dibutilo, aceite de ricino y monoglicérido acetilado. Adicionalmente, entre los ejemplos no limitantes de pigmentos y opacificadores se incluyen óxidos de hierro de diversos colores, lacas colorantes de muchos colores, dióxido de titanio y similares.

Diluyentes

- 40 En algunas realizaciones se usan diluyentes y, generalmente, se seleccionan entre uno o más de los compuestos sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, azúcar invertida, carbonato cálcico, lactosa, almidón, celulosa microcristalina, lactosa monohidrato, fosfato cálcico de hidrógeno, fosfato cálcico de hidrógeno anhidro, un poliol farmacéuticamente aceptable como xilitol, sorbitol, maltitol, manitol, isomaltitol y glicerol, polidextrosa, almidón
- 45 o similares, o cualquiera de sus mezclas.

Tensioactivos

- En algunas realizaciones se usan agentes tensioactivos. El uso de tensioactivos como agentes humectantes en
- 50 formas farmacéuticas orales se describe en la literatura, por ejemplo, en H. Sucker, P. Fuchs, P. Speiser, Pharmazeutische Technologie, 2ª edición, Thieme 1989, página 260. Es bien sabido por otros artículos, como los publicados en Advanced Drug Delivery Reviews (1997), 23, páginas 163-183, que también es posible utilizar tensioactivos, entre otros, para promover la permeación y biodisponibilidad de compuestos farmacéuticos activos. Entre los ejemplos de tensioactivos se incluyen, pero sin limitaciones, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no
- 55 iónicos, tensioactivos bipolares y sus mezclas. Preferiblemente, los tensioactivos se seleccionan a partir del grupo compuesto por éster del ácido graso de poli(oxietileno) sorbitan, estearato de poli(oxietileno), éter de alquilo poli(oxietileno), glicérido poliglicolado, aceite de ricino poli(oxietileno), éster de ácido graso de sorbitan, poloxamero, sal de ácido graso, sal biliar, sulfato de alquilo, lecitina, micelas mixtas de sal biliar y lecitina, éster glucosa vitamina E TPGS (succinato de D- α -tocoferil polietilenglicol 1000), dodecil sulfato sódico y similares, y sus mezclas.

Deslizantes

En algunas realizaciones se usan agentes deslizantes. Entre los ejemplos de deslizantes que pueden usarse se incluyen, pero sin limitaciones, dióxido de silicio coloidal, trisilicato de magnesio, celulosa en polvo, almidón, talco y fosfato de calcio, o similares, y sus mezclas.

Entre las vías de administración adecuadas pueden incluirse, por ejemplo, administración por vía oral, rectal, transmucosa, tópica o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. El compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación mantenida o controlada que incluyen inyecciones de absorción lenta, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (incluyendo electrotransporte) y similares, para una administración prolongada y/o programada, pulsada a una velocidad determinada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente memoria descriptiva pueden fabricarse de una forma que es conocida por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, preparación de grageas, homogeneización, formación de emulsiones, encapsulación, inmovilización o formación de comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente memoria descriptiva pueden formularse, por tanto, de forma convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y compuestos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que puedan utilizarse a nivel farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Cualquier de las técnicas, vehículos y excipientes bien conocidos pueden usarse como adecuados y como se conoce en la técnica, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionada anteriormente.

Las soluciones inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sean soluciones líquidas o suspensiones, en formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido previa a la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato sódico, clorhidrato de cisteína y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades poco importantes de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes, agentes tamponadores del pH y similares. Entre los tampones fisiológicamente compatibles se incluyen, pero sin limitaciones, la solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones que potencian la absorción (por ejemplo, liposomas).

Para la administración transmucosa pueden usarse en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se quiere atravesar.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de absorción lenta o infusión continua, incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Entre los solventes o vehículos lipófilos adecuados se incluyen los ácidos grasos como aceite de sésamo u otros aceites orgánicos como aceites de soja, pomelo o almendra, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de unidad de dosis, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril apirógena, antes de su uso.

Para la administración oral, los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden formularse fácilmente combinando el principio activo con los vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten que el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento se formen como comprimidos, comprimidos recubiertos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, cápsulas de gel, pellas, perlas, jarabes, mezclas poco espesas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por

el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando el compuesto activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los compuestos auxiliares adecuados, si se desea, para obtener los núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son, en especial, cargas como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, como la polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, ácido alginico o una sal del mismo, como alginato sódico. Se proporcionan núcleos de grageas con los recubrimientos adecuados. Con este fin, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, lacas en solución y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Pueden añadirse soluciones colorantes o pigmentos a los comprimidos o grageas recubiertas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos. Con este fin, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, lacas en solución y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Pueden añadirse soluciones colorantes o pigmentos a los comprimidos o grageas recubiertas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de los compuestos activos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración. En algunas realizaciones, se describen formulaciones de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento con un perfil de disolución de liberación inmediata aceptable y un método de fabricación sólido y escalable.

Entre las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral se incluyen cápsulas duras de gelatina, así como cápsulas blandas selladas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener mezclas de los principios activos con una carga como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o resuspendidos en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de la forma convencional.

Para la administración por inhalación, el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento se proporciona convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol desde recipientes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosis puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad regulada. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contenga una mezcla de polvos del compuesto y una base en polvo adecuado como lactosa o almidón.

En este documento además se describen diversas composiciones farmacéuticas bien conocidas en la técnica farmacéutica para usos que incluyen administración intraocular, intranasal e intraauricular. En la técnica generalmente se conocen agentes penetrantes adecuados para estos usos. Entre las composiciones farmacéuticas para administración intraocular se incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble, como colirios, o en goma gellan (Shedden y col., Clin. Ther., 23(3):440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer y col., Ophthalmologica, 210(2): 101-3 (1996)); pomadas oftálmicas; suspensiones oftálmicas, como microparticulados, partículas poliméricas pequeñas que contienen el fármaco que se resuspenden en un medio vehículo líquido (Joshi, A., J. Ocul. Pharmacol., 10(1):29-45 (1994)), formulaciones liposolubles (Alm y col., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58 (1989)) y microesferas (Mordenti, Toxicol. Sci., 52(1):101-6 (1999)) e inserciones oculares. Estas formulaciones farmacéuticas adecuadas se formulan con mayor frecuencia y preferiblemente para que estén estériles, sean isotónicas y estén tamponadas para su estabilidad y comodidad de uso. Entre las composiciones farmacéuticas para administración intranasal también pueden incluir colirios y aerosoles preparados a menudo para simular en muchos aspectos las secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, FA (1990), y son bien conocidos por los expertos en la materia, las formulaciones adecuadas son casi siempre y preferiblemente isotónicas, ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5 y, casi siempre y preferiblemente incluyen conservantes antimicrobianos y estabilizantes del fármaco apropiados. Entre las

formulaciones farmacéuticas para administración intraauricular se incluyen suspensiones y pomadas para aplicación tópica en el oído. Los solventes frecuentes para dichas formulaciones auditivas son glicerina y agua.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento también pueden formularse en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, el compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento también pueden formularse como una preparación de absorción lenta. Estas formulaciones de actuación prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como sales poco solubles.

Para compuestos hidrófobos, un vehículo farmacéutico adecuado puede ser un sistema cosolvente que comprenda alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible con agua y una fase acuosa. Un sistema cosolvente normal usado es el sistema cosolvente VDP, que es una solución de alcohol bencílico al 3%, 8% p/v del tensioactivo no polar Polisorbato 80TM y polietilenglicol 300 al 65% p/v, completado a volumen con etanol absoluto. De forma natural, las proporciones de un sistema cosolvente pueden varias considerablemente sin destruir su características de solubilidad y toxicidad. Adicionalmente, la identidad de los componentes del cosolvente puede variar: por ejemplo, pueden usarse otros tensioactivos no polares con baja toxicidad en lugar de POLISORBATO 80TM; puede variar el tamaño de la fracción de polietilenglicol; el polietilenglicol puede sustituirse por otros polímeros biocompatibles, p. ej., polivinilpirrolidona, y la dextrosa puede sustituirse por otros azúcares o polisacáridos.

Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o portadores de administración para fármacos hidrófobos. Determinados solventes orgánicos como dimetilsulfóxido también pueden emplearse, aunque normalmente a cambio de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden administrarse usando un sistema de liberación mantenida, como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación mantenida que son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación mantenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos entre algunas semanas y hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización proteica.

Los agentes que se pretende administrar dentro de las células pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, estos agentes pueden estar encapsulados en liposomas. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación de los liposomas se incorporan dentro del interior acuoso. Los contenidos liposomales están ambos protegidos del microentorno externo y, debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se administran de forma eficaz dentro del citoplasma de la célula. El liposoma puede estar recubierto con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas estarán dirigidos y serán captados de forma selectiva por el órgano deseado. Alternativamente, pueden administrarse directamente al interior de la célula pequeñas moléculas orgánicas hidrófobas

Pueden incorporarse agentes terapéuticos o diagnósticos adicionales a las composiciones farmacéuticas. Alternativa o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden combinarse con otras composiciones que contienen otros agentes terapéuticos o diagnósticos.

