

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 974**

51 Int. Cl.:

A61P 1/16 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 10014283 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2319581**

54 Título: **Composiciones que comprenden ornitina y fenilacetato o fenilbutirato para el tratamiento de la encefalopatía hepática**

30 Prioridad:

26.11.2004 GB 0426141

26.11.2004 GB 0426142

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

16.06.2015

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)

**The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

JALAN, RAJIV y

JALAN, KAMAL NAYAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 537 974 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden ornitina y fenilacetato o fenilbutirato para el tratamiento de la encefalopatía hepática

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la prevención o al tratamiento de la hiperamonemia.

10 **Antecedentes de la invención**

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

15

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

20

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

25

30

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

35

40

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

45

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

50

55

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

60

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

65

No obstante, una vez que se produce la descompensación hepática, las posibilidades de supervivencia se reducen, y el trasplante de hígado es el único tratamiento que puede prolongar la vida. Debido a que es la descompensación hepática la que conduce a una esperanza de vida reducida, es muy deseable evitar que se produzca la descompensación hepática.

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

10 Lyer *et al* ("Molecular and Cellular Biology" 2002, 22:4491-4498) informan que un ratón knockout que portaba un gen de arginasa hepática no funcional (AI) presentó síntomas graves de hiperamoníaquemia y murió entre el décimo y décimocuarto día de su nacimiento. Batshaw *et al* (*Journal of Pediatrics* 2001, 138:S46-S55) describen el uso de un tratamiento de vías alternativas como metodología de tratamiento para los errores congénitos del ciclo de la urea. Este incluye el tratamiento de las crisis hiperamoníaquémicas agudas con benzoato de sodio/fenilacetato de sodio intravenoso más arginina. Tuchman *et al* ("The Endocrinologist" 2002, 12:99-109) describen el tratamiento de trastornos hereditarios de ureagénesis que incluyen deficiencias hereditarias en enzimas del ciclo de la urea y otras proteínas.

20 Stewart *et al* (*American Journal of Physiology* 1981, 241:E310-E315) informan de que gatos que desarrollaron hiperamoníaquemia tras una comida exenta de arginina tenían bajos niveles hepáticos de ornitina. Rogers & Phang (*Journal of Nutrition* 1985, 155:146-150) sugieren que la actividad de la pirrolina-5-carboxilato sintasa reducida puede ser la base metabólica para la hiperamoníaquemia grave encontrada en gatos alimentados con dieta deficiente en arginina.

25 Lukkarinen *et al* ("Metabolism" 2003, 52:935-938) informan que, en la intolerancia a la proteína lisinúrica (LPI), la absorción intestinal y la reabsorción tubular renal de la arginina, la ornitina y la lisina se ven afectadas debido al transportador de aminoácidos catiónicos defectuoso, y que la deficiencia de arginina y ornitina restringe la función del ciclo de la urea, conduciendo a hiperamoníaquemia tras la carga de la proteína y a una fuerte aversión a la proteína.

30 Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato para prevenir o tratar la hiperamoníaquemia. En particular, la invención proporciona ornitina para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperamoníaquemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda, siendo dicha ornitina usada en combinación con al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato. La invención también proporciona al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperamoníaquemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda, siendo dicho fenilacetato y/o fenilbutirato usado en combinación con ornitina.

40 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra que la función de neutrófilos está alterada en pacientes con cirrosis y empeora al aumentar la gravedad de la hepatopatía.

45 La Figura 2 muestra que el amoníaco reduce la fagocitosis de los neutrófilos.

La Figura 3 muestra que el amoníaco reduce la quimiotaxis de los neutrófilos.

La Figura 4 muestra que el efecto del amoníaco sobre la fagocitosis de los neutrófilos se puede invertir mediante intervenciones.

50 La Figura 5 muestra que una hemorragia gastrointestinal simulada reduce la quimiotaxis de los neutrófilos que se puede invertir parcialmente mediante administración de isoleucina.

La Figura 6 muestra que una hemorragia simulada reduce la síntesis de proteínas y estimula la oxidación de la isoleucina de forma inapropiada.

La Figura 7 muestra que la administración de isoleucina durante una hemorragia simulada potencia la síntesis de proteínas, pero no reduce la concentración de amoníaco.

55 La Figura 8 muestra que la administración con LOLA reduce la concentración de amoníaco, pero permite que el amoníaco se regenere.

La Figura 9 muestra que la eliminación activa de glutamina previene un aumento secundario de la concentración de amoníaco.

60 La Figura 10 muestra que el fenilacetato se une a glutamina para formar un compuesto excretable y previene el aumento secundario del amoníaco.

La Figura 11 muestra el efecto de la ornitina y del fenilbutirato sobre los niveles de amoníaco en pacientes con cirrosis avanzada.

La Figura 12 muestra el efecto de la ornitina y del fenilbutirato sobre los niveles de glutamina en pacientes con cirrosis avanzada.

65 La Figura 13 muestra los cambios en el estado mental de pacientes tratados con placebo, O, P u O+P.

La Figura 14 muestra el efecto de la ornitina, del fenilbutirato y de la isoleucina sobre los niveles de amoníaco en

pacientes con cirrosis avanzada.

La Figura 15 muestra el efecto de la ornitina, del fenilbutirato y de la isoleucina sobre los niveles de glutamina en pacientes con cirrosis avanzada.

5 La Figura 16 muestra el efecto de la ornitina, del fenilbutirato y de la isoleucina sobre los niveles de glicina en pacientes con cirrosis avanzada.

La Figura 17 muestra el efecto de la ornitina, del fenilbutirato y de la isoleucina sobre los niveles de isoleucina en pacientes con cirrosis avanzada.

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

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

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

15 La Figura 21 muestra el efecto de la ornitina, del fenilbutirato y de la isoleucina sobre los niveles de amoniaco en plasma arterial en un modelo de rata con insuficiencia hepática aguda hiperamoniacuémica.

La Figura 22 muestra el leve aumento del amoniaco arterial en el modelo en cerdo desvascularizado de insuficiencia hepática aguda con tratamiento con OP.

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

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

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

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

La Figura 27 muestra que los niveles arteriales de ornitina aumentan en los dos animales (grupos de O solo y OP) a quienes se les administra.

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

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

La Figura 30 muestra que la ornitina sola provocó un aumento del agua cerebral, el fenilacetato indujo una pequeña reducción del agua cerebral, mientras que, en combinación, estos agentes producen una reducción sustancial del agua cerebral (% de control).

35

Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas los términos "comprenden" e "incluyen" y las variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de forma inclusiva. Es decir, dichos términos pretenden conllevar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no mencionados específicamente, donde el contexto lo permita.

40

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

45

Sujetos que se van a tratar

50

La presente invención se refiere a la prevención o al tratamiento de la hiperamoniacuemia. En particular, la invención se refiere a la prevención o al tratamiento de la hiperamoniacuemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda. El sujeto puede tener hepatopatía crónica. El sujeto puede tener cirrosis hepática. El sujeto puede tener insuficiencia hepática aguda. El sujeto por tratar puede tener encefalopatía hepática.

55

El inicio de la hepatopatía tanto aguda como crónica se puede deber a una causa xenobiótica. Por ejemplo, el sujeto puede haber estado expuesto a un producto químico, fármaco o algún otro agente que provoque daño hepático. El sujeto puede tener una reacción a un fármaco sin receta, preceptivo o "recreativo" que provoque daño hepático. El sujeto puede haber estado tomando Rezulin™ (troglitazona; Parke-Davis), Serzone™ (nefazodona; Bristol-Myers Squibb) u otros fármacos que se cree que causan daño hepático. El sujeto puede haber sufrido una sobredosis de un determinado fármaco o haber superado la dosis recomendada de un fármaco capaz de provocar daño hepático. Por ejemplo, el sujeto puede haber tomado una sobredosis de paracetamol. El sujeto puede haber estado expuesto a productos químicos que puedan causar daño hepático tal como, por ejemplo, en su lugar de trabajo. Por ejemplo, el sujeto puede haber estado expuesto a dichos productos químicos en un contexto industrial o agrícola. El sujeto puede haber consumido plantas que contengan compuestos que puedan provocar daño hepático, en particular, se puede dar el caso de que el sujeto sea un animal, tal como un herbívoro. Por ejemplo, el sujeto puede haber

65

consumido una planta que contenga alcaloide de pirrolizidina tal como hierba cana. El sujeto puede haber estado expuesto a toxinas ambientales que se cree que provocan hepatopatía.

5 La toxicidad hepática relacionada con fármacos comprende más del 50 % de todos los casos con hepatopatía aguda (insuficiencia hepática aguda). La toxicidad por acetaminofeno (también conocido como paracetamol y *N*-acetil-p-aminofenol) es la causa más común de insuficiencia hepática aguda en Estados Unidos y Gran Bretaña. Los consumidores a largo plazo de cantidades moderadas a abusivas de alcohol que toman acetaminofeno en dosis terapéuticas o moderadamente excesivas se encuentran en riesgo de sufrir lesión hepática grave y posiblemente insuficiencia hepática aguda. El consumo de alcohol potencia los efectos tóxicos del acetaminofeno. La toxicidad idiosincrática del fármaco también contribuye a la insuficiencia hepática aguda. Se cree que la toxicidad idiosincrática del fármaco es una respuesta de hipersensibilidad en la que el sujeto responde a un fármaco de una manera farmacológicamente anómala. Esta respuesta anómala puede conducir a insuficiencia hepática aguda.

15 La insuficiencia hepática aguda o hepatopatía crónica puede estar causada por la infección por un organismo patógeno. Por ejemplo, la hepatopatía se puede deber a una infección vírica. En particular, el sujeto puede estar infectado, o haber estado infectado, por un virus que causa hepatitis. El sujeto puede tener hepatitis vírica crónica. El virus puede ser, por ejemplo, el virus de la hepatitis B, C o D. En algunos casos, y en particular cuando el sujeto tenga hepatitis vírica, el sujeto también puede estar infectado con VIH-I o II. El sujeto puede tener SIDA. Es posible que el sujeto pueda haber estado, o esté, infectado por otros organismos que causen hepatopatía y, en particular, aquellos que estén presentes en el hígado durante alguna fase de su ciclo vital. Por ejemplo, el sujeto puede tener, o haber tenido, fasciola hepática.

25 El sujeto puede tener una enfermedad hereditaria que cause, o aumente el riesgo de, hepatopatía crónica. Por ejemplo, el sujeto puede tener una o más entre hemocromatosis hepática, enfermedad de Wilson o deficiencia de α -1-antitripsina. El sujeto puede tener un trastorno hereditario que causa algún tipo de anomalía estructural o funcional en el hígado, que aumente la probabilidad de fibrosis hepática. El sujeto puede tener predisposición genética a desarrollar un trastorno autoinmune que dañe el hígado y, por lo tanto, que pueda contribuir a la fibrosis hepática.

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

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

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

50 En otras realizaciones de la invención, el sujeto puede tener una o más de una serie de otras afecciones conocidas por provocar daño hepático tales como, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica autoinmune y/o esquistosomiasis (infección parasitaria). El sujeto puede tener o haber tenido un bloqueo del conducto biliar. En algunos casos, la causa subyacente de la hepatopatía crónica puede ser desconocida. Por ejemplo, el sujeto puede haber sido diagnosticado de cirrosis criptogénica. En una realización, el sujeto puede ser sospechoso de tener cualquiera de las afecciones enumeradas en el presente documento.

60 Los métodos de diagnóstico de la hepatopatía crónica, la insuficiencia hepática aguda y la encefalopatía hepática se conocen bien en la técnica y, en particular, por parte de los facultativos y veterinarios de este campo. Preferentemente, el sujeto habrá sido diagnosticado de hepatopatía y encefalopatía hepática, por ejemplo, por un profesional médico o veterinario. El sujeto puede presentar uno o más síntomas asociados con la hepatopatía tales como uno o más entre ictericia, ascitis, cambios cutáneos, retención de líquidos, cambios en las uñas, facilidad para la aparición de hematomas, hemorragias nasales, varices esofágicas y, en sujetos varones, pueden tener aumento del tamaño de las mamas. El sujeto puede presentar cansancio, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, debilidad y/o pérdida de peso. El sujeto puede presentar además uno o más síntomas asociados con la encefalopatía hepática tales como uno o más entre confusión, desorientación, demencia, estupor, coma, edema cerebral, fallo multiorgánico (insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardiovascular o insuficiencia renal), rigidez muscular, ataques o alteración

del habla. El sujeto que se vaya a tratar puede, o no, estar tomando otros fármacos para tratar la hepatopatía. El sujeto que se vaya a tratar puede encontrarse en riesgo de desarrollar encefalopatía hepática.

La hepatopatía se puede haber confirmado o confirmar mediante examen físico incluyendo técnicas tales como ultrasonido. Se pueden haber tomado biopsias de hígado para observar el aspecto de la fibrosis, células necróticas, degeneración celular y/o inflamación y otros rasgos característicos de la hepatopatía. Se puede haber evaluado la función hepática en el sujeto para determinar si está comprometida en el sujeto. Es posible caracterizar la naturaleza y la causa subyacente de la hepatopatía. Se puede determinar cualquier historial de exposición a agentes causantes de hepatopatía.

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

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

Un varón o una mujer que se vaya a tratar puede ser adulto, por ejemplo de 25 a 80 años. En una realización, el varón o la mujer tiene una edad de 45 a 70 años. En otra realización, el varón o la mujer tiene una edad de 25 a 44 años. En una realización adicional, el varón o la mujer tiene una edad superior a 65 años.