50 Procedimientos de administración

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento o sus composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier medio adecuado. Entre los ejemplos no limitantes de administración se incluyen, entre otros, a) administración a través de vías orales, que incluye administración en cápsulas, comprimidos, gránulos, aerosol, jarabe u otras formas similares, b) administración a través de vías no orales, como rectal, vaginal, intrauretral, intraocular, intranasal o intraauricular, que incluyen la administración como suspensión acuosa, una preparación oleosa o similar o mediante gotero, aerosol, supositorio, ungüento, pomada o similares, c) administración mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intramedular, intraesternal, o similares, incluyendo administración mediante bomba de

perfusión; d) administración a nivel local como mediante inyección directamente en la zona renal o cardíaca, por ejemplo, mediante implantación de liberación lenta, así como e) administración por vía tópica; si lo consideran apropiado los expertos en la materia para poner en contacto el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento con el tejido vivo.

5

Entre las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración se incluyen composiciones donde los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su finalidad pretendida. La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento requerida como dosis dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluyendo a humanos, que se va a tratar y las características físicas del animal específico en consideración. La dosis puede adaptarse para conseguir el efecto deseado, aunque dependerá de factores como el peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la materia médica. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la vista de la memoria descriptiva detallada proporcionada en este documento.

Como será fácilmente aparente para un experto en la materia, la dosis *in vivo* útil que se va a administrar y el modo de administración en particular variarán dependiendo de la edad, peso y especie de mamífero tratada y el uso específico para el que se emplean el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento. Un experto en la materia puede conseguir la determinación de los niveles de dosis eficaces, es decir los niveles de dosis necesaria para conseguir el resultado deseado usando procedimientos farmacológicos rutinarios. Típicamente, las aplicaciones clínicas de productos en humanos se inician a los niveles de dosis más bajos, aumentándose el nivel de dosis hasta que se consigue el efecto deseado. Alternativamente, pueden usarse estudios *in vitro* aceptables para establecer dosis y vías de administración útiles de las composiciones identificadas por los procedimientos actuales usando procedimientos farmacológicos establecidos.

Según se usa en este documento, una «dosis» se refiere a la cantidad combinada de los principios activos (p. ej., L-ornitina y fenilacetato o fenilbutirato).

30

En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de productos potenciales se inician a los niveles de dosis más altos, disminuyendo la dosis hasta que se deja de obtener el efecto deseado o desaparecen los efectos secundarios adversos. La dosis puede abarcar un intervalo amplio, dependiendo de los efectos deseados y de la indicación terapéutica. Típicamente, las dosis pueden estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y 4000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 80 mg/kg y 1600 mg/kg de peso corporal. Alternativamente, las dosis pueden estar basadas y calcularse en función del área superficial del paciente, como entienden los expertos en la materia.

Dependiendo de la intensidad y capacidad de respuesta de la afección tratada, la dosis también puede ser una única administración de una composición de liberación lenta, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que la cura sea eficaz o se consiga una disminución del estado de enfermedad. La cantidad de una composición que se va a administrar, por supuesto, dependerá de muchos factores como el sujeto que se va a tratar, la intensidad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe la dosis. El compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse por vía oral o mediante inyección a una dosis de 0,1 mg/kg a 4000 mg/kg de peso corporal del paciente por día. El intervalo de dosis para humanos adultos generalmente es de 1 g a 100 g/día. Los comprimidos u otras formas de presentación proporcionados en unidades discretas pueden contener una cantidad del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento que sea eficaz a dicha dosis o como múltiplo de la misma, por ejemplo, unidades que contienen de 1 g a 60 g (por ejemplo, de aproximadamente 5 g a 20 g, de aproximadamente 10 g a 50 g, de aproximadamente 20 g a 40 g o de aproximadamente 25 g a 35 g. La cantidad precisa de compuesto administrado a un paciente será responsabilidad del médico responsable del tratamiento. Sin embargo, la dosis empleada dependerá de diversos factores, incluyendo la edad y el sexo del paciente, la enfermedad concreta que está siendo tratada y su intensidad. También la vía de administración puede variar dependiendo de la enfermedad y su intensidad. Una dosis típica de ornitina, o de fenilacetato o fenilbutirato es de 0,02 g a 1,25 g por kg de peso corporal, por ejemplo, de 0,1 g a 0,5 g de kg de peso corporal, dependiendo de estos parámetros. En algunas realizaciones, una dosis de ornitina, o de fenilacetato o fenilbutirato puede ser de 1 g a 100 g, por ejemplo, de 10 g a 80 g, de 15 g a 60 g, de 20 g a 40 g o de 25 g a 35 g. En algunas realizaciones, la ornitina y el fenilacetato/fenilbutirato pueden administrarse en una relación de peso de 10:1 a 1:10, por ejemplo, de 5:1 a 1:5, de 4:1 a 1:4, de 3:1 a 1:3, de 2:1 a 1:2, o aproximadamente 1:1. Un médico será capaz de determinar la dosis necesaria

de ornitina y fenilacetato o fenilbutirato para cualquier sujeto en particular.

El médico individual puede elegir la formulación, vía de administración y dosis exactas para las composiciones farmacéuticas del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento a la vista del estado del paciente. (véase, p. ej., Finl y col. 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", con especial referencia al Cap. 1). Típicamente, el intervalo de dosis de la composición administrada al paciente puede estar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4000 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosis puede ser solo una o una serie de dos o más administradas en el curso de uno o más días, si el paciente lo necesita. En los casos en que las dosis de los compuestos en humanos se hayan establecido para al menos alguna afección, en la presente memoria descriptiva se usarán estas mismas dosis, o dosis que estén entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 5000%, más preferiblemente entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 1000% de la dosis establecida en humanos. Cuando no haya dosis establecidas en humanos, como será el caso de los compuestos farmacéuticos recientemente descubiertos, podrá inferirse una dosis adecuada para humanos a partir de los valores de ED50 o ID50, u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, según se certifica en estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Se apreciará que el médico responsable del tratamiento debería saber cómo y cuando terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad o a disfunciones orgánicas. Por el contrario, el médico encargado del tratamiento también debería saber cómo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera la adecuada (evitando la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de la enfermedad de interés variará con la intensidad de la afección que se va a tratar y la vía de administración. La intensidad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, mediante procedimientos de evaluación pronóstica convencionales. Adicionalmente la dosis, y quizás la frecuencia de dosis, también variarán según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. Un programa comparable al descrito anteriormente puede usarse en medicina veterinaria.

Aunque la dosis exacta se determinará en función de cada fármaco, en la mayoría de los casos, pueden hacerse algunas generalizaciones referentes a dicha dosis. En casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, las dosis pueden calcularse como la base libre. En algunas realizaciones, la composición se administra 1 a 4 veces al día. Alternativamente, las composiciones del compuesto o la combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse mediante infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada principio activo de hasta 100 g al día. Como entenderán los expertos en la materia, en determinadas situaciones puede ser necesario administrar el compuesto descrito en este documento en cantidades que excedan, o incluso excedan de lejos, el intervalo de dosis preferido establecido anteriormente para tratar de formar eficaz y agresiva enfermedades o infecciones especialmente agresivas. En algunas realizaciones, el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento se administrarán durante un periodo de tratamiento continuo, por ejemplo, durante una semana o más, o durante meses o años.

En algunas realizaciones, la pauta posológica de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento se administran durante un periodo de tiempo, pudiendo ser el periodo de tiempo, por ejemplo, de al menos aproximadamente una semana a al menos aproximadamente 4 semanas, de al menos aproximadamente 4 semanas a al menos aproximadamente 8 semanas, de al menos aproximadamente 4 semanas a al menos aproximadamente 12 semanas, de al menos aproximadamente 4 semanas a al menos aproximadamente 16 semanas, o más tiempo. La pauta posológica de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse tres veces al día, dos veces al día, diariamente, cada dos días, tres veces a la semana, cada dos semanas, tres veces al mes, una vez al mes, sustancialmente de forma continuada o continuada. Algunas realizaciones proporcionan un procedimiento para usar una cantidad eficaz de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento en el tratamiento de la hipertensión portal y/o la recuperación de la función hepática en un paciente que comprende administrar al paciente una dosis de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento que contienen una cantidad de aproximadamente 1 g a aproximadamente 100 g de fármaco por dosis del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento, por vía oral, tres veces al mes, una vez al mes, una vez a la semana, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día sustancialmente continuada o continuada, para la duración del tratamiento deseada.

Algunas realizaciones proporcionan un procedimiento para usar una cantidad eficaz de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento en el tratamiento de la hipertensión portal y/o la recuperación de la función hepática en un paciente, que comprende administrar al paciente una dosis de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento que contiene una cantidad de

aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4000 mg de fármaco por kilogramo de peso corporal por dosis del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento, por vía oral, tres veces al mes, una vez al mes, una vez a la semana, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día sustancialmente continuada o continuada, para la duración del tratamiento deseada.

5

La cantidad e intervalo de dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores, o concentración mínima eficaz (CME). La CME variará para cada compuesto pero puede estimarse a partir de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CME dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Sin embargo, pueden usarse

10

ensayos de HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.

Los intervalos de dosis también pueden determinarse usando el valor de CME. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse usando una pauta posológica que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la CME el 10-90% de las veces, por ejemplo, entre el 15-30%, 20-45%, 25-50%, 30-55%, 35-60%, 40-65%, 45-70%, 50-75%, 55-80%, 60-90%, 65-75%, 70-80%, 75-85%, 15-90%, 20-90%, 25-90%, 30-90%, 35-90%, 40-90%, 45-90%, 50-90%, 55-90%, 60-90%, 65-90%, 70-90%, 75-90% o 80-90%. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse usando una pauta que mantiene los niveles plasmáticos por encima de la CME el 20-90% de las veces. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse usando una pauta que mantiene los niveles plasmáticos por encima de la CME el 30-90% de las veces, entre el 40-90% y, más típicamente,

20

entre el 50-90%.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

25

La cantidad de composición administrada puede depender del sujeto tratado, del peso del sujeto, de la intensidad de la afección, del modo de administración y del criterio del médico que prescribe el fármaco.

30

En los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden evaluarse la eficacia y toxicidad usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, la toxicología del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento puede establecerse determinando la toxicidad *in vitro* con respecto a una línea celular, como de un mamífero, y preferiblemente una línea celular humana. Los resultados de estos estudios son, a menudo, predictivos de la toxicidad en animales, como en mamíferos, o más específicamente, humanos. Alternativamente, la toxicidad del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento en un modelo animal, como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse usando procedimientos conocidos. La eficacia del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento puede establecerse usando varios procedimientos reconocidos, como procedimientos *in vitro*, modelos animales o ensayos clínicos en humanos. Existen modelos reconocidos *in vitro* para prácticamente cada clase de afección, incluyendo pero sin limitaciones, cáncer, enfermedad cardiovascular y diversas disfunciones inmunológicas. De forma similar, pueden usarse modelos animales aceptables para establecer la eficacia de compuestos químicos para tratar dichas afecciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el experto puede guiarse por el estado de la técnica para elegir un modelo, dosis y vía de administración apropiados así como una pauta posológica. Por supuesto, también pueden usarse ensayos clínicos en humanos para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

35

40

45

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener uno o más formas de unidad de dosis que contenga el principio activo. El envase puede, por ejemplo, constar de una lámina de metal o plástico, como un blíster. El envase o dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El envase o dispensador puede también ir acompañado con una nota asociada al recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, en la que se refleje la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para su administración humana o veterinaria. Esta nota, por ejemplo, puede ser la etiqueta aprobada por la agencia norteamericana del medicamento de EE. UU. para fármacos con receta o el prospecto aprobado. Las composiciones que comprenden el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento formuladas en un vehículo farmacéuticamente compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada.

50

55

La cantidad eficaz de los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento puede ser determinada por el experto en la materia. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de administración para un sujeto en particular puede variar y dependerá de diversos factores como la actividad del compuesto específico empleado, su estabilidad metabólica y la longitud de la acción de este compuesto, la especie,

edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y tiempo de administración, la tasa de excreción, politerapia e intensidad de la afección en particular. Entre los sujetos preferidos para el tratamiento se incluyen animales, más preferiblemente especies de mamíferos, como humanos y animales domésticos, tales como perros, gatos y similares, que sufren hipertensión portal.

5

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento capaces de tratar la hipertensión portal en una cantidad eficaz del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de la presente memoria descriptiva pueden contener otros agentes terapéuticos descritos a continuación y pueden formularse, por ejemplo, empleando 10 vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos del tipo apropiado al modo de administración deseada (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, aromatizantes, etc.) según técnicas como aquellas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse mediante 15 cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por vía oral, como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual; bucal, parenteral, por ejemplo mediante técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal (p. ej., como soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas); por vía nasal por ejemplo, mediante aerosol para inhalación; por vía tópica, por ejemplo, en forma de crema o pomada; o por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios; en formulaciones de unidad de dosis que 20 contienen vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o la liberación prolongada pueden conseguirse mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que incluyan los 25 compuestos de la invención o, especialmente en el caso de la liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento también puede administrarse mediante liposomas. Por ejemplo, la sustancia activa puede utilizarse en una composición como un comprimido, cápsula, 30 solución o suspensión que contiene el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento o en una forma tópica para la curación de una herida (del 0,01 a 5% en peso del compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento, 1 a 5 tratamientos al día).

Los compuestos o combinaciones de compuestos descritos en este documento pueden combinarse de forma 35 convencional con un vehículo o transportador, excipiente, aglutinante, conservante, estabilizante, aroma, etc. fisiológicamente aceptable o con un vehículo tópico.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento también pueden formularse en composiciones tales como soluciones estériles o suspensiones para administración parenteral. El compuesto o 40 combinación de compuestos descritos en este documento pueden combinarse con un vehículo, portador, excipiente, aglutinante, conservante, estabilizante, etc., en una forma de unidad de dosis denominada de este modo por la práctica farmacéutica aceptada. La cantidad de sustancia activa en estas composiciones o preparaciones es preferiblemente aquella en la que se obtiene una dosis adecuada en el intervalo indicado.

45 Entre los ejemplos de composiciones para administración oral se incluyen suspensiones que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para conferir volumen, ácido algínico o alginato sódico como agentes de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad y agentes edulcorantes o aromatizantes, como los conocidos en la técnica; y comprimidos de liberación inmediata que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y/o lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, 50 modificador de la viscosidad, desintegrantes, diluyentes y lubricantes como los conocidos en la técnica. Las tabletas, los comprimidos o los comprimidos liofilizados son ejemplos de formas que pueden usarse. Entre los ejemplos de composiciones se incluyen aquellas en las que el compuesto o la combinación de compuestos descritos en este documento se formulan con diluyentes que se disuelven rápidamente como manitol, lactosa, sacarosa y/o ciclodextrinas. También pueden incluirse en estas formulaciones excipientes de alto peso molecular como celulosas 55 (avicel) o polietilenglicoles (PEG). Estas formulaciones también pueden incluir un excipiente para ayudar a la adhesión mucosa como hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa sódica (CMCS), copolímero de anhídrido maleico (p. ej., Gantrez) y agentes para controlar la liberación como un copolímero poliacrílico (p. ej., Carbopol 934). También pueden añadirse agentes lubricantes, deslizantes, aromatizantes, colorantes y estabilizantes para facilitar su fabricación y uso.

Entre los ejemplos de composiciones para administración mediante aerosol nasal o inhalación se incluyen soluciones salinas que pueden contener, por ejemplo, alcohol de bencilo u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para aumentar la biodisponibilidad, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes como los conocidos en la técnica.

Entre los ejemplos de composiciones para la administración parenteral se incluyen soluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o solventes adecuados no tóxicos aceptables por vía parenteral, como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, una solución de cloruro sódico isotónica u otros agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.

Entre los ejemplos de composiciones para administración rectal se incluyen supositorios que pueden contener, por ejemplo, un excipiente no irritante adecuado, como manteca de cacao, ésteres glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas normales, aunque se licuan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Entre los ejemplos de composiciones para administración tópica se incluyen un vehículo tópico como Plastibase (aceite mineral gelificado con polietileno). Por ejemplo, el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse por vía tópica para tratar enfermedades vasculares periféricas y por tanto, pueden formularse como crema o pomada.

Los compuestos o combinación de compuestos descritos en este documento pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos adecuados útiles en el tratamiento de la hipertensión portal o para la recuperación de la función hepática. Por ejemplo, el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento pueden administrarse en combinación con análogos de vasopresina como terlipresina, omipresina y vasopresina, somatostatina y sus análogos como octreotida; bloqueantes beta no selectivos como propranolol y nadolol; bloqueantes beta vasodilatadores como carvedilol; nitratos como mononitrato de isosorbida y trinitrato de glicerina y estatinas como atorvastatina, fluvastatina, lovastatina y simvastatina.

Los demás agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con el compuesto o combinación de compuestos descritos en este documento, pueden usarse, por ejemplo, en las cantidades indicadas en la Referencia de escritorio del médico (PDR) o determinadas de cualquier otra forma por un experto en la materia.

35 **Ejemplos**

Las realizaciones de la presente invención se describen con más detalle en los siguientes ejemplos.

40 **Ejemplo 1**

En este ejemplo, se realizaron experimentos en el modelo de ratas con ligadura del conducto biliar (LCB) clínicamente relevante que muestra características clínicas de estado proinflamatorio sistémico y cerebral de bajo grado indicado por una elevación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) junto con edema cerebral de bajo grado. En ratas LCB, la administración de lipopolisacárido (LPS) bacteriano lleva a una situación clínica que mimetiza la IHCA (insuficiencia hepática crónica reagudizada).

Se ha mostrado que las ratas vírgenes expuestas a amoníaco seguido de LPS intravenoso, desarrollaban respuesta inflamatoria, vasodilatación cerebral e hipertensión intracraneal, que no se producían en animales a los que solo se administró LPS, lo que indicaba el importante papel del amoníaco en el «cebado» del cerebro para el efecto nocivo del LPS. Se observa una exageración de ambas respuestas inflamatorias sistémica y cerebral que tiene como resultado el empeoramiento del edema cerebral citotóxico que produce una disminución de la consciencia a estados de precoma/coma.

55 **Modelos en animales**

Se usaron treinta y cuatro ratas Sprague-Dawley machos con un peso corporal de 200 a 250 g. Todas las ratas se mantuvieron en la unidad y se les permitió el libre acceso a pienso de roedores convencional y a agua, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura de 19-23°C y humedad de aproximadamente el 50%.

Ligamiento del conducto biliar (LCB): las ratas se sometieron a ligamiento del conducto biliar para inducir cirrosis biliar con anestesia intravenosa (i.v.) con diazepam (1 mg/kg), seguido de 150 µl/kg de Hypnorm® intramuscular (Janssen Pharmaceutica, Bélgica).