No obstante, la invención tiene uso veterinario. El sujeto que se vaya a tratar puede ser un animal de granja, por ejemplo, una vaca o un toro, una oveja, un cerdo, un buey, una cabra o un caballo, o puede ser un animal doméstico tal como un perro o un gato. El sujeto puede ser o no un modelo animal para la hepatopatía. El animal puede tener cualquier edad, pero normalmente será un sujeto adulto maduro.

Formulación

Los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser aminoácidos cristalinos puros. En general, los aminoácidos están en la forma L, en lugar de la forma D, o una mezcla de D y L. Por lo general, se usan las formas aisladas de los aminoácidos. Se puede usar cualquier forma activa del aminoácido para prevenir o tratar la descompensación hepática o la encefalopatía hepática. Se puede usar una forma farmacéuticamente aceptable del aminoácido. Los aminoácidos se pueden emplear como aminoácidos libres, o sales o derivados de aminoácidos.

La ornitina puede estar en forma de aminoácido cristalino puro. En general, la ornitina está en la forma L, en lugar de la forma D, o una mezcla de D y L. Por lo general, se usan formas aisladas de ornitina. Se puede usar cualquier forma activa de ornitina o se puede usar una forma farmacéuticamente aceptable de ornitina. La ornitina se puede emplear como un aminoácido libre, o una sal o un derivado de aminoácido.

Por lo general, la ornitina se usa como un solo aminoácido monomérico. La ornitina se puede usar en forma de sal, por ejemplo, se puede usar clorhidrato de ornitina. La ornitina puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable en forma libre. Por lo tanto, la ornitina o la sal de ornitina normalmente no están unidas químicamente ni enlazadas covalentemente a ningún otro agente.

Se pueden usar derivados de ornitina. Por ejemplo, se pueden administrar análogos ceto o hidroxilo de ornitina como sales de sodio o de calcio. Los cetoácidos de ornitina incluyen cetoglutaratato de ornitina, cetoleucina de ornitina y cetovalina de ornitina. Se pueden usar sales o derivados de ornitina en lugar de o además de la ornitina libre.

Se puede usar al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato. El fenilacetato y/o fenilbutirato pueden estar en forma de sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de metal alcalino o metal alcalinotérreo. La sal puede ser fenilacetato sódico fenilbutirato sódico. La forma de sal de fenilacetato y fenilbutirato puede estar en forma libre. Por lo tanto, el fenilacetato y fenilbutirato o la sal de fenilacetato y la sal de fenilbutirato normalmente no están unidas químicamente ni enlazadas covalentemente a ningún otro agente.

Opcionalmente, se usa isoleucina. La isoleucina puede estar en forma de aminoácido cristalino puro. En general, la isoleucina está en la forma L, en lugar de en la forma D, o una mezcla de D y L. Por lo general, se usan formas aisladas de isoleucina. Se puede usar cualquier forma activa de isoleucina o se puede usar una forma farmacéuticamente aceptable de isoleucina. La isoleucina se puede emplear como un aminoácido libre, o una sal o derivado de aminoácido.

Por lo general, la isoleucina se usa como un solo aminoácido monomérico. La isoleucina se puede usar en forma de sal, por ejemplo, se puede usar clorhidrato de isoleucina. La isoleucina puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable en forma libre. Por lo tanto, la isoleucina o la sal de isoleucina normalmente no están químicamente unidas ni enlazadas covalentemente a ningún otro agente.

Composiciones farmacéuticas

La ornitina y el fenilacetato y/o el fenilbutirato se formulan normalmente para la administración con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables. La ornitina y el fenilacetato y/o el fenilbutirato se pueden formular, por tanto, como un medicamento con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales como es habitual en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de la formulación dependerá de varios factores incluyendo la vía de administración deseada. Por lo general, la ornitina y el fenilacetato y/o el fenilbutirato se formulan para la administración oral, intravenosa, intragástrica, intravascular o intraperitoneal.

El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica tal como una solución salina fisiológica. Las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, magnesio o estearato cálcico, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo, almidones, goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, ácido alginico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; tintes; edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas se pueden fabricar de manera conocida, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulado, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con película.

Las dispersiones líquidas para la administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y las emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, goma de agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con la ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo, propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Los medicamentos de la invención pueden comprender ornitina como el único componente de aminoácido. Los medicamentos de la invención pueden comprender ornitina e isoleucina como los únicos componentes de aminoácido. El medicamento puede consistir esencialmente en ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato. El medicamento puede consistir esencialmente en ornitina, isoleucina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato.

El medicamento puede consistir esencialmente en ornitina, fenilacetato y/o fenilbutirato y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, dicho medicamento no contiene sustancialmente ningún otro aminoácido además de ornitina. El medicamento puede consistir esencialmente en ornitina, isoleucina, fenilacetato y/o fenilbutirato y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, dicho medicamento no contiene sustancialmente ningún otro aminoácido además de ornitina e isoleucina.

El fenilacetato puede estar presente en una cantidad del aproximadamente 5 al 100 %, por ejemplo, del 10 al 50 %, o del 20 al 40 % en peso del peso de ornitina. El fenilbutirato puede estar presente en una cantidad del aproximadamente 5 al 100 %, por ejemplo, del 10 al 50 %, o del 20 al 40 %, en peso del peso de ornitina.

Sin embargo, el medicamento puede comprender aspartato, glutamato o arginina libre en forma no peptídica, normalmente en una cantidad irrelevante. En general, la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina no supera la cantidad en peso de la ornitina. La expresión "cantidad irrelevante" pretende significar que la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina, o una combinación de estos aminoácidos, no supera el 20 % en peso de ornitina. Por lo tanto, el medicamento puede no comprender sustancialmente aspartato. En una realización, la composición no comprende aspartato, glutamato o arginina. En la composición puede haber cantidades mínimas de aspartato, glutamato o arginina. La expresión "cantidad mínima" pretende significar que la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina, o una combinación de estos aminoácidos, no supera el 1 % en peso de ornitina. Preferentemente, la cantidad en peso de aspartato, glutamato o arginina no supera el 0,5 % en peso de ornitina.

En otra realización, la composición puede comprender otros aminoácidos más en forma no peptídica, normalmente como el aminoácido libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en forma libre. En general, la cantidad de estos otros aminoácidos no supera la cantidad en peso de la ornitina. Por ejemplo, los otros aminoácidos pueden estar presentes en una cantidad en peso de hasta el 20 %, por ejemplo, del 5 al 20 %, del peso de ornitina. Dichos otros aminoácidos que pueden estar presentes en la composición incluyen aminoácidos esenciales y no esenciales. La composición puede comprender otros aminoácidos de cadena ramificada (BCAA). Los BCAA incluyen isoleucina, valina y leucina. Así pues, una composición de la invención puede comprender además isoleucina y/o valina y/o leucina.

10 *Tratamiento*

La ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato se administran en combinación a un sujeto para prevenir o retrasar la hiperamoniaquemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda. La ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato se pueden administrar, por tanto, en combinación para mejorar el estado de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que padece hepatopatía crónica tras un hecho desencadenante. La ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato se pueden administrar en combinación para aliviar los síntomas de un sujeto, por ejemplo, los síntomas asociados con hepatopatía crónica en un sujeto tras un hecho desencadenante. La ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato se pueden administrar en combinación para combatir o retrasar el inicio de la descompensación hepática o encefalopatía hepática.

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

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

Un sujeto que ha sufrido o del que se sospecha que ha sufrido un ataque agudo se puede tratar con ornitina y fenilacetato y/o fenilbutirato en combinación para prevenir el avance del hígado al estado descompensado. Por lo tanto, el tratamiento puede prevenir las consecuencias médicas de la descompensación hepática tales como la encefalopatía hepática. La ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato se pueden usar para conservar la función hepática. Así pues, el uso de ornitina y fenilacetato y/o fenilbutirato puede prolongar la vida de un paciente con hepatopatía. En una realización, se previenen las consecuencias metabólicas de una hemorragia gastrointestinal tales como hiperamoniaquemia, hipoisoleucemia y síntesis de proteínas reducida en el período posterior a la hemorragia.

Por lo general, el tratamiento de sujetos puede comenzar lo antes posible después del inicio o el inicio sospechado de un hecho desencadenante (ataque agudo). Preferentemente, el tratamiento del sujeto comienza antes de ataques agudos repetidos. Más preferentemente, el tratamiento del sujeto comienza después del primer ataque agudo.

El tratamiento se administra normalmente inmediatamente después del comienzo de un ataque agudo. El tratamiento puede comenzar después de detectarse el/los síntoma/s de un ataque agudo o ataque agudo sospechado, por ejemplo, por parte de médico tal como un facultativo, un profesional paramédico o de enfermería. El tratamiento puede comenzar tras la hospitalización del sujeto. El tratamiento, por tanto, puede comenzar en el plazo de 6 horas, de 3 horas, de 2 horas o de 1 hora después de detectarse el/los síntoma/s de un ataque agudo o ataque agudo sospechado. El tratamiento del sujeto puede comenzar, por tanto, de 1 a 48 horas, por ejemplo, de 1 a 36 horas o de 1 a 24 horas después de detectarse el/los síntoma/s de un ataque agudo o ataque agudo sospechado.

El tratamiento se puede prolongar durante hasta 8 semanas, por ejemplo, hasta 6 semanas, hasta 4 semanas o hasta 2 semanas después de detectarse el/los síntoma/s de un ataque agudo o ataque agudo sospechado. El tratamiento se puede prolongar, por lo tanto, durante hasta 48 horas, por ejemplo, durante hasta 36 horas o durante hasta 24 horas después de detectarse el/los síntomas de un ataque agudo o ataque agudo sospechado. Por lo general, el tratamiento se produce hasta el momento en que la recuperación del hecho desencadenante agudo es evidente.

El sujeto se trata con la ornitina y el fenilacetato y/o el fenilbutirato. La ornitina y al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato se pueden administrar en combinación en un solo medicamento, o por separado, en dos o tres medicamentos diferentes. Cuando la ornitina y al menos uno entre el fenilacetato y fenilbutirato se deben administrar en un medicamento combinado, la combinación se puede preparar inmediatamente antes de la administración, o se puede almacenar como un medicamento combinado.

Cuando la ornitina y el fenilacetato y/o fenilbutirato se deben administrar por separado, los medicamentos se pueden administrar simultánea o secuencialmente durante un período de tiempo. Se pueden administrar dos o más medicamentos diferentes durante un período de tiempo.

Cuando se administran dos medicamentos, primero se puede administrar la ornitina, seguida de la administración del fenilacetato y del fenilbutirato, del fenilacetato o del fenilbutirato. Como alternativa, se pueden administrar primero el fenilacetato y el fenilbutirato, el fenilacetato o el fenilbutirato, y a continuación la ornitina. En otra realización, se puede administrar primero una combinación de ornitina y fenilacetato, seguida de la administración de fenilbutirato. Como alternativa, se puede administrar primero una combinación de ornitina y fenilbutirato, seguida de la administración de fenilacetato. En otra realización, se puede administrar primero el fenilacetato, seguido de la administración de una combinación de ornitina y fenilbutirato.

Como alternativa, se puede administrar primero el fenilbutirato, seguido de la administración de una combinación de ornitina y fenilacetato.

Cuando se administran tres medicamentos, la ornitina, el fenilacetato y el fenilbutirato se administran en distintos momentos. La ornitina se puede administrar en primer, segundo o tercer lugar. Cuando la ornitina se administra en primer lugar, el fenilacetato o el fenilbutirato se puede administrar en segundo lugar, seguido de la administración del fenilbutirato o del fenilacetato. Cuando la ornitina se administra en segundo lugar, primero se administra el fenilacetato o el fenilbutirato, administrándose en tercer lugar el fenilbutirato o el fenilacetato. Cuando la ornitina se administra en tercer lugar, primero se administra el fenilacetato o el fenilbutirato, administrándose en segundo lugar el fenilbutirato o el fenilacetato.

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

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

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

Se administran cantidades terapéuticamente eficaces de ornitina, fenilacetato y/o fenilbutirato y de la isoleucina opcional al sujeto. Las dosis de la ornitina, del fenilacetato y/o del fenilbutirato y de la isoleucina se pueden determinar de acuerdo con diversos parámetros tales como la edad, el peso y el estado del sujeto que se vaya a tratar; el tipo y la gravedad de la hepatopatía; la vía de administración; y la pauta de dosificación requerida.

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

Se puede administrar una sola dosis de ornitina y una sola dosis de fenilacetato y/o fenilbutirato. Opcionalmente, se puede administrar una sola dosis de isoleucina. Como alternativa, se pueden administrar múltiples dosis, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco dosis, de ornitina y/o fenilacetato y/o fenilbutirato y/o de la isoleucina opcional. Dichas múltiples dosis se pueden administrar durante un período de un mes o dos semanas o una semana. En otra

realización, se puede administrar diariamente una sola dosis o múltiples dosis tales como dos, tres, cuatro o cinco dosis de ornitina y/o de fenilacetato y/o fenilbutirato.

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

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

Se puede administrar una sola dosis del o de cada uno de los otros aminoácidos. Como alternativa, se pueden administrar múltiples dosis, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco dosis. Dichas múltiples dosis se pueden administrar durante un periodo de un mes o dos semanas o una semana. En otra realización, se puede administrar diariamente una sola dosis o múltiples dosis tales como dos, tres, cuatro o cinco dosis.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: La función de los neutrófilos está alterada en pacientes con cirrosis y empeora al aumentar la gravedad de la hepatopatía

Método de medición de la fagocitosis de los neutrófilos y estallido respiratorio

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

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

Quimiotaxis de neutrófilos: se midió la quimiotaxis de los neutrófilos usando un método de cámara de Boyden modificado usando interleucina-8 como quimioatrayente para estimular la quimioquinesis.