- 5 *Animales pseudooperados (pseudo)*: las ratas se sometieron a una pseudooperación con anestesia. Las ratas LCB recibieron una dieta rica en proteínas/amoniagénica durante 7 días antes de la inclusión en el estudio. La dieta consistía en un pienso para roedores líquido (Bioserve, Frenchtown, NJ 08825, EE. UU.) y una mezcla personalizada que simula la composición de aminoácidos de la molécula de hemoglobina (4 g/kg/día de Nutricia, Cujik, Holanda) mezclada con gelatina disponible en el mercado para prevenir la sedimentación. Este régimen produce
10 hiperamonemia crónica.

Diseño del estudio

- Se investigó el efecto del tratamiento de la inflamación superpuesta a la base de la hiperamonemia indicativa de
15 IHCR mediante la administración de OF. Cuatro semanas después de la cirugía, las ratas LCB fueron asignadas aleatoriamente a recibir inyecciones intraperitoneales (i.p.) sucesivas de OF (0,3 g/kg) durante 3 días, el anticuerpo monoclonal anti-TNF-α quimérico de ratón o solución salina (placebo). Tres horas antes de terminar, se administró a todas las ratas LCB i.p. 1 mg/kg de LPS (Sigma, Poole, RU). Como controles, las ratas pseudooperadas recibieron solo i.p. de solución salina. Los grupos de estudio fueron 1) animales pseudooperados (n=6), 2) LCB + solución
20 salina (n=6), 3) LCB + LPS (n=6) y 4) LCB + OF + LPS (n=6).

- Se realizó un estudio adicional para determinar el efecto de reducción del amoníaco de OF sobre las respuestas inflamatorias cerebrales justo en ratas LCB (no tratadas con LPS). Cuatro semanas después de la cirugía, las ratas LCB fueron asignadas aleatoriamente a recibir inyecciones intraperitoneales (i.p.) sucesivas de OF (0,3 g/kg) durante
25 3 días y/o solución salina (placebo). Como controles, las ratas pseudooperadas recibieron solo i.p. de solución salina. Los grupos de estudio fueron 1) animales pseudooperados (n=6), 2) LCB + solución salina (n=6) y 3) LCB + OF (n=6). Según el protocolo, se dejó acceso libre al pienso y al agua a las ratas durante el periodo de 3 horas postintervención en un entorno de temperatura controlada y, a continuación, se sacrificaron mediante desangrado completo con anestesia (Hypnorm® (200 µl/kg) i.p.), 20 minutos después de diazepam i.p. (1 mg/kg). Se extrajo
30 sangre de la aorta descendente que se colocó inmediatamente en tubos que contenía heparina/EDTA enfriados en hielo (hasta el desangrado completo), se centrifugó a 3120g y 4°C y se recogió el plasma que se conservó a -80°C hasta el ensayo.

Citoquinas en plasma y cerebro cortical

- 35 Las muestras de plasma y cerebro cortical se congelaron instantáneamente (-80°C) y se conservaron. Antes del análisis, se homogeneizaron 100 µg de corteza cerebral y se desproteneizaron (usando un homogeneizador con mortero de Teflon y tubo de vidrio) en 300 µl de solución de tampón de lisis para células en hielo. Tras la centrifugación a 12 000g durante 10 minutos a 4°C, los sobrenadantes se recogieron para su procesamiento. Tras la
40 cuantificación de la concentración de proteínas en las muestras de proteínas cerebrales equilibradas y en los sobrenadantes de plasma (50 µl), se analizaron los niveles de citoquinas (pg/ml) mediante citometría de flujo usando el kit de matrices de citometría con microesferas (MCM) para inflamación en ratas de Becton Dickinson (BD™ biosciences) según se describe en las instrucciones del fabricante. Estas incluyen las citoquinas proinflamatorias: TNF-α e interleuquina-6 (IL-6). Las muestras se analizaron midiendo la fluorescencia producida por las microesferas
45 CBA en un sistema de citometría de flujo FACS Canto™ II (BD™ Sciences) y los datos se analizaron con software CTA de BD™.

Análisis por inmunotransferencia

- 50 Muestras de 100 µg de corteza cerebral congeladas instantáneamente (-80°C) y almacenadas se homogeneizaron y desproteneizaron (usando un homogeneizador con mortero de Teflon y tubo de vidrio) en 300 µl de solución de tampón de lisis para células en hielo. Tras la centrifugación a 12 000g durante 10 minutos a 4°C, los sobrenadantes se recogieron para su procesamiento. Tras la cuantificación de la concentración de proteínas en la muestra (de tejido cerebral cortical frontal en 50 µl equilibrado), se realizó la inmunotransferencia en muestras preparadas para la
55 separación de proteínas y se transfirió usando un sistema de geles previamente montados NuPAGE® (Invitrogen Ltd. RU). Las bandas de proteína específicas se detectaron usando un anticuerpo policlonal primario de ratón para iNOS (BD Biosciences, RU) y otro secundario de cabra frente a IgG de ratón, conjugado con HRP (Hycult Biotechnology, Holanda) y p65 NFκB primario de conejo (Cell Signalling, RU) con un anticuerpo policlonal secundario de cabra frente a IgG de conejo, conjugado con HRP (Hycult Biotechnology, Holanda). Se midió el anticuerpo frente a tubulina

alfa (α -tubulina; Santa Cruz Biotechnology, Inc. EE. UU.), una proteína del citoesqueleto celular ubicua, para establecer de forma precisa las diferencias en la expresión de proteína total entre las muestras de tejidos; para la detección fue necesario un anticuerpo policlonal secundario de cabra frente a IgG de ratón, conjugado con HRP (Hycult biotechnology, Holanda). Todos los anticuerpos se usaron a una dilución 1:1000. Las bandas de proteína se visualizaron usando reactivos de detección de inmunotransferencia avanzados ECL™ de Amersham e Hyperfilm™ (GE Healthcare, RU). Las medidas de densitometría se realizaron usando el software Image-J (freeware, rsbweb.nih.gov/ij).

Estadística

10 Los datos se expresaban como la media \pm ETM. La significación de la diferencia se comprobó con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls o ANOVA bilateral; se consideró una $p < 0,05$ para que fuera estadísticamente significativo. Se usó la prueba t pareada o la prueba de rango con signo de Wilcoxon para comparar dos grupos si era conveniente. Se realizaron análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en el tiempo hasta el precoma/coma en los diferentes grupos de tratamiento y se usó la prueba de rango logarítmico para el análisis estadístico de los datos comparando las curvas de supervivencia. Entre el software utilizado se incluyen Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, WA) y GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Resultados

20 Todas las ratas siguieron ganando peso tras la cirugía. A partir del peso final tomado inmediatamente antes de la finalización, las ratas LCB (media \pm EMT; 342 g \pm 42) no mostraban diferencias significativas con los controles pseudooperados (media \pm EMT; 380 g \pm 38). Los parámetros hemodinámicos sistémicos en los animales LCB se mantenían mejor como se mostró previamente.

25 *Citoquinas en plasma y cerebro cortical*

A lo largo de todos los grupos de estudio, los niveles medios de citoquinas del tejido cerebral cortical frontal estaban en el orden de 10 veces superiores en comparación con sus respectivos niveles plasmáticos en circulación (figura 30 1A-D y tabla 1). El análisis múltiple de comparación de grupos mostró lo siguiente:

Citoquinas en plasma: cuando se comparaba con ratas pseudooperadas, la ligación del conducto biliar se asoció con un aumento significativo en los niveles plasmáticos de la citoquina proinflamatoria TNF- α ($p < 0,05$) (figura 1A). En ratas LCB, el LPS estimulaba significativamente el aumento de TNF- α e IL-6 en plasma cuando se comparaba con controles pseudooperados ($p < 0,001$, respectivamente) y controles LCB tratados con solución salina ($p < 0,01$, respectivamente) (figuras 1B-C). Cuando se comparaba con ratas LCB + LPS, se observó una reducción significativa en el TNF- α ($p < 0,01$) en plasma y tendía hacia la reducción en la IL-6 tras la administración de OF (figuras 1B-D).

Citoquinas en cerebro cortical: cuando se comparaba con ratas pseudooperadas, la ligadura del conducto biliar se asoció con un aumento significativo de los niveles cerebrales de TNF- α ($p > 0,05$, tabla 1), que aumentaba con el LPS ($p < 0,001$). En las ratas LCB tratadas con LPS, la administración de OF mejoraba los niveles elevados de TNF- α cortical en tejido cerebral ($p < 0,05$). Se observó una tendencia similar con los niveles de IL-6 en cerebro tras la ligadura del conducto biliar y la intervención del tratamiento.

45 *Citoquinas en plasma y cerebro cortical*

Citoquinas en plasma: cuando se comparaba con ratas pseudooperadas (114,8 \pm 40,4 pg/ml), la LCB se asoció con un aumento significativo en los niveles plasmáticos de TNF- α (902,2 \pm 176,1 pg/ml; $p < 0,001$), que se redujo significativamente mediante tratamiento previo con OF (270,5 \pm 59,4 pg/ml; $p < 0,001$).

50 *Citoquinas en cerebro cortical:* cuando se compare con ratas pseudooperadas (34,2 \pm 4,6 pg/ml), la LCB se asoció con un aumento significativo en los niveles cerebrales de TNF- α (178,7 \pm 62,9 pg/ml; $p < 0,05$), que se redujo significativamente mediante tratamiento previo con OF (54,7 \pm 15,3 pg/ml; $p < 0,05$).

55 *Expresión de iNOS*

Cuando se comparaba con ratas pseudooperadas (1,46 \pm 0,17; figura 2A), se observó una elevación significativa en la iNOS de cerebro con LCB (2,87 \pm 0,14; $p < 0,001$), que se redujo tras el tratamiento previo con OF (2,32 \pm 0,17; $p < 0,05$)

Expresión de NFκB

Tabla 1

Niveles de citoquinas (pmoles/l)	Pseudo	LCB	LCB + LPS	LCB + OF +LPS
TNF-a en plasma	90 ± 25	1859 ± 417*	4143 ± 528***	1919 ± 828 ^{ss}
IL-6 en plasma	153 ± 52	1470 ± 422	4135 ± 560*** ^{##}	3730 ± 832
TNF-a en cerebro	45 ± 13	237 ± 79*	402 ± 57***	165 ± 12 ^b
IL-6 en cerebro	26 ± 5	144 ± 99	285 ± 104	126 ± 84

Los datos se expresan como media ± error típico de la media (ETM). Los símbolos representan: *p<0,05 y ***p<0,001 en comparación con ratas control pseudooperadas, ^sp<0,05 y ^{ss}p<0,01 en comparación con ratas LCB + LPS y ^{##}p<0,01 en comparación con ratas LCB. Abreviaturas: pseudo = pseudooperadas. LCB = ligadura del conducto biliar. LPS = lipopolisacárido.

5

Cuando se comparó con ratas pseudooperadas (2,65 ± 0,17; figura 2B), se observó una elevación significativa en NFκB en cerebro con LCB (4,25 ± 0,13; p<0,001), que se redujo significativamente tras el tratamiento previo con OF (2,52 ± 0,19; p<0,0001).

- 10 En este ejemplo, las ratas LCB desde 4 semanas antes del estudio presentan enfermedad hepática crónica con hiperamonemia y un estado proinflamatorio indicado por elevación de las citoquinas arteriales y cerebrales. Adicionalmente, la administración de LPS a este modelo refleja un segundo éxito y en este contexto representa un episodio infeccioso con evidencia de exageración de la respuesta inflamatoria manifestada por un aumento en TNF-α y IL-6. El cerebro cirrótico muestra «edema citotóxico» clásico incluso en el grupo tratado con LPS. El amoníaco y la inflamación funcionan simultáneamente (y en sinergia) para producir edema cerebral y coma.

Se observó que el tratamiento con OF se asoció con una reducción también de las citoquinas proinflamatorias plasmática y cerebrales.

20 Modulación de la actividad eNOS en cerebro**Ejemplo 2**

- 25 La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor endógeno de eNOS, cuyos niveles están aumentados en la insuficiencia hepática. Se realizó un estudio para determinar si la administración de combinaciones de L-ornitina y fenilacetato afectaba a la ruta del NO. Este ejemplo aborda las preguntas: a) ¿se reduce la actividad eNOS en cerebros cirróticos? b) ¿aumenta el nivel de ADMA y disminuye el de hidrodiamino hidrolasa (DDAN, enzima que degrada la ADMA) en cerebros cirróticos? c) ¿están alterados otros reguladores de la actividad eNOS en cerebros cirróticos y se recuperan estos con L-ornitina en combinación con fenilacetato (OF)?

30

Las ratas Sprague-Dawley se estudiaron 4 semanas después de la ligadura del conducto biliar (LCB) (n=15) o de la pseudooperación (n=8) y se asignaron aleatoriamente al tratamiento con placebo u OF (0,6 mg/kg) por vía i.p. Se recogieron sangre arterial, tejido cerebral frontal y orina en el momento del sacrificio. Se midieron los niveles de amoníaco y aminoácidos en plasma usando Cobas-MiraS y HPLC, respectivamente. Se determinó el contenido en agua cerebral usando la técnica de peso seco. Se midieron los niveles de fenilacetilglutamina urinaria y ADMA en plasma y cerebro usando EMCL. La actividad eNOS se midió usando arginina marcada con ¹H y la expresión de eNOS, DDHA-1 y caveolina se midió usando inmunotransferencia.

35

- 40 El tratamiento de las ratas LCB con OF tuvo como resultado la normalización del amoníaco arterial (p<0,001), el agua cerebral (p<0,001) y un aumento de la fenilacetilglutamina urinaria (p<0,01). La actividad eNOS estaba significativamente reducida pero la expresión de la proteína eNOS era mayor en los animales LCB en comparación con los controles pseudooperados que se recuperaban hacia valores de pseudooperación en los animales tratados con OF. Los niveles de ADMA en cerebro eran significativamente mayores en ratas LCB en comparación con animales pseudooperados y de DDHA-1 en cerebro era significativamente menores, los cuales se reestablecían con el tratamiento con OF. Los niveles caveolina en cerebro eran significativamente menores en animales LCB, los cuales aumentaban hacia valores de pseudooperación en los animales tratados con OF.

45

Este ejemplo mostraba que la ruta del óxido nítrico en el cerebro se ve afectada de forma inversa por la hiperamonemia, la cual puede recuperarse mediante tratamiento con OF. Estos resultados demostraron que puede

usarse OF para el tratamiento de sistemas orgánicos que es sabido presentan una alteración de la señalización de NO en la cirrosis.

Ejemplo 3

5 Las ratas Sprague-Dawley pseudooperadas (n=10) y ratas LCB (n=10) se compararon cuatro semanas después de la cirugía de LCB y, en un grupo de LCB adicional (n=6), tras la administración de 3 g/kg i.p de OF dos veces al día durante 5 días. Se midieron los niveles de amoníaco y aminoácidos en plasma usando Cobas-Integra y HPLC, respectivamente. Se determinó el contenido en agua cerebral usando la técnica de peso seco. El TNF α se midió
10 mediante matrices de FACS con microesferas. La fenilacetilglutamina urinaria y la ADMA en plasma y cerebro se midieron usando CL-EM/EM, respectivamente. La actividad de eNOS y DDHA se midió radiométricamente. La expresión de proteínas para eNOS, DDAH-1 y 2 y caveolina-1 se midió mediante inmunotransferencia.

Como se muestra a continuación, los niveles de TNF- α en plasma (figura 3A) y cerebro (figura 3B) estaban
15 significativamente elevados en ratas LCB en comparación con los animales pseudooperados ($p < 0,01$, para ambos). El tratamiento con OF revertía estos cambios prácticamente a niveles de animales pseudooperados y esto era significativo cuando se comparaba con solo LCB ($p < 0,05$; $p < 0,01$, respectivamente).

Como se muestra en la figura 4, la actividad eNOS (figura 4A) estaba significativamente disminuida en cerebro de
20 ratas LCB en comparación con las pseudooperadas a pesar del aumento en la expresión de proteína eNOS (figura 4B). Tras el tratamiento con OF, la actividad eNOS revertía a niveles de animales pseudooperados, con una normalización similar de la expresión de la proteína eNOS. La proteína iNOS también estaba significativamente elevada en ratas LCB (figura 4C). El tratamiento con OF regulaba por disminución significativamente la proteína iNOS en comparación con solo LCB (figura 4C).

25 Como se muestra en la figura 5, la ADMA en plasma (figura 5A) estaba significativamente elevada en los homogeneizados de plasma ($p < 0,01$) y cerebro (figura 5B) ($p < 0,05$) de ratas BDL en comparación con las pseudooperadas. Tras el tratamiento con OF, no se observó una reducción significativa de la ADMA en plasma, pero si se observó una reducción significativa en la concentración de ADMA en cerebro en comparación con LCB.
30 Además, la expresión de proteína caveolina-1 cerebral (figura 5C) estaba significativamente aumentada en ratas LCB en comparación con las pseudooperadas ($p < 0,01$). El tratamiento con OF revertía la proteína caveolina-1 a niveles de animales pseudooperados ($p < 0,05$).

Como se muestra en la figura 6, la expresión de la proteína DDAH-1 cerebral (figura 6A) estaba significativamente
35 disminuida en ratas LCB ($p < 0,05$). Por el contrario, la expresión de proteína DDAH-2 cerebral (figura 6B) estaba significativamente elevada ($p < 0,05$) en comparación con los animales pseudooperados. Tras la administración de OF, la expresión de la proteína DDAH-1 aumentaba significativamente ($p < 0,05$) y la de DDAH-2 disminuía significativamente ($p < 0,05$) en comparación con los animales LCB. Además, la actividad DDAH (figura 6C) estaba significativamente elevada en el cerebro de ratas LCB en comparación con los animales pseudooperados. El
40 tratamiento OF disminuía significativamente ($p < 0,01$) la actividad DDAH en comparación con solo LCB ($p < 0,01$).

Modulación de la actividad eNOS en hígado

Ejemplo 4

45 En la cirrosis, la hipertensión portal se asocia con inflamación hepática que contribuye a una reducción de la actividad óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) intrahepática, que se asocia con un aumento de los inhibidores de NOS endógenos, la caveolina-1 y dimetilarginina asimétrica (ADMA). Este ejemplo es para determinar si el
50 tratamiento con combinaciones de L-ornitina y fenilacetato (OF) reduce NF κ B y aumenta la disponibilidad de NO intrahepático mediante la modulación de estos inhibidores dependientes inflamatorios de NOS endotelial y, por tanto, reduce la presión portal.