Pacientes y métodos

Los presentes inventores estudiaron 30 pacientes con cirrosis (cirrosis alcohólica; edad media 53,2 (ETM = 4,6) y 20 voluntarios sanos. Los pacientes con cirrosis se clasificaron como aquellos con hepatitis alcohólica superpuesta (AH+) y aquellos con hígados descompensados y compensados. Se usó el PhagoTest para determinar la capacidad fagocítica y se usó EL PhagoBurst para determinar si las células eran capaces de generar estallido respiratorio al exponerse a *E coli*.

Resultados

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

Ejemplo 2: El amoniaco reduce la capacidad fagocítica en los neutrófilos

Métodos de medición de la fagocitosis de los neutrófilos y estallido respiratorio como en el Ejemplo 1.

Pacientes y métodos

Se recogió sangre de voluntarios sanos ($n = 15$) y se incubó durante 1 hora con concentraciones crecientes de amoniaco. Se midió la capacidad de los neutrófilos para fagocitar las bacterias usando los ensayos PhagoTest y de quimiotaxis de neutrófilos. En el ensayo de quimiotaxis de neutrófilos, se usaron 10 ng/ml de IL-8.

5 Resultados

Con la incubación de concentraciones crecientes de amoniaco, se produjo una reducción significativa de la fagocitosis de los neutrófilos (Figura 2) y también de la quimiotaxis de los neutrófilos (Figura 3).

10 **Ejemplo 3: El efecto del amoniaco sobre la fagocitosis de los neutrófilos se puede invertir mediante intervenciones**

Métodos de medición de la fagocitosis de los neutrófilos y estallido respiratorio como en el Ejemplo 1.

15 Pacientes y métodos

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

20 Resultados

Se observó que la reducción de la fagocitosis de los neutrófilos inducida por el amoniaco se podía invertir parcialmente con ornitina y glutamina (Figura 4). Sin embargo, la fagocitosis de los neutrófilos empeoró mediante la incubación conjunta del amoniaco con aspartato, pero permaneció sin cambios con L-aspartato de L-ornitina.

25 **Ejemplo 4: Una hemorragia gastrointestinal simulada reduce la quimiotaxis de los neutrófilos que se puede invertir parcialmente mediante la administración de isoleucina**

30 Métodos

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

40

Resultados

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

50

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

55 Métodos

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

60

Resultados

La Figura 6 muestra la velocidad media de aparición de isoleucina en sangre entera (Wb Ra) y la oxidación de la isoleucina durante la última hora de la infusión de solución salina (barras negras) y de aminoácidos (barras grises) (valores en media + ETM; # representa $p < 0,05$). Una hemorragia del GI superior en pacientes con cirrosis produjo

65

una reducción de la isoleucina y redujo notablemente la síntesis de proteínas en sangre entera. La fracción del flujo de isoleucina usada para la oxidación no cambiaba después de la hemorragia simulada a pesar de la marcada reducción de la concentración de isoleucina, lo que apuntaba a la aparición de antagonismo de BCAA.

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

Métodos

10 Se estudiaron dieciséis pacientes metabólicamente estables con cirrosis hepática demostrada por biopsia. Se aleatorizaron los pacientes bien a suplementación con isoleucina (solución de 40 mg/l; 50 ml/hora) o placebo durante una hemorragia simulada durante un período de 4 horas. La síntesis de proteínas (medida usando infusión continua a una velocidad constante de L-[anillo-²H₂]fenilalanina), L-[anillo-²H₄]tirosina y L-[anillo-²H₂]tirosina) y amoniaco.

15 **Resultados**

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

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

Métodos

30 5 pacientes con cirrosis avanzada que estaban esperando un trasplante de hígado (edad: 59; 3 varones, enfermedad de Child de Clase C, ascitis grave, creatinina: 102 $\mu\text{mol/l}$) estaban sometidos a tratamiento con 40 g/día de L-aspartato de L-ornitina.

Resultados

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

Tabla 2

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

40

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

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

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

Ejemplo 8: La administración con LOLA reduce la concentración de amoniaco pero permite que el amoniaco se regenere

Pacientes y métodos

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

Resultados

Los resultados mostraron que la administración de LOLA produjo una reducción significativa de la concentración de amoniaco con un aumento concomitante de la concentración de glutamina (Figura 8). Esta reducción de amoniaco tuvo efectos beneficiosos sobre la gravedad de HE. Sin embargo, cuando al interrumpir la administración de LOLA, se produjo un aumento de rebote de los niveles de amoniaco en circulación, generando la recurrencia de HE en 3 de los 6 pacientes que habían mejorado.

Ejemplo 9: La retirada activa de la glutamina previene el aumento secundario de la concentración de amoniaco

Pacientes y métodos

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

Resultados

Los resultados mostraron que LOLA produjo una reducción de la concentración de amoniaco, pero la adición de diálisis evitó el aumento concomitante de la concentración de glutamina (Figura 9). Por lo tanto, se cree que hubo una reducción sostenida de la concentración de amoniaco.

Ejemplo 10: El fenilacetato se une a la glutamina para formar un compuesto excretable y previene el aumento secundario de amoniaco

Pacientes y métodos

Se trataron 6 pacientes con insuficiencia hepática aguda (5 sin hepatitis A ni B) y encefalopatía grave (Grado 3-4) se trataron con LOLA y fenilacetato (40 g/día durante 8 horas).

Resultados

No se produjo un aumento significativo en la concentración de glutamina, y los niveles de amoniaco se redujeron con el tratamiento combinado (Figura 10). No se observó el aumento de rebote del amoniaco.

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

Pacientes

1. Grupos de 3 pacientes por grupo. Total 12.
2. Criterios de inclusión

- pacientes adultos de 18-80 años de edad,
- cirrosis hepática documentada mediante histología o criterios clínicos;
- HE de tipo C,
- concentración de amoniaco de > 80 umol/l, consentimiento/aprobación informada.

3. Criterios de exclusión

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

Evaluaciones del estado mental

Graduación de la encefalopatía hepática (criterios de West Haven)

Grado 0 (HE mínima)	Estado mental normal (una o más anomalías cuantificables en la prueba psicométrica)
Grado 1	Falta trivial de atención, euforia o ansiedad Menor capacidad de atención Capacidad para sumar alterada
Grado 2	Letargía o apatía Mínima desorientación de tiempo o lugar Cambio sutil de personalidad Comportamiento inapropiado Capacidad para restar alterada
Grado 3	Somnolencia a semi-estupor, pero sensible a estímulos verbales Confusión Gran desorientación
Grado 4	Coma (insensible a estímulos verbales o nocivos)

Métodos

5 En un estudio de marcaje abierto, se incluyeron 8 pacientes con cirrosis e hiperamoniaquemia. Se emparejaron para la gravedad de la hepatopatía (véase la Tabla 3). Se trataron con una de las siguientes pautas de dosificación durante un período de 3 días, y se realizaron observaciones durante 5 días. Los grupos de estudio eran:

- 10 (i) Placebo: Dextrosa al 5 % durante 4 horas;
 (ii) Solo ornitina: 20 g en 500 ml, dextrosa al 5 % entre las 8:00 y las 12:00;
 (iii) Fenilbutirato: 10 g dos veces al día, por vía oral (8:00 y 16:00); y
 (iv) Ornitina + Fenilbutirato: 20 g en 500 ml, dextrosa al 5 % entre las 8:00 y las 12:00 + 10 g dos veces al día, por vía oral (8:00 y 16:00).

15 Se mantuvieron los pacientes en ayunas durante una noche entre las 00:00 medianoche y las 8:00 a.m. Se les alimentó por vía intragástrica con una dieta de 25 KCal/kg que incluía 1 g/kg de dieta de proteína comenzando a las 8:00 y finalizando a medianoche. Se muestreó sangre a las 7:30 a.m. y, a continuación, a las 18:00 h para la medición del amoniaco y de la glutamina. Los pacientes se monitorizaron exhaustivamente en busca de efectos secundarios. El fármaco fue bien tolerado en cada uno de los grupos, y no se observaron hechos adversos.

Tabla 3. Datos demográficos de los pacientes

	Placebo	Solo ornitina	Solo fenilbutirato	OP
Edad	P1: 47 P2: 57	P3: 46 P4: 40	P5: 56 P6: 48	P7: 52 P8: 52
Sexo	P1 M P2 M	P3: F P4: F	P5: F P6: M	P7: M P8: F
Etiología de la hepatopatía	P1: HCV P2: HBV	P3: HBV P4: NASH	P5: NASH P6: HBV	P7: HBV P8: HBV
Gravedad de la hepatopatía (Valor de Pugh)	P1: 9 P2: 12	P3: 13 P4: 13	P5: 14 P6: 13	P7: 14 P8: 12
Factor desencadenante	P1: Infección P2: Infección	P3: SBP P4: Infección	P5: SBP P6: Infección	P7: SBP P8: Infección
Gravedad de HE (criterios de West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 3 P4: 3	P5: 3 P6: 3	P7: 3 P8: 3
Gravedad de HE (valor de coma Glasgow)	P1: 9 P2: 8	P3: 8 P4: 8	P5: 9 P6: 10	P7: 9 P8: 9
Otro fallo orgánico	P1: ninguno P2: hipotensión	P3: prerrenal, hipotensión P4: hipotensión	P5: ninguno P6: prerrenal	P7: ninguno P8: ninguno
Fallecido/vivo	P1: A P2: A	P3: D P4: A	P5: A P6: A	P7: A P8: A

	Placebo	Solo ornitina	Solo fenilbutirato	OP
Complicaciones	P1: infección, SBP P2: infección, hemorragia de varices	P3: HRS P4: infección rec.	P5: sepsis, UCI P6: SBP recurrente	P7: ninguna P8: hemorragia, día 14
SBP: peritonitis bacteriana espontánea, esteatohepatitis no alcohólica, UCI: necesita soporte de cuidados intensivos, HRS: síndrome hepatorenal.				

Resultados

La Figura 11 muestra que los niveles medios de amoniaco permanecieron en gran medida sin cambios durante el período de tratamiento en el grupo de placebo. En el grupo de L-ornitina y en el grupo de fenilbutirato, la concentración de amoniaco aumentó desde los niveles iniciales. En el grupo tratado con L-ornitina y fenilbutirato, se produjo una reducción sustancial del amoniaco. El aumento postprandial del amoniaco se redujo en los animales tratados con OP, además de la reducción de las concentraciones de amoniaco. Ambos pacientes del grupo de OP habían mejorado su valor de encefalopatía en 2 grados el día 3, lo que no se observó en ninguno de los otros 6 pacientes.

La Figura 12 muestra que los niveles medios de glutamina permanecieron en gran medida sin cambios durante el período de tratamiento en el grupo de OP a pesar de una reducción del amoniaco. Se produjo una reducción de la glutamina en el grupo del fenilbutirato, que bien puede ser perjudicial. En los grupos de L-ornitina y placebo hubo un aumento de las concentraciones de glutamina que se acentuó notablemente en el estado postprandial.

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

Ejemplo 12: El efecto de la ornitina, el fenilbutirato y la isoleucina en pacientes humanos con encefalopatía hepática

Pacientes

1. Grupos: 2 pacientes por grupo. Total 6
2. Criterios de inclusión

- Pacientes adultos de 18-80 años,
- cirrosis hepática documentada mediante histología o criterios clínicos,
- Child B o C,
- hemorragia gastrointestinal reciente de varices (< 6 horas después de la presentación),
- consentimiento/aprobación informada.

3. Criterios de exclusión

- otro trastorno neurológico concomitante, - uso de otro fármaco que reduce el amoniaco específico, - insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica y sedación, - hemorragia gastrointestinal no controlada, - hipotensión que requiere inotropos, - insuficiencia renal manifiesta (creatinina >2 mg/dl), - hemodiálisis, - soporte hepático extracorpóreo, - hipersensibilidad conocida a cualquiera de los fármacos del estudio, - embarazo/lactancia.

Métodos

En un estudio de marcaje abierto, se incluyeron 6 pacientes con cirrosis y que fueron admitidos para el tratamiento de la hemorragia de varices. Se emparejaron por la gravedad de la hepatopatía (véase la Tabla 4). Se trataron con una de las siguientes pautas posológicas durante un período de 3 días, y se realizaron observaciones durante 5 días. Los grupos del estudio eran:

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

Se mantuvieron los pacientes en ayunas durante una noche entre las 00:00 medianoche y las 08:00 a.m. Se alimentaron por vía intragástrica con una dieta de 25 KCal/kg que incluía 1 g/kg de dieta de proteínas comenzando a

- las 8:00 y finalizando a medianoche. Se muestreó sangre a las 7:30 a.m. y, a continuación, a las 18:00 h para la medición del amoniaco y de la glutamina. Los pacientes se monitorizaron exhaustivamente en busca de efectos secundarios. El fármaco fue bien tolerado en cada uno de los grupos, y no se observaron hechos adversos. Dado que los pacientes recibieron sedación para la endoscopia inicial, no fue posible interpretar la evaluación del estado mental. Un paciente de cada uno de los grupos de Placebo e Isoleucina falleció de fallo multiorgánico en el hospital. El resto de los pacientes sobrevivió.