Las ratas Sprague-Dawley se estudiaron 4 semanas después de la cirugía de LCB (n=16) o de la pseudooperación (n=8) y se asignaron aleatoriamente al tratamiento con placebo u OF (0,6 g/kg) i.p. durante 5 días antes del estudio.
55 Las ratas se sometieron a medición directa de la presión portal bajo anestesia en el momento del sacrificio y se obtuvo plasma y tejido hepático para su análisis posterior. El amoníaco en plasma y los valores bioquímicos se midieron usando un analizador Cobas-MiraS y la actividad eNOS se determinó mediante radiometría. La expresión de proteínas para eNOS, DDAH-1, caveolina-1 y NF κ B se midió mediante inmunotransferencia.

El tratamiento con OF tuvo como resultado una reducción de la hiperamonemia ($p < 0,001$) hacia los valores de animales pseudooperados y un aumento de la actividad eNOS hepática hacia los niveles de animales pseudooperados. Esto se asoció con una reducción significativa de la presión portal en comparación en el grupo tratado con placebo ($11 \pm 0,4$ frente a $14 \pm 0,7$ mmHg, $p = 0,01$). Además, el tratamiento con OF reducía significativamente la expresión de caveolina-1 ($p < 0,05$) y aumentaba la expresión de dimetilarginina-dimetilamainohidrolasa-1 ($p < 0,05$) [DDAH 1 es responsable del metabolismo de ADMA], mientras también se reducía significativamente la expresión de NFkB fosforilado hepático, en comparación con los animales tratados con placebo.

10 Este ejemplo mostraba que el tratamiento de la hiperamonemia con OF reducía la gravedad de la hipertensión portal en un modelo clínicamente relevante de cirrosis mediante la restauración de la actividad eNOS hepática modulando NFkB y la expresión de los reguladores de eNOS, DDAH-ADMA y caveolina-1.

Ejemplo 5

15 Cuatro semanas después de la LCB y de la pseudocirugía en ratas Sprague-Dawley, se administraron a las ratas LCB 3 g/kg de OF i.p dos veces al día o vehículo solo ($n = 14/\text{grupo}$) y se trataron durante 5 días. Después del quinto día de tratamiento, todas las ratas se sometieron a una medición directa de la presión portal con anestesia antes del sacrificio. Se recogió plasma y tejido hepático para un análisis posterior. El amoniaco en plasma y los valores bioquímicos se midieron usando un analizador Cobas-Integra. El TNF α en plasma se midió mediante matrices de FACS con microesferas. La actividad eNOS se determinó mediante radiometría. La expresión de proteínas para eNOS, DDAH-1, caveolina-1 y NFkB se midió mediante técnicas convencionales de inmunotransferencia.

20 En la tabla 2 se indica el efecto de OF sobre el amoniaco arterial y la bioquímica plasmática de ratas LCB. La significación estadística se calculó usando la prueba *t* de Student y la prueba de comparaciones de Mann Witney. *: $p < 0,01$ frente a pseudo; **: $p < 0,001$ frente a pseudo; †: $p < 0,01$ frente a LCB; §: $p < 0,05$ frente a LCB; NS: no significativo.

Tabla 2.

Parámetros	Pseudo	LCB	LCB + OF
Amoniaco ($\mu\text{moles/l}$)	55,86 \pm 4,05	222,3 \pm 24,01**	127,1 \pm 47,8†
ALT (U/l)	26,88 \pm 2,61	159,8 \pm 10,81**	108,3 \pm 5,66†
Bilirrubina ($\mu\text{moles/l}$)	32,52 \pm 2,43	304,9 \pm 25,97**	267,7 \pm 14,5NS
Creatinina ($\mu\text{moles/l}$)	23,07 \pm 0,94	40,88 \pm 2,37*	32,38 \pm 1,44§
TNF- α (pg/ml)	121,9 \pm 46,4	822,9 \pm 203,1*	270,5 \pm 59,4§

30 Como se muestra en las figuras 7A y 7B, la actividad eNOS estaba significativamente aumentaba en animales LCB en comparación con los pseudooperados ($p < 0,05$) a pesar del aumento de la expresión de la proteína eNOS ($p < 0,01$). Tras el tratamiento con OF, la actividad eNOS revertía a niveles de animales pseudooperados, con una normalización similar de la expresión de la proteína eNOS ($p < 0,05$). Como se muestra en la figura 7C, la expresión de la proteína DDAH-1 era significativamente mayor en los animales pseudooperados en comparación con los animales LCB ($p < 0,01$). Tras la administración de OF a ratas LCB, la expresión de DDAH-1 aumenta significativamente y revierte a niveles de animales pseudooperados ($p < 0,05$). Como se muestra en la figura 7D, la expresión de proteínas de NFkB estaba significativamente elevada en ratas LCB en comparación con las pseudooperadas ($p < 0,01$). El tratamiento OF produce una notable reducción en la expresión de NFkB en comparación con los animales LCB ($p = 0,05$). Como se muestra en la figura 7E, la expresión de caveolina-1 estaba significativamente elevada en ratas LCB en comparación con las pseudooperadas ($p < 0,01$). Tras la intervención con OF, la expresión de caveolina-1 disminuía significativamente ($p < 0,05$) en comparación con solo LCB. Como se muestra en la figura 7C, la presión portal estaba significativamente elevada en ratas LCB en comparación con las pseudooperadas ($p < 0,0001$). El tratamiento OF daba lugar a una reducción del 30% de la presión portal en comparación con los animales LCB ($p < 0,01$).

Ejemplo 6

Este ejemplo permite determinar si el tratamiento con combinaciones de L-ornitina y fenilacetato (OF) mejora la función hepática (p. ej., perfusión).

Las ratas Sprague-Dawley se estudian 4 semanas después de la ligadura del conducto biliar (LCB) y se asignan aleatoriamente al tratamiento con placebo u OF. La función hepática de las ratas LCB se miden mediante diversos

procedimientos. Por ejemplo, la lesión hepática se detecta mediante la prueba de la alanina transaminasa (ALT), la prueba de la aspartato aminotransferasa (AST) y/o la prueba de la alfa glutatión S-transferasa (GST). La función hepática se mide mediante la prueba de la albúmina (Alb), la prueba del tiempo de protrombina y/o puntuaciones compuestas, como la puntuación de Child-Pugh y la puntuación MELD. La hemodinámica hepática se mide mediante la detección del flujo de sangre hepática y/o la presión portal.

La administración de OF es eficaz para mejorar y/o restaurar la función hepática, por ejemplo, aumento de la perfusión hepática, en las ratas LCB. El tratamiento OF también es eficaz para reducción la presión portal en las ratas LCB.

10

Ejemplo 7

Este ejemplo permite determinar si el tratamiento con combinaciones de L-ornitina y fenilacetato (OP) disminuye la hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas en ratas BDL con hipertensión portal.

15

Las ratas Sprague-Dawley se estudian 4 semanas después de la ligadura del conducto biliar (LCB) y se asignan aleatoriamente al tratamiento con placebo u OF. Se mide la presión portal de las ratas LCB. También se detecta la presencia de hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas en las ratas LCB y se mide el grado de hemorragia digestiva por rotura de varices esofágica en las ratas LCB.

20

La administración de OF es eficaz para reducir la presión portal y disminuir la hemorragia digestiva por rotura de varices en las ratas LCB.

Ejemplo 8

25

Este ejemplo permite determinar si el tratamiento con combinaciones de L-ornitina y fenilacetato (OF) disminuye la ascitis en ratas LCB con hipertensión portal.

Las ratas Sprague-Dawley se estudian 4 semanas después de la ligadura del conducto biliar (LCB) y se asignan aleatoriamente al tratamiento con placebo u OF. Se mide la presión portal de las ratas LCB. También se detecta la ascitis en las ratas LCB y se mide el grado de ascitis de las ratas LCB.

30

La administración de OF es eficaz para reducir la presión portal y la ascitis en las ratas LCB.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada entre hipertensión portal e hipertensión portal relacionada con hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas y ascitis en un sujeto, donde el sujeto sufre preferiblemente una enfermedad hepática, una enfermedad hepática crónica, cirrosis o una insuficiencia hepática aguda.
5
2. Una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, para su uso en el retraso o reducción de la probabilidad de desarrollo de hipertensión portal en un sujeto, donde el sujeto sufre preferiblemente una enfermedad hepática, una enfermedad hepática crónica, cirrosis o una insuficiencia hepática aguda.
10
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la composición está compuesta de L- ornitina y fenilacetato o fenilbutirato en una dosis de entre 20 g y 40 g.
15
4. Una composición que comprende L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato para su uso en la recuperación de la función hepática en un sujeto, donde el sujeto padece hipertensión portal.
- 20 5. La composición para su uso según la reivindicación 4, en la que la recuperación de la función hepática reduce la hipertensión portal en el sujeto.
6. La composición para su uso según la reivindicación 4, donde la recuperación de la función hepática comprende aumentar la perfusión hepática.
25
7. La composición para su uso según la reivindicación 1, 2 o 4, donde el tratamiento de la hipertensión portal, el retraso o reducción de la probabilidad de aparición de hipertensión portal o la recuperación de la función hepática respectivamente se consigue reduciendo el nivel de citoquinas proinflamatorias o aumentando la actividad óxido nítrico sintetasa en el sujeto.
30
8. La composición para su uso según la reivindicación 1, 2 o 4, donde la composición comprende L-ornitina y fenilacetato, sales fisiológicamente aceptables independientes de dicha L-ornitina y al menos uno de entre fenilacetato y fenilbutirato, un aminoácido monomérico libre o una sal fisiológicamente aceptable de L-ornitina, fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico.
35
9. La composición para su uso según la reivindicación 1, 2 o 4, donde dicha composición es para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, intragástrica o intravascular, preferiblemente para administración oral o intravenosa.