Tabla 4

	Placebo	Solo isoleucina	OIP
Edad	P: 43 P2: 62	P3: 57 P4: 42	P5: 43 P6: 45
Sexo	P1: M P2: M	P3: F P4: M	P5: M P6: M
Etiología de la hepatopatía	P1: ALD P2: HCV	P3: HBV P4: ALD	P5: HBV P6: NASH
Gravedad de la hepatopatía (Valor de Pugh)	P1: 13 P2: 14	P3: 13 P4: 11	P5: 14 P6: 10
Gravedad de HE (Criterios de West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 2 P4: 1	P5: 2 P6: 2
Pérdida de sangre estimada (u)	P1: 9 P2: 10	P3: 7 P4: 8	P5: 7 P6: 10
Fallecido/vivo	P1: D P2: A	P3: A P4: D	P5: A P6: A
Complicaciones	P1: infección, hemorragia recurrente P2: encefalopatía grave	P3: HRS P4: infección rec.	P5: infección torácica P6: ninguna
SBP: peritonitis bacteriana espontánea, esteatohepatitis no alcohólica, UCI: necesita soporte de cuidados intensivos, HRS: síndrome hepatorenal.			

10 Resultados

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

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

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

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

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

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

Métodos

Inducción de cirrosis mediante la ligadura del conducto biliar (BDL)

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

Tras cinco semanas después de la BDL (o procedimiento simulado) se cambió a los animales de pienso para roedores a una dieta líquida completa (Liquidiet, Bio-Serv, Frenchtown NJ, EE.UU.) a la que se añadió una mezcla

de aminoácidos que imitaba la composición de la hemoglobina (2,8 g/kg/día, Nutricia Cuijk, Países Bajos, N° de Producto 24143). A las seis semanas, con anestesia, se insertó un catéter en la arteria carótida derecha y se usó para recoger varias muestras de sangre. Siguiendo este procedimiento, se recogió una muestra inicial de sangre antes de la administración de las formulaciones del estudio mediante inyección IP. Los grupos del estudio eran:

5 control de BDL + Solución salina (n = 5), BDL + ornitina (0,22 g/kg, n = 6) en solución salina IP, BDL + fenilbutirato (0,3 g/kg, n = 7) en solución salina IP, BDL + OP (0,22 g/kg/0,3 g/kg, n = 7) en solución salina IP.

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

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

15 Resultados

En el modelo de rata con el conducto biliar cirrótico ligado, existe un aumento sustancial en el nivel de amoniaco en plasma arterial ($205 \pm 11 \mu\text{mol/l}$, media \pm ETM) en comparación con los controles sanos ($25,6 \pm 2 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$ no se muestran los datos). En este modelo, se encontró que no hubo cambios en los niveles de amoniaco arterial durante tres horas en el grupo de placebo tratado con solución salina.

La Figura 19 muestra el cambio en los niveles de amoniaco en plasma arterial en ratas cirróticas con BDL después de inyecciones IP de solución salina (control de BDL, n = 5), ornitina (Orn, 0,22 g/kg, n = 6), fenilbutirato (PB, 0,3 g/kg, n = 7) y ornitina y fenilbutirato (OP, 0,22 g/kg + 0,3 g/kg, n = 7). * significa $< 0,05$ para OP frente a Orn a las 3 horas (ANOVA de 2 vías).

Esta figura muestra que en los animales tratados con ornitina se detectó un ligero descenso de la concentración de amoniaco, aunque no se encontró que esto fuera diferente del placebo. En el grupo tratado con fenilbutirato, se encontró un aumento significativo del amoniaco en plasma después de 1 hora ($p < 0,01$ frente a todos los demás grupos), aunque se encontró que esta diferencia era menor en el punto temporal de las tres horas. Este hallazgo encaja con la hipótesis de que el fenilbutirato (fenilacetato) solo es eficaz en los sujetos con concentraciones de glutamina aumentadas. En los animales sin suplementación de ornitina que pueda metabolizarse para formar glutamina, no se desean los efectos de P solo, y son potencialmente dañinos. Se observó un nivel de amoniaco significativamente más bajo en el grupo tratado con ornitina más fenilbutirato (OP). En estos animales, se midió una reducción sostenida del amoniaco a lo largo de tres horas del estudio, cuyos niveles resultaron ser significativamente más bajos que los del grupo de solo ornitina al final del estudio ($p < 0,05$).

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

En un subconjunto de muestras, se examinó la captación de la ornitina en el torrente sanguíneo tras la inyección IP de O u OP. La Figura 20 muestra la concentración de ornitina arterial en los grupos suplementados. Se puede ver claramente que, en ambos grupos, la concentración de ornitina en plasma aumenta notablemente a 1 hora de la inyección IP, que posteriormente se reduce a las 3 horas a medida que esta ornitina se va metabolizando en el organismo. No se encontró ninguna diferencia significativa en la concentración de ornitina en plasma entre estos grupos en ningún punto temporal.

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

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

55 Métodos

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

Resultados

Se encontró que los niveles de amoniaco arterial estaban significativamente reducidos en ratas con insuficiencia hepática aguda tratadas con OIP en comparación con los controles de placebo (Fig. 21). Este estudio se diseñó para ensayar si la isoleucina junto con la ornitina y el fenilbutirato (fenilacetato) eran capaces de reducir de forma eficaz el amoniaco en plasma. Se ha demostrado previamente que la isoleucina sola no afecta a los niveles de amoniaco en los estudios humanos, aunque su eficacia junto con O y P no se ha ensayado previamente.

La Figura 21 muestra los niveles de amoniaco en plasma arterial en un modelo de insuficiencia hepática aguda hiperamoniacuémica para grupos tratados con placebo de solución salina (ALF) y OIP (ALF + OIP). Se encontró un nivel de significación de $p < 0,01$ entre estos dos grupos (Test T).

Este hallazgo apoya la hipótesis de que la isoleucina en combinación con la ornitina y el fenilbutirato es eficaz en la reducción de los niveles de amoniaco. A esto, se le suman los efectos beneficiosos de la isoleucina descritos anteriormente para la síntesis de proteínas.

Ejemplo 15: El efecto de la ornitina y del fenilbutirato en el modelo de cerdo desvascularizado

Métodos

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

1. Placebo: dextrosa al 5 % durante 3 horas, placebo y agua oral.
2. Solo ornitina: 0,3 g/kg, dextrosa al 5 % durante 3 horas de goteo intravascular.
3. Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrosa al 5 % durante 3 horas de alimentación intragástrica.

Ornitina + Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrosa al 5 % durante 3 horas de goteo intravascular, 0,3 g/kg, dextrosa al 5 % durante 3 horas de alimentación intragástrica.

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

Resultados

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

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

En el caso del animal tratado solo con ornitina, el aumento del amoniaco temprano es inicialmente leve, pero después aumenta pasando a ser el más elevado al finalizar el experimento (Figura 22). Existe una captación neta de amoniaco por el músculo en este animal (Figura 24), liberándose una cantidad comparable de glutamina desde el músculo - en comparación con el animal tratado con placebo (Figura 25) con un aumento de la captación de glutamina en el intestino (Figura 26).

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

La combinación de ornitina y fenilbutirato tiene el mayor impacto sobre los niveles de amoniaco arterial, con una impresionante reducción de los niveles en circulación al final del experimento en comparación con todos los demás animales (Figura 22). El amoniaco es eliminado de forma activa de la sangre por el músculo en este animal (Figura 23) con una producción de amoniaco intestinal enormemente reducida (Figura 24). Es interesante señalar que la

liberación de glutamina en el músculo aumenta en comparación con los animales tratados solo con placebo y ornitina (Figura 25). A pesar de este aumento de la producción de glutamina en el músculo, la captación de glutamina en el intestino se reduce sustancialmente (Figura 26).

5 En la Figura 27, se muestra una demostración del aumento de los niveles en circulación de la ornitina en los animales tratados con ornitina.

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

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

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

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

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

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

Conclusiones

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

35 Además, los inventores han encontrado que la isoleucina no afecta al aumento de la concentración del amoniaco tras una hemorragia gastrointestinal simulada. Por lo tanto, al contrario que la hipótesis que mantiene que los niveles de amoniaco disminuirán tras la administración de isoleucina debido a la estimulación de la síntesis de proteínas, los niveles de amoniaco no se ven afectados. Por lo tanto, el uso de isoleucina junto con ornitina, que se sabe que reduce los niveles de amoniaco, es particularmente ventajoso.

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

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

50 Además, los inventores han encontrado que el tratamiento de pacientes con encefalopatía hepática (HE) con L-aspartato de L-ornitina (LOLA) reduce los niveles de amoniaco y, por consiguiente, aumenta los niveles de glutamina. No obstante, la glutamina solo es un tampón del amoniaco temporal, dado que puede reciclar y regenerar el amoniaco en el riñón y el intestino delgado. Por lo tanto, el tratamiento solo con LOLA puede conducir a un aumento secundario de los niveles de amoniaco, contribuyendo además a la patología de la encefalopatía hepática.

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

eliminación de la glutamina para prevenir el aumento secundario de los niveles de amoníaco en pacientes con HE.

Por consiguiente, se puede obtener un tratamiento mejorado para la encefalopatía hepática mediante administración de ornitina junto con al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato, preferentemente en ausencia de aspartato.

5 Las exhaustivas investigaciones de los presentes inventores en modelos animales y también en seres humanos con cirrosis apoyan la opinión de que el principal órgano que elimina amoníaco en los pacientes con cirrosis es el músculo, que convierte el amoníaco en glutamina, una reacción en la que se utiliza glutamato. En la insuficiencia hepática, se induce la enzima responsable de esta reacción, la glutamina sintetasa, y el suministro de glutamato
10 aumentaría la desintoxicación del amoníaco.

La ornitina, un precursor del glutamato, desintoxica el amoníaco mediante la transformación en glutamina. Sin embargo, los estudios preliminares de los presentes inventores han demostrado que esta glutamina recircula y regenera el amoníaco. La presente invención proporciona un nuevo método para, no solo desintoxicar el amoníaco
15 en glutamina, sino también para eliminar el exceso de glutamina que se genera. Por lo tanto, OP reduce la concentración de amoníaco en pacientes con cirrosis e hiperamoníaquemia de forma significativamente más marcada que cualquiera de ellos en solitario. El efecto es claramente sinérgico en lugar de aditivo. Además, el aumento postprandial del amoníaco es suprimido por la administración de OP. Esto puede permitir la alimentación de pacientes con cirrosis descompensada con dietas ricas en proteínas sin riesgo de que sufran hiperamoníaquemia. La reducción del amoníaco resultó estar asociada con una mejoría del estado mental.
20

Esto consigue la reducción de la concentración del amoníaco, evitando un aumento de la glutamina. Esto coincide con la hipótesis de que la ornitina está impulsando la producción de glutamina en el músculo (atrapando de este modo 1 molécula de amoníaco), pero esta glutamina se excreta (posiblemente, en forma de aducto de fenilacetato),
25 evitando un aumento de glutamina sistémica, previniendo de este modo una hiperamoníaquemia de rebote.

El conocimiento instaurado de que fenilacetato reduce el amoníaco en el lactante hiperamoníaquémico que presenta trastornos del ciclo de la urea es que el amoníaco queda atrapado en la glutamina y que la glutamina es transportada a los riñones para su excreción en forma del aducto fenilacetatoglutamina. Estos lactantes presentan
30 altos niveles de amoníaco y, lo que es más importante, de glutamina. Por el contrario, el paciente cirrótico presenta nivel elevado de amoníaco y nivel de normal a bajo de glutamina. El modelo en cerdos descrito anteriormente no tiene aumento de glutamina, y los niveles de amoníaco aumentan de manera espectacular una vez aislado el hígado.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ornitina para su uso en la prevención o en el tratamiento de la hiperamoniaquemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda, siendo dicha ornitina usada en combinación con al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato.
- 10 2. Al menos uno entre fenilacetato y fenilbutirato para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperamoniaquemia en un sujeto que tiene hepatopatía crónica o insuficiencia hepática aguda, siendo dicho fenilacetato y/o fenilbutirato usados en combinación con ornitina.
- 15 3. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el uso previene o trata la inflamación cerebral.
4. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto tiene peritonitis bacteriana espontánea.
- 20 5. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto tiene hemorragia gastrointestinal.
6. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto tiene una infección.
7. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto tiene varices esofágicas.
- 25 8. La sustancia para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto tiene hipertensión portal.

Figura 1

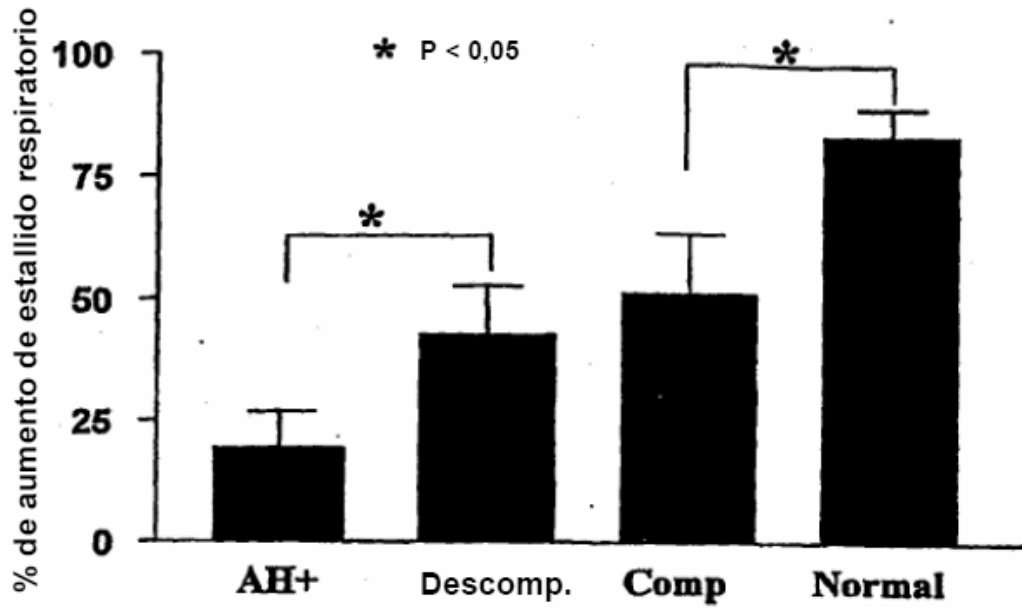


Figura 2

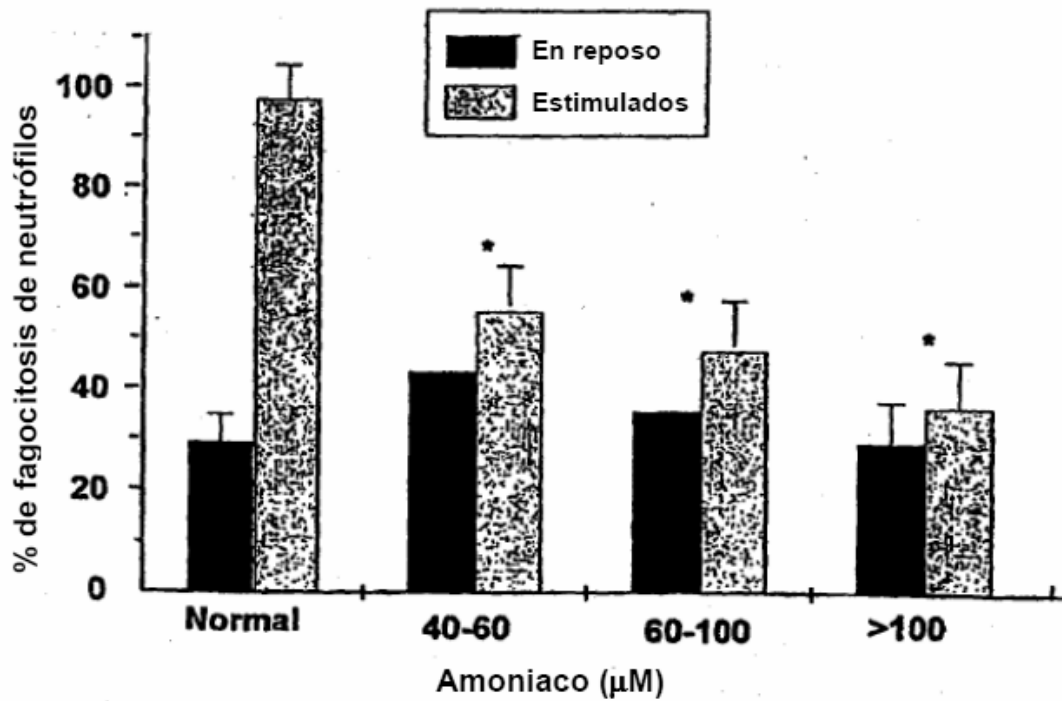


Figura 3

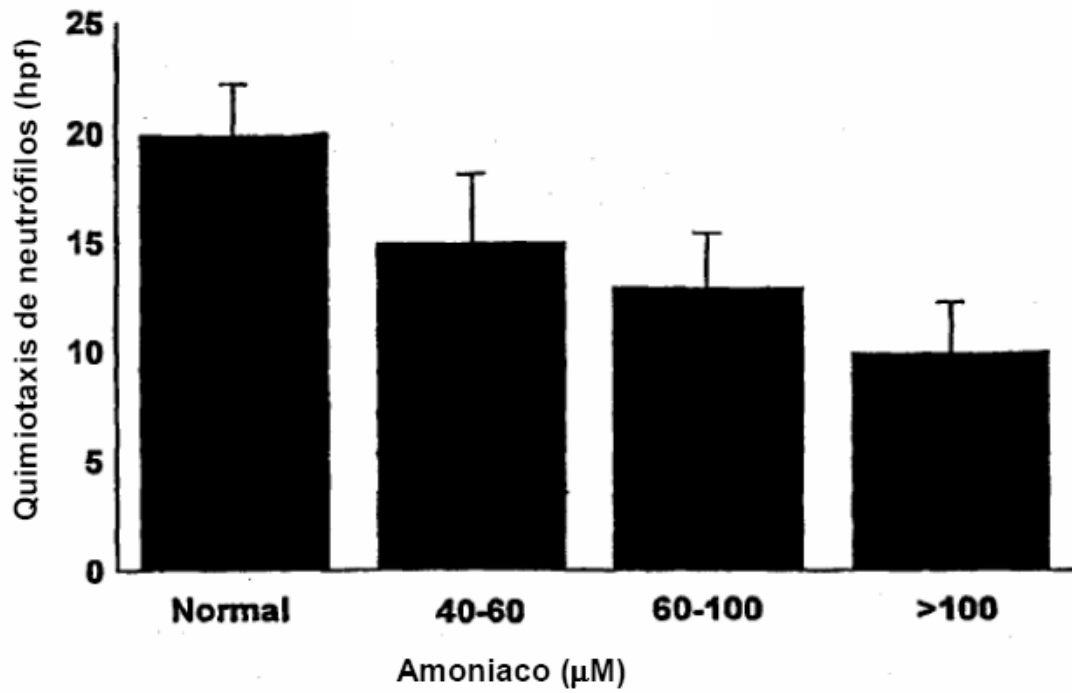


Figura 4

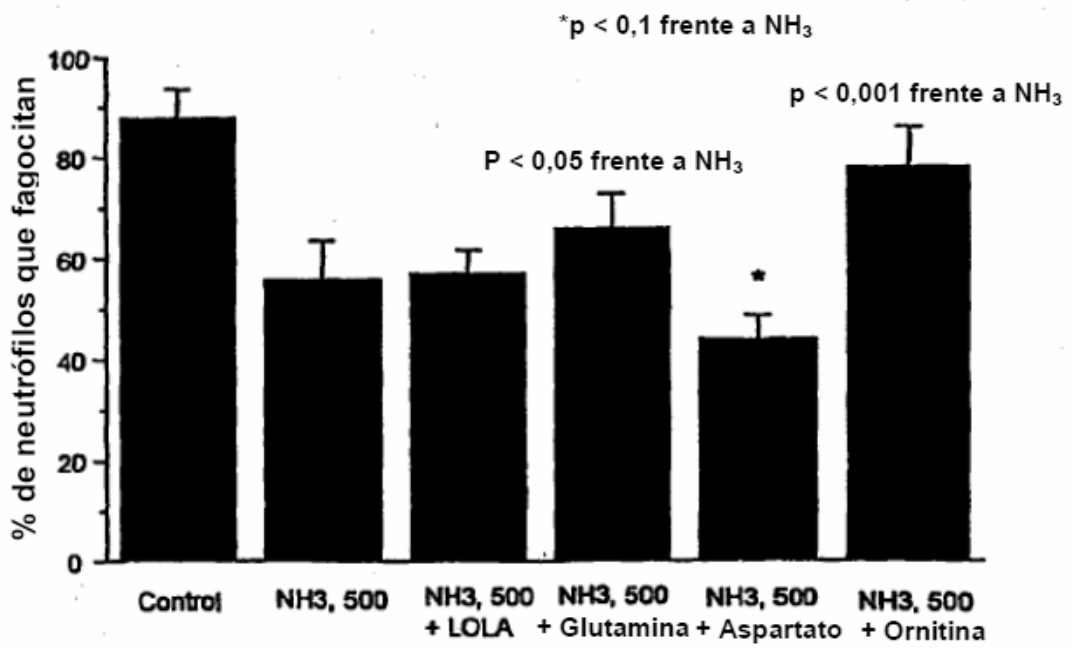


Figura 5

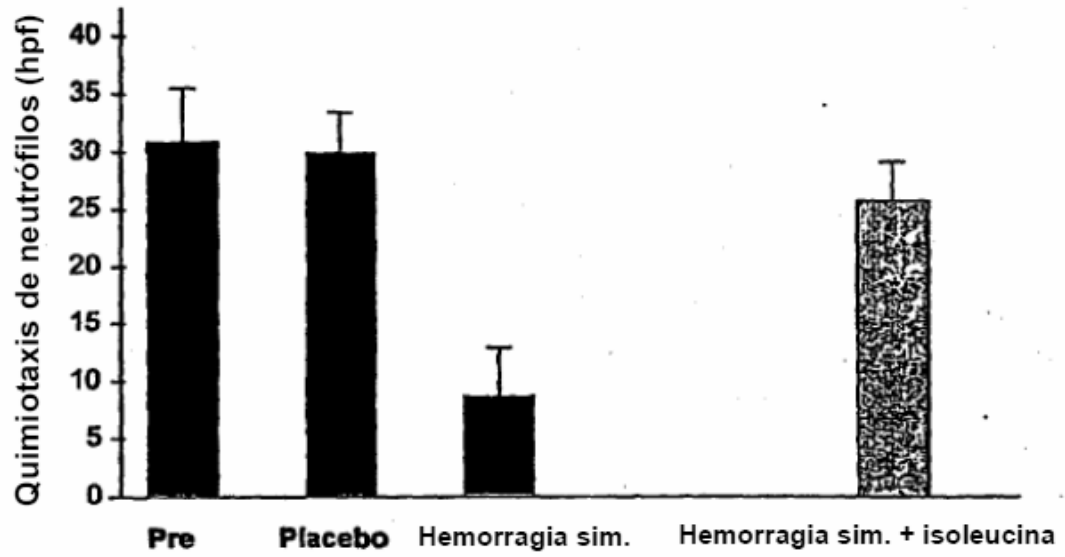


Figura 6

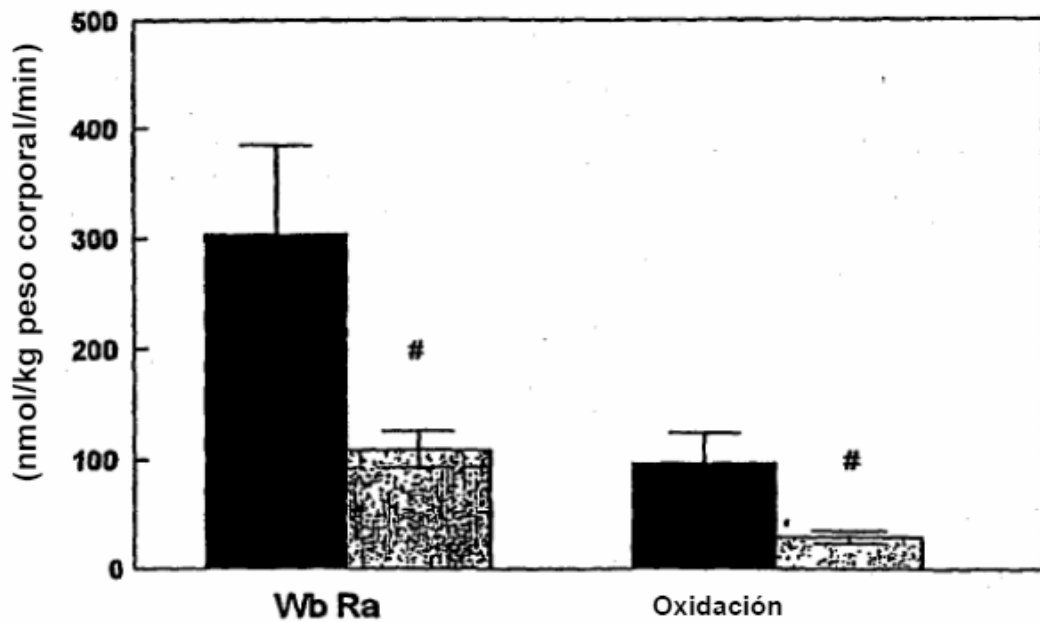


Figura 7

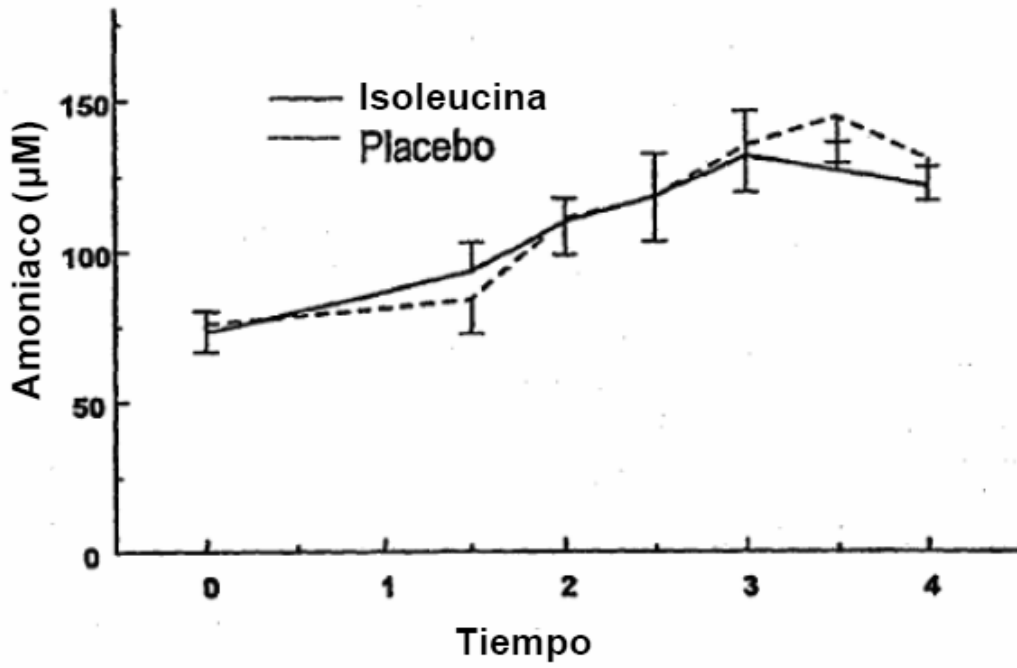