FIGURA 1A-D

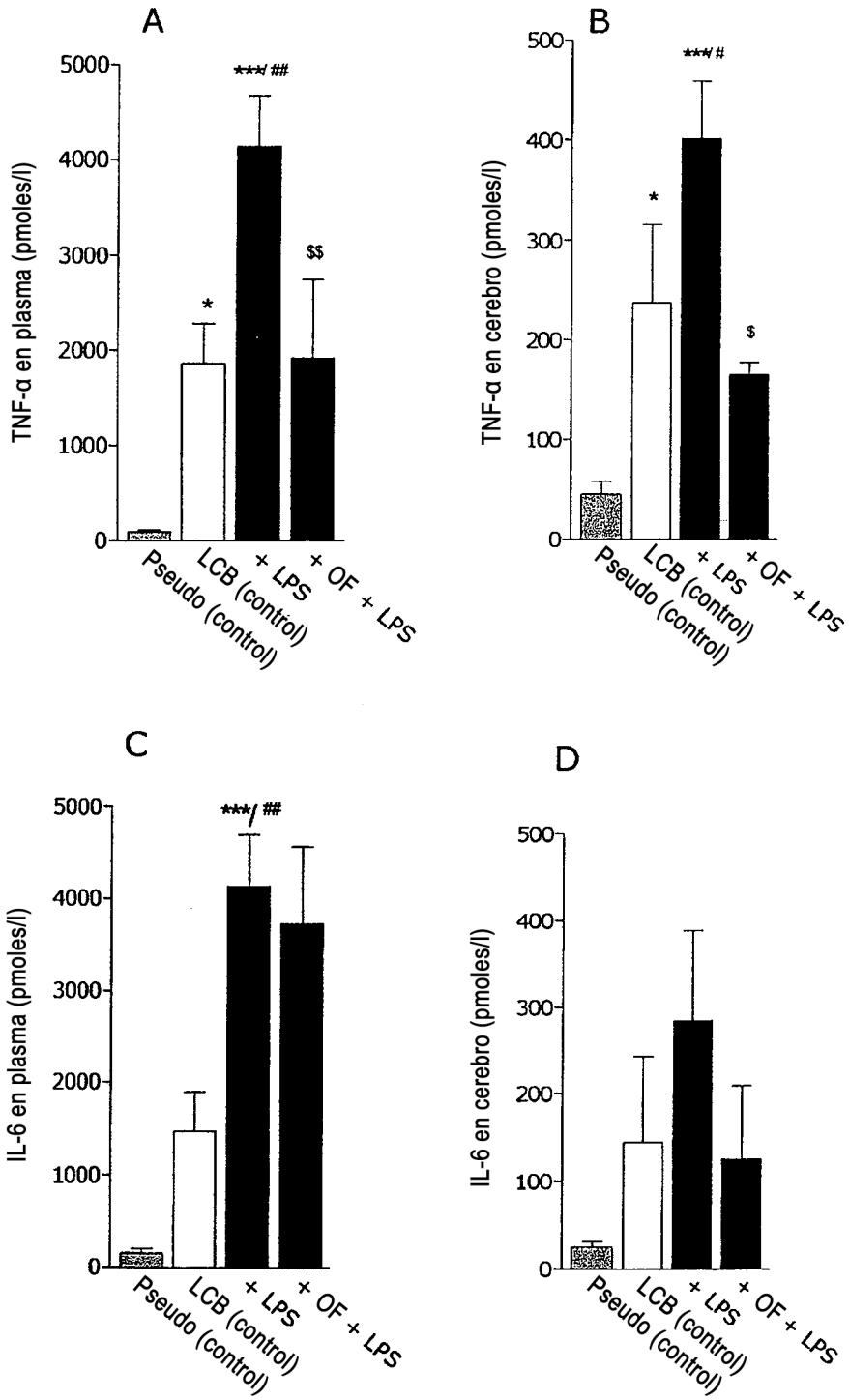
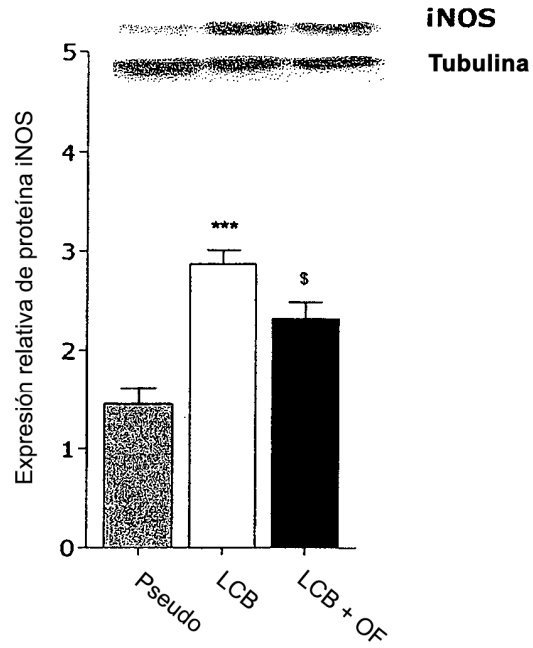


FIGURA 2A-B

A. Expresión de iNOS en cerebro



B) Expresión de NFκB en cerebro

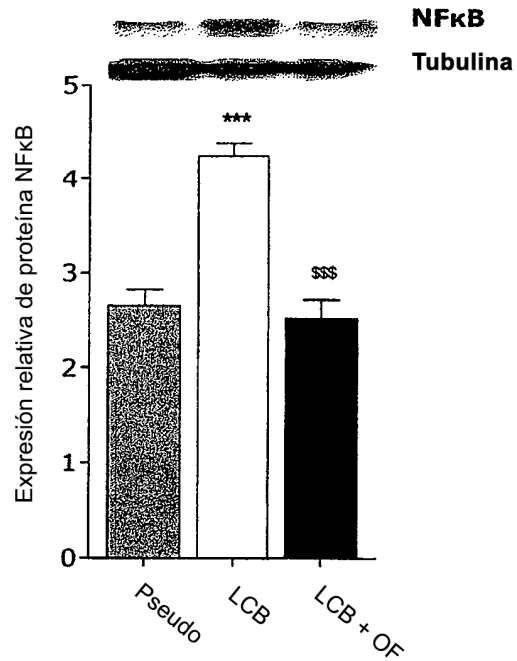
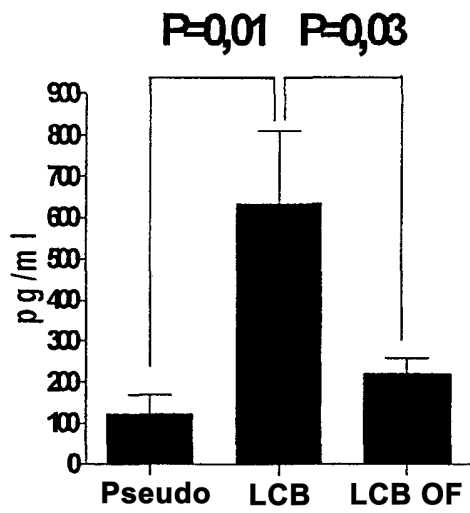


FIGURA 3A-B

A.



B.

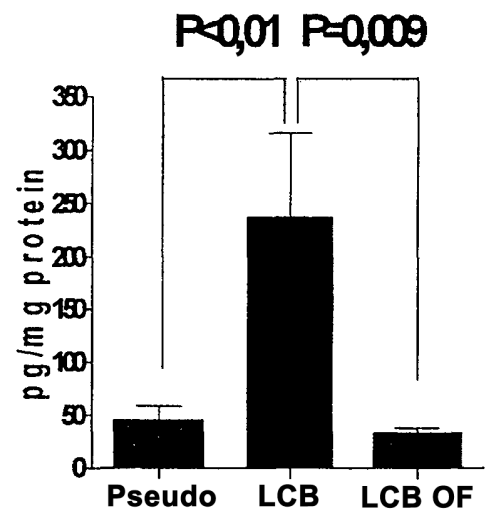
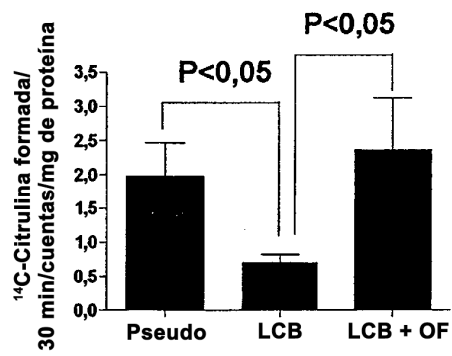
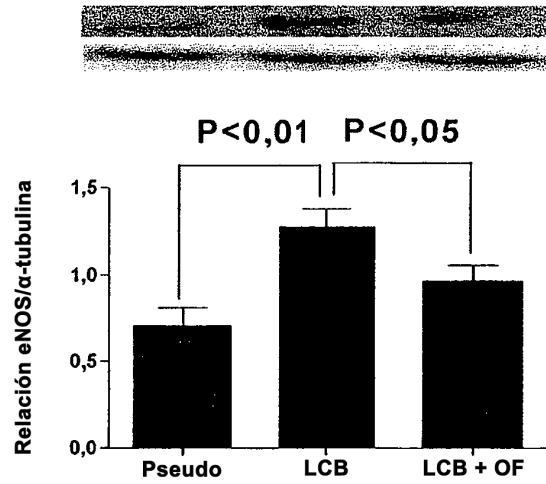


FIGURA 4A-C

A.