Figura 8

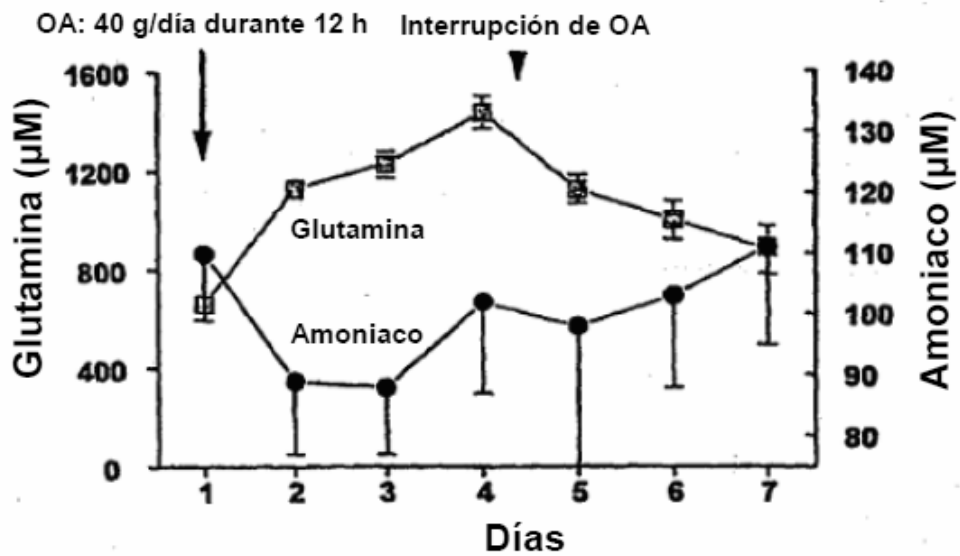


Figura 9

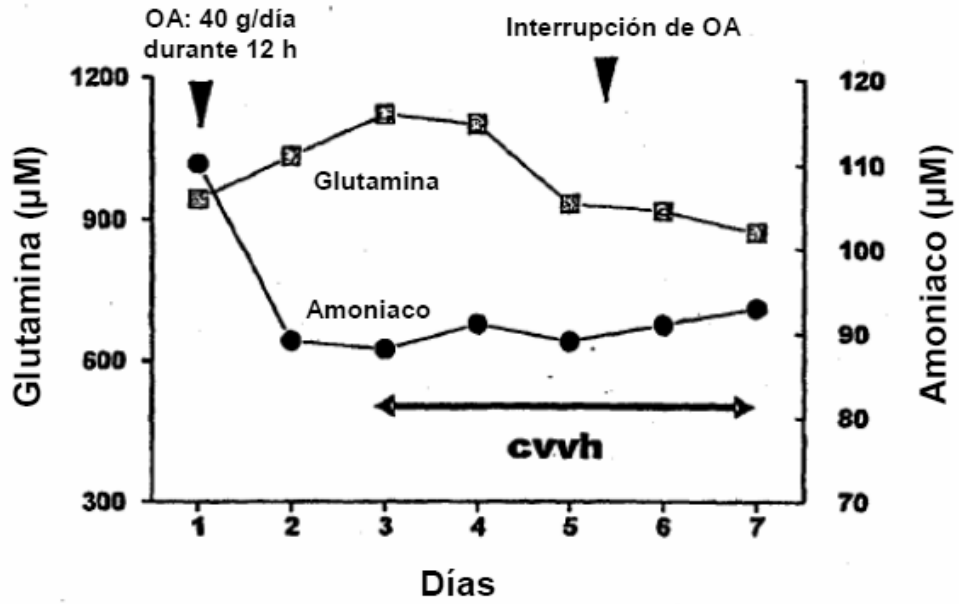


Figura 10

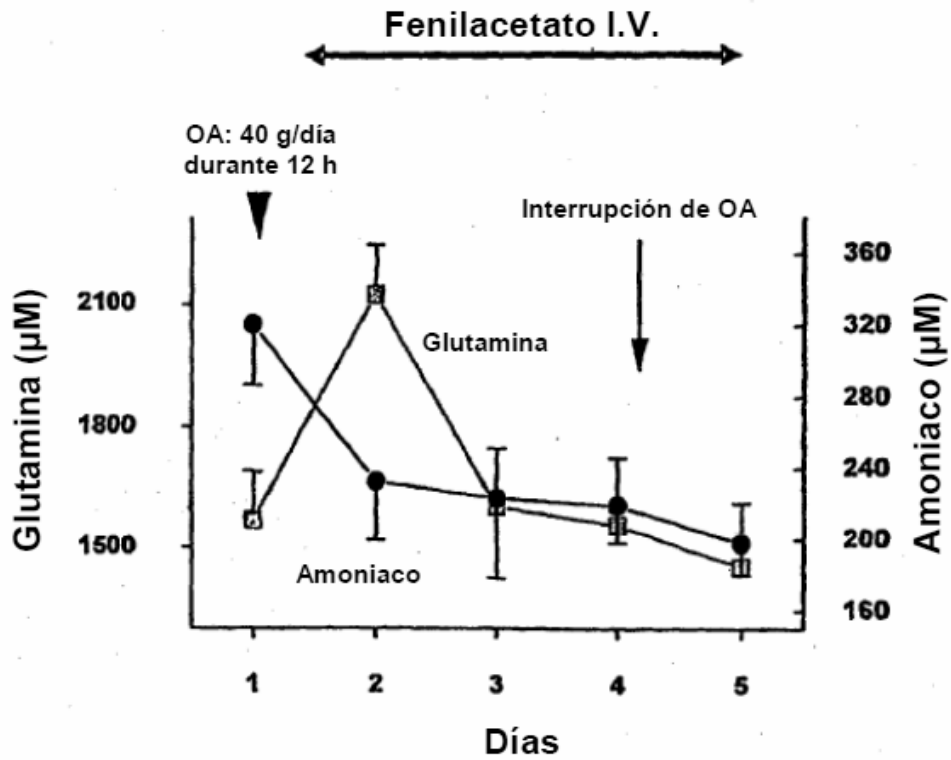


Figura 11

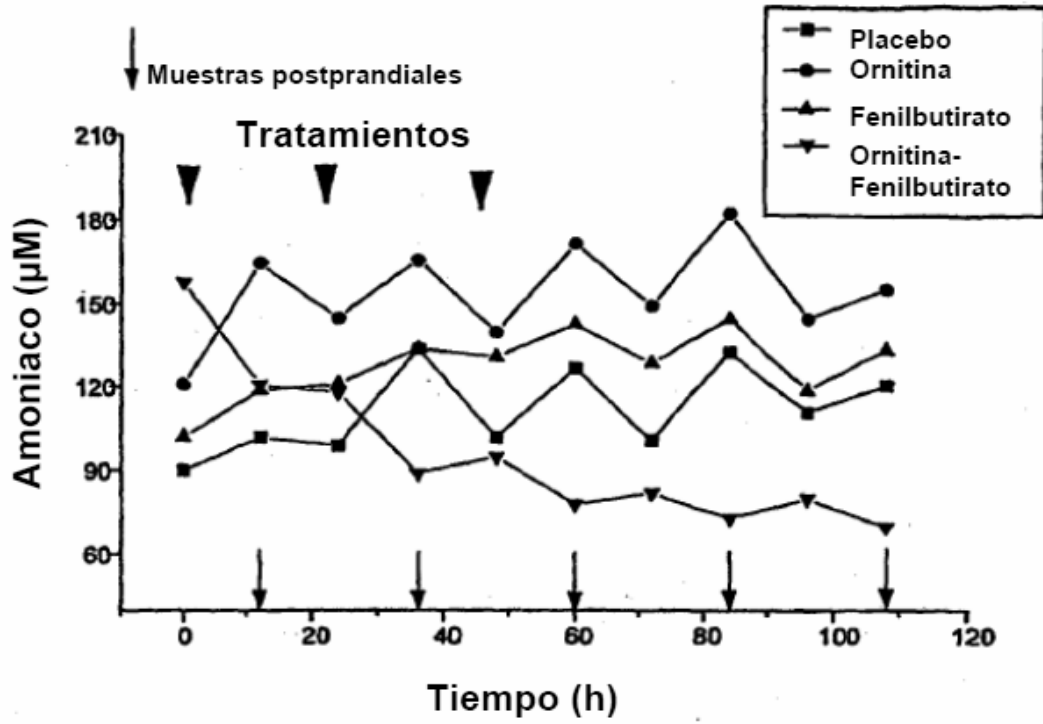


Figura 12

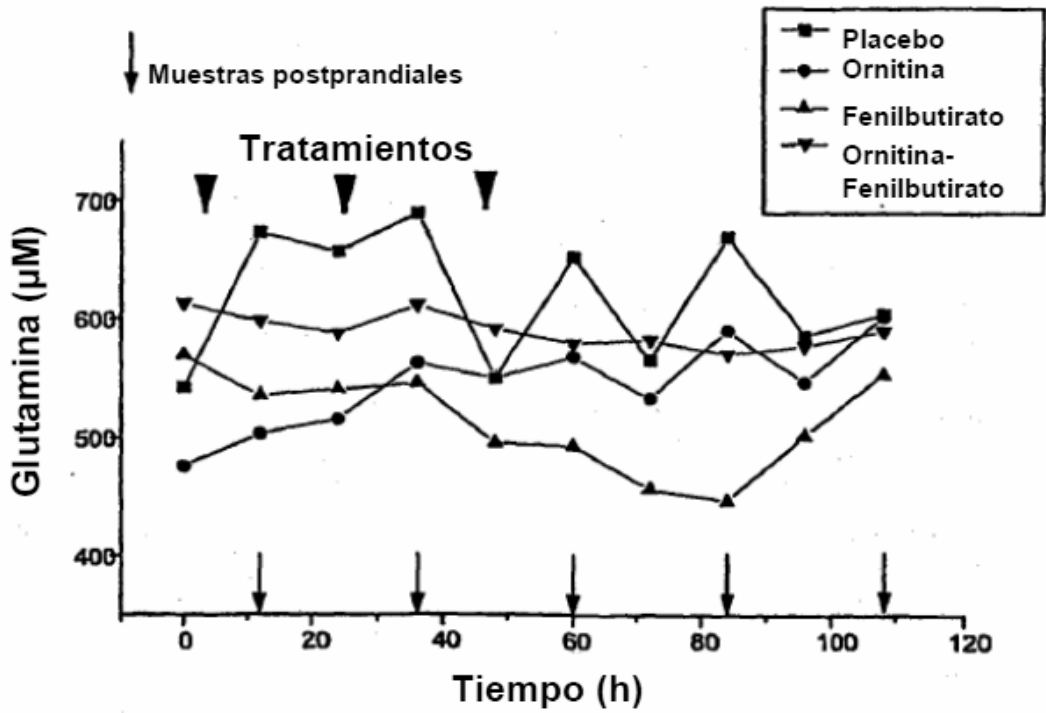


Figura 13

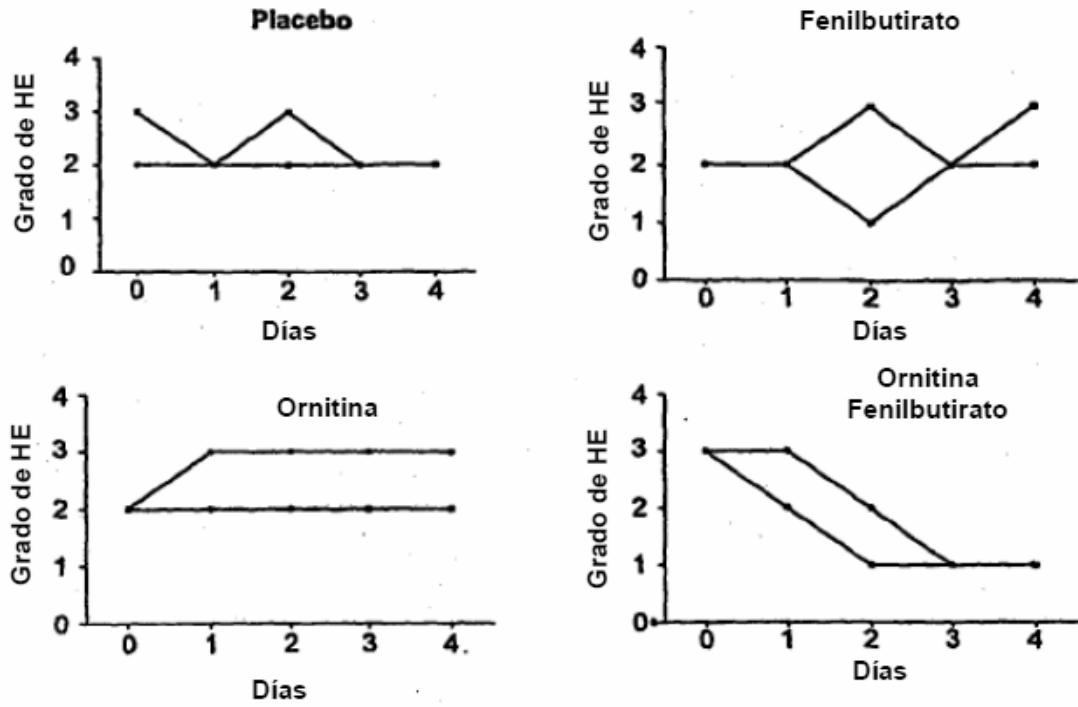


Figura 14

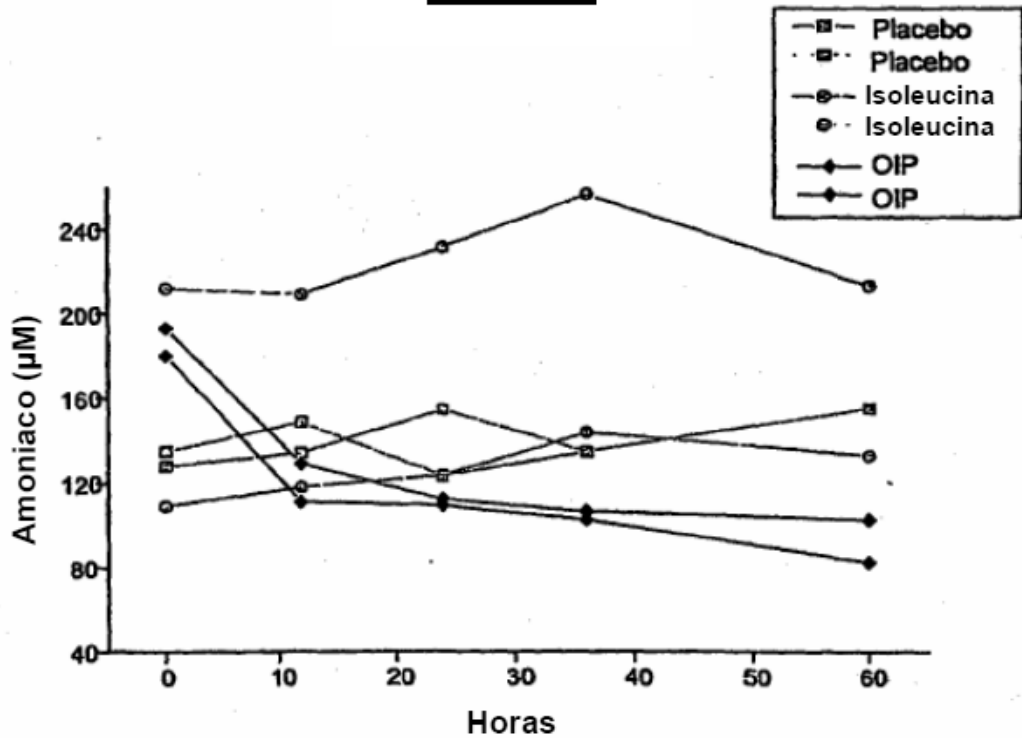


Figura 15

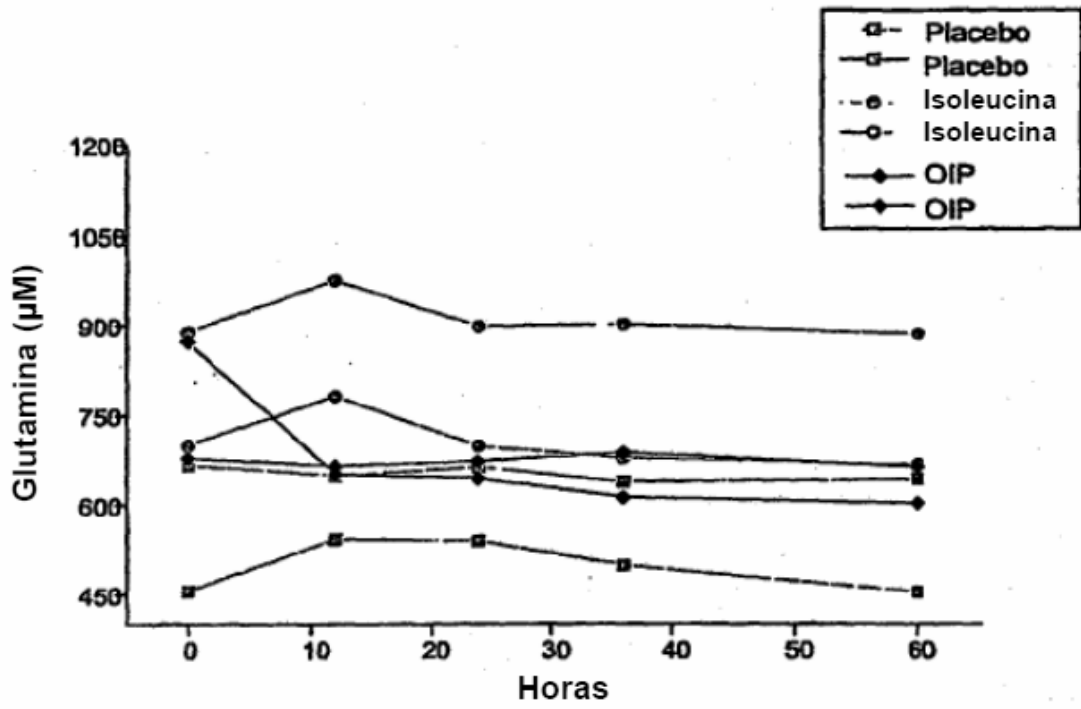


Figura 16

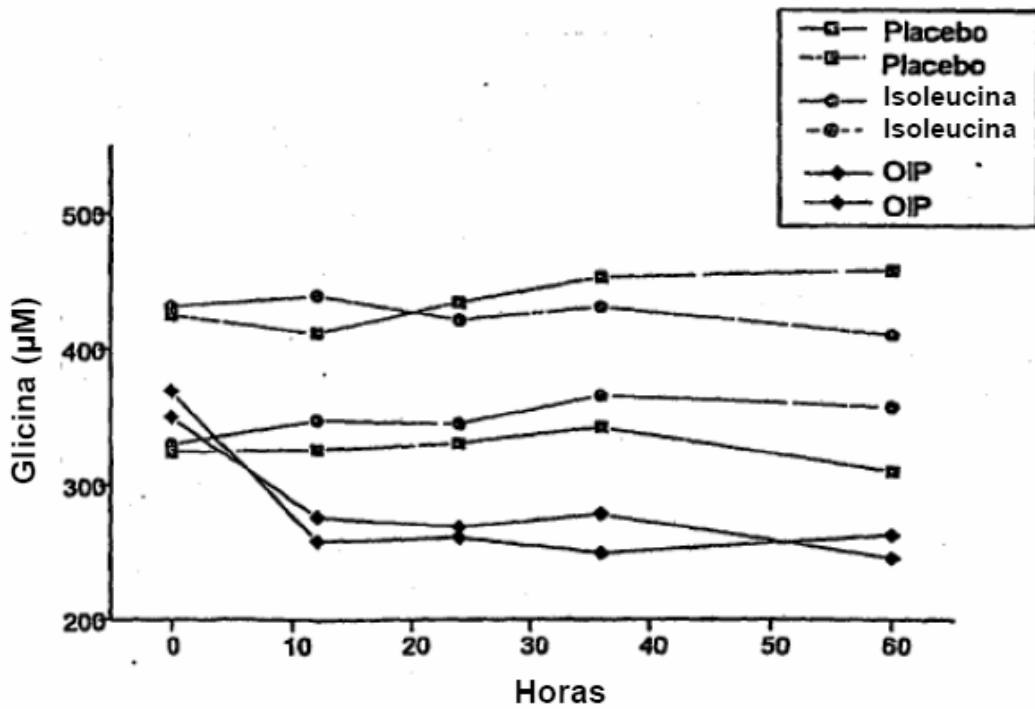


Figura 17

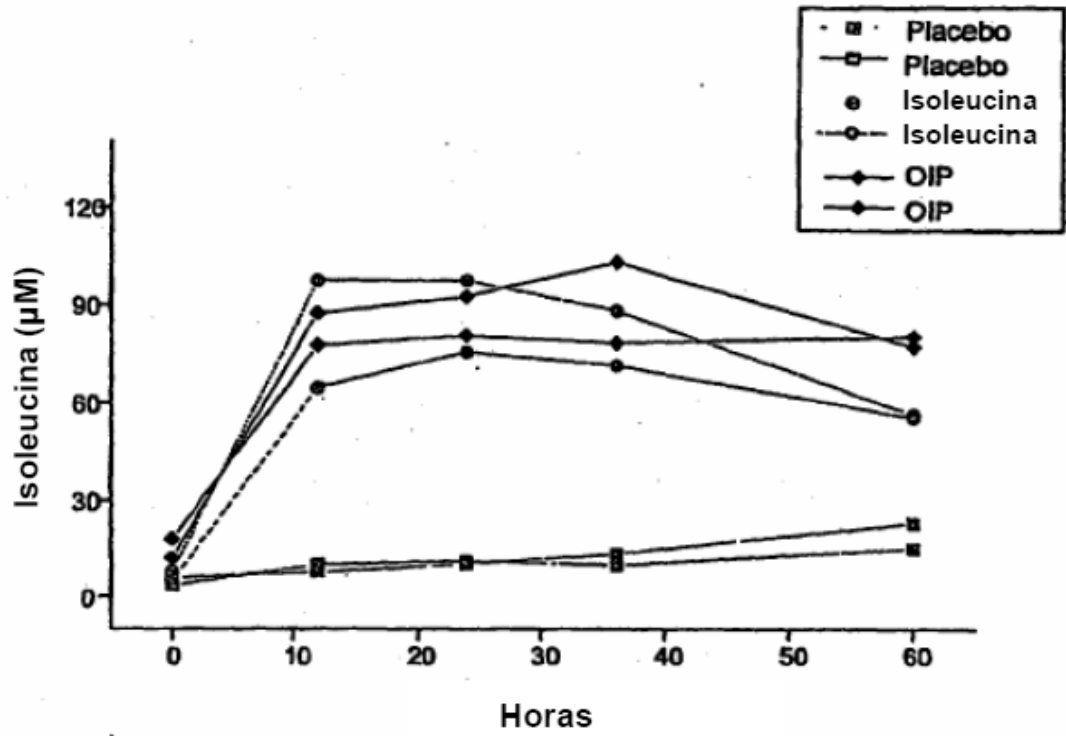


Figura 18

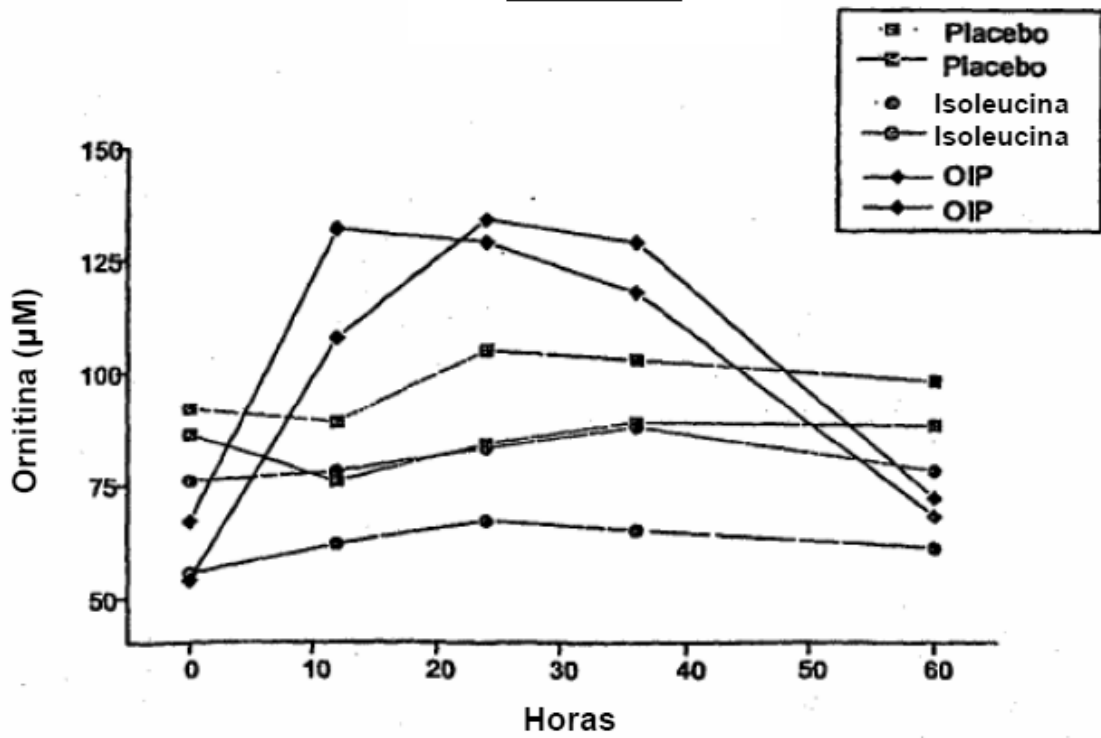


Figura 19

Amoniaco arterial en ratas con BDL

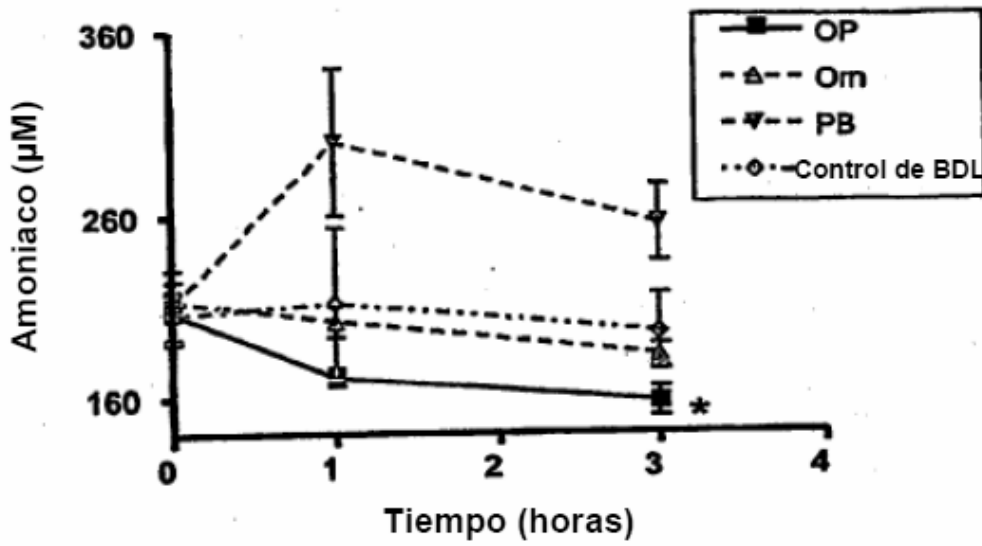


Figura 20

Ornitina en plasma (μM)