B.



C.

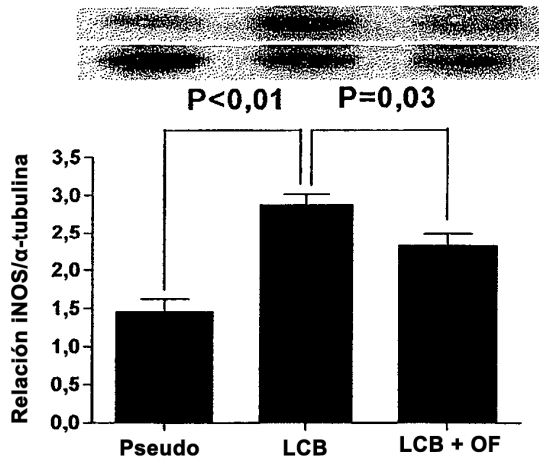
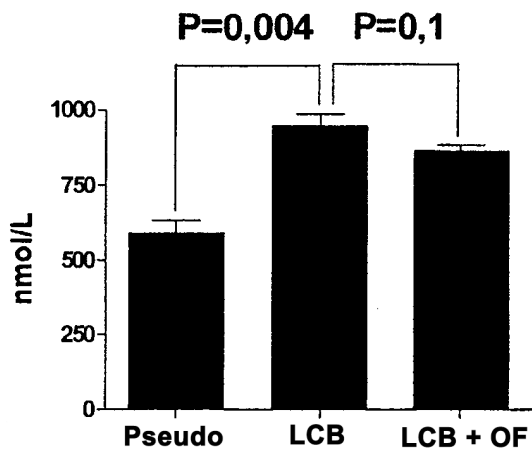
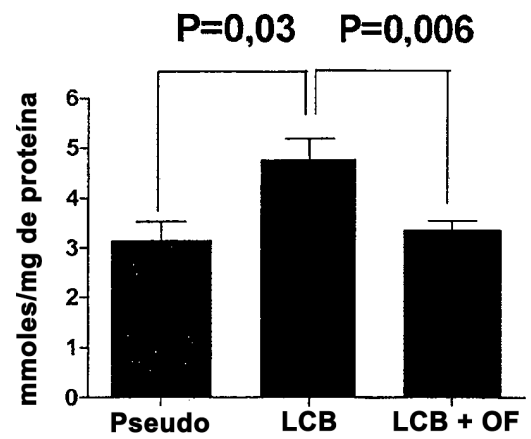


FIGURA 5A-C

A.



B.



C.

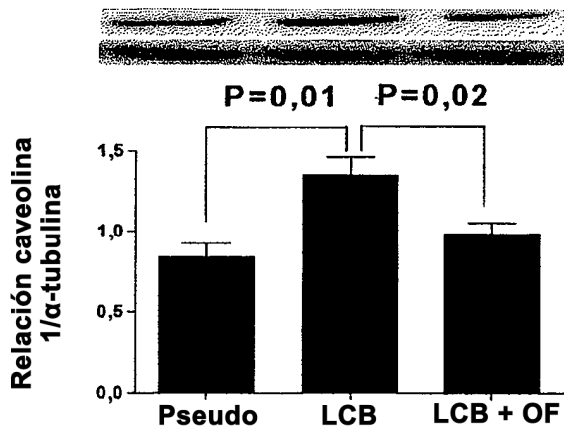
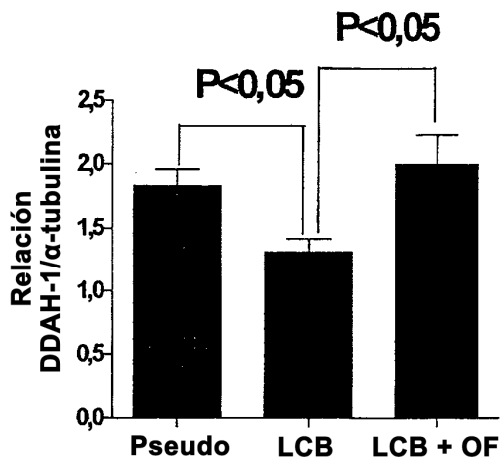
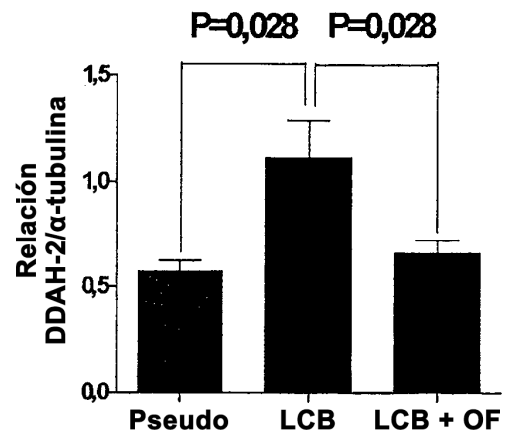


FIGURA 6A-C

A.



B.



C.

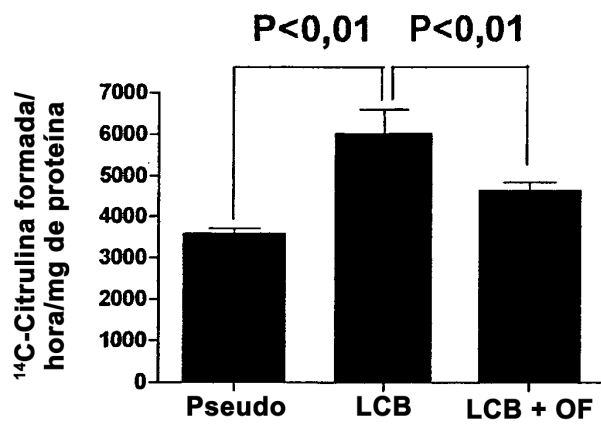
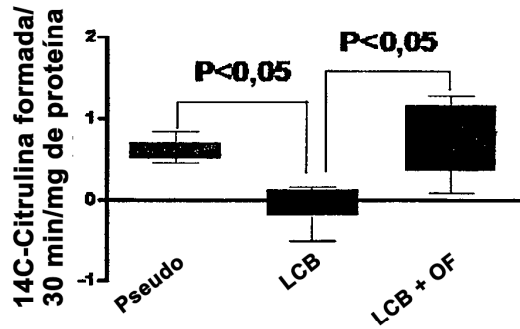
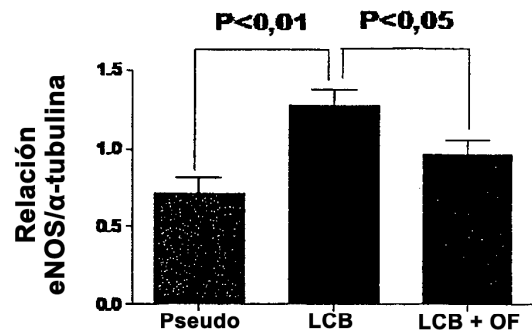


FIGURA 7A-C

A. Actividad eNOS hepática



B. Expresión de la proteína eNOS hepática



C. Expresión de la proteína DDAH-1 hepática

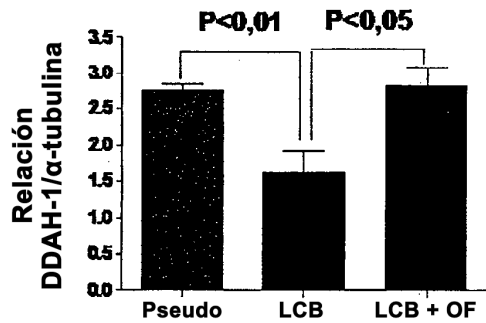
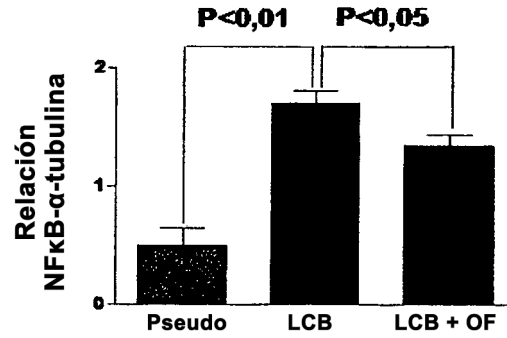
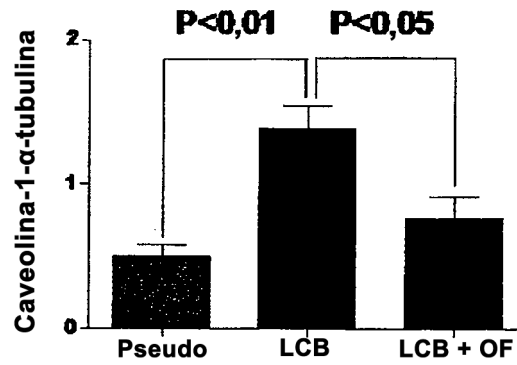


FIGURA 7D-F

D. Expresión de la proteína NFκB hepática



E. Expresión de la proteína caveolina-1 hepática



F. Presión portal