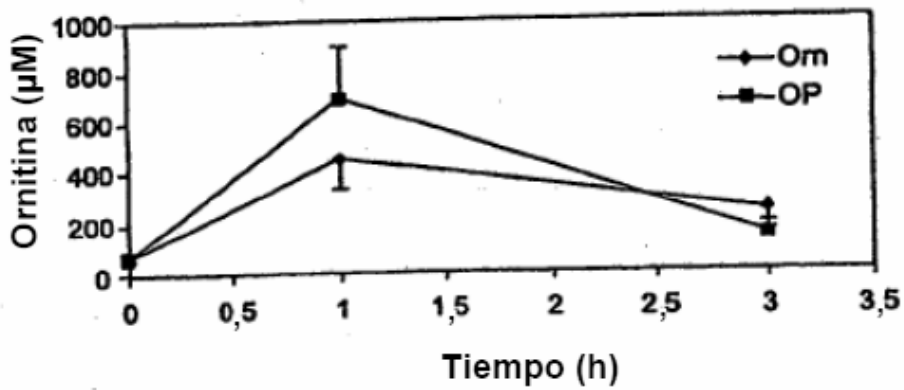


Figura 21

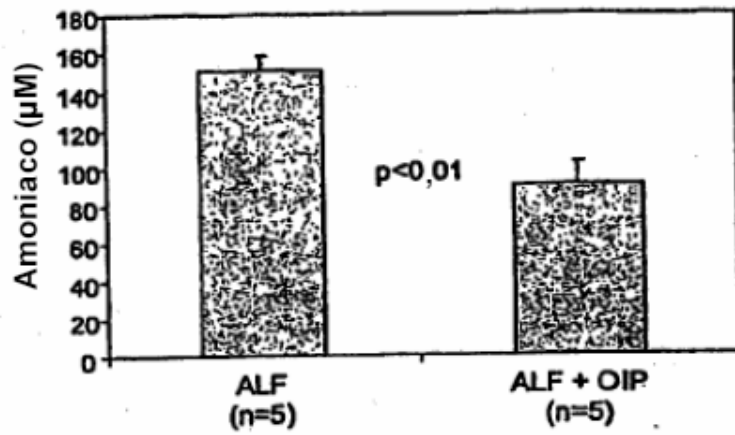


Figura 22

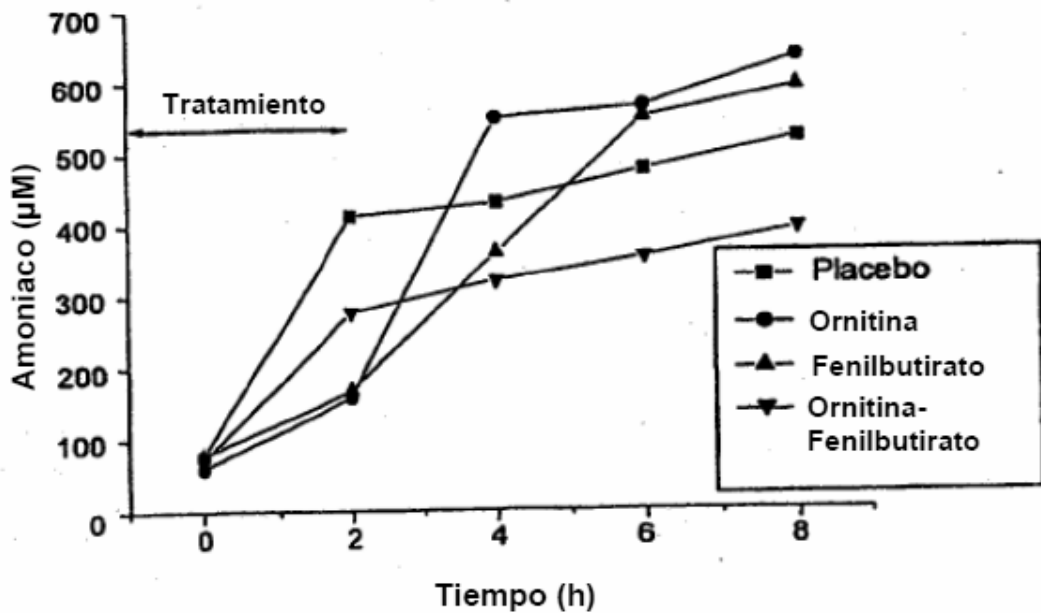


Figura 23

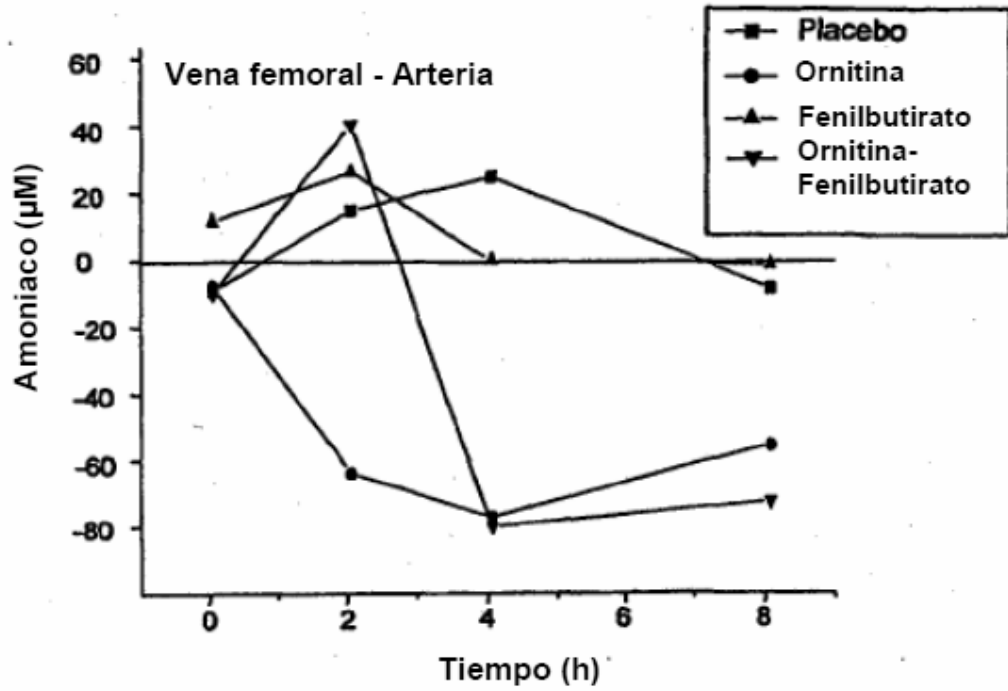


Figura 24

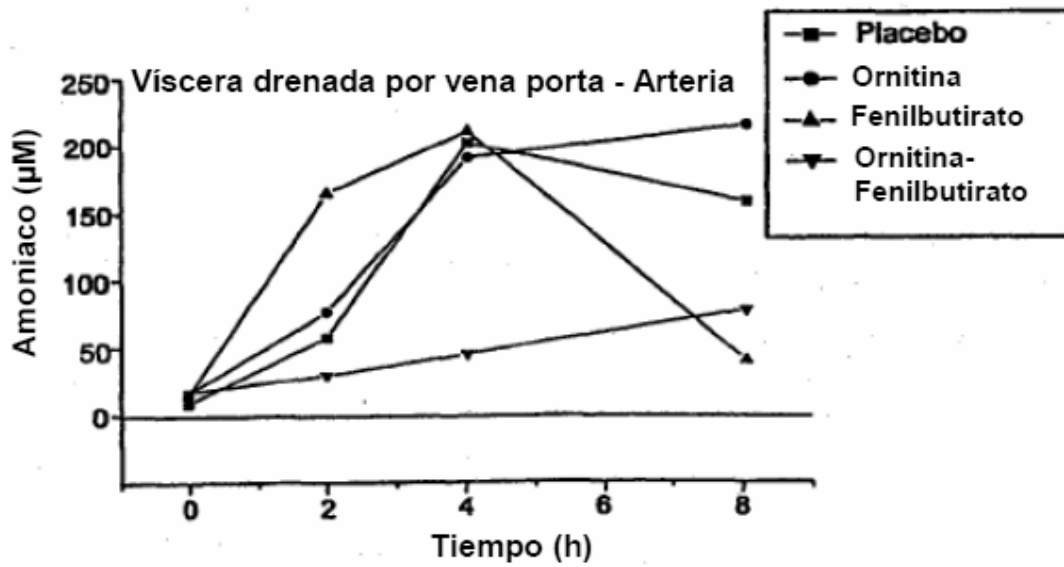


Figura 25

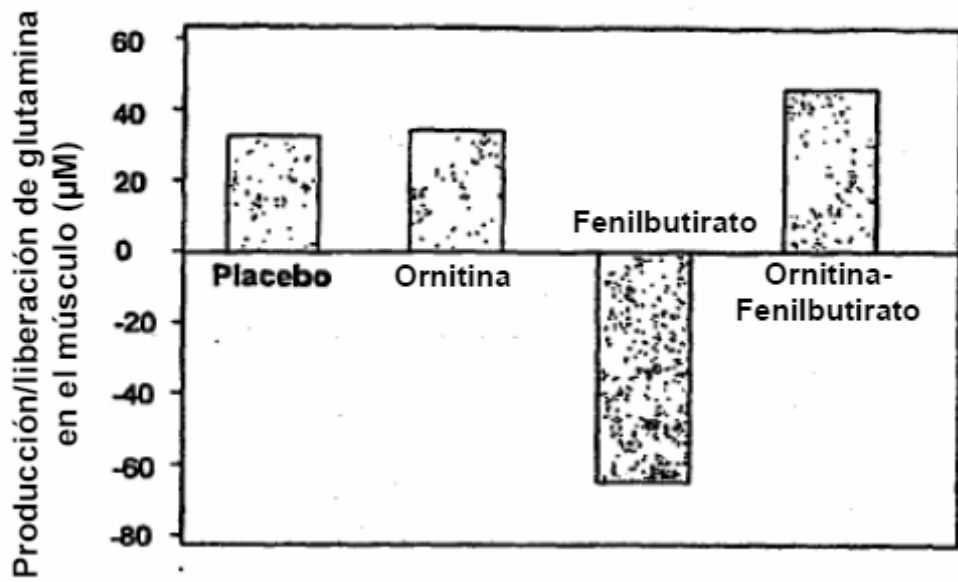


Figura 26

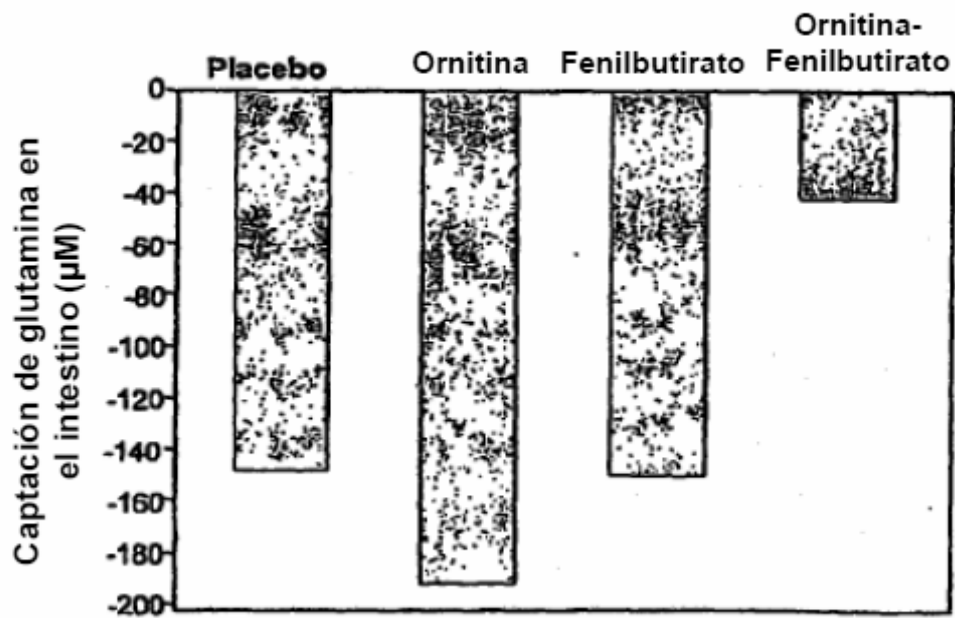


Figura 27

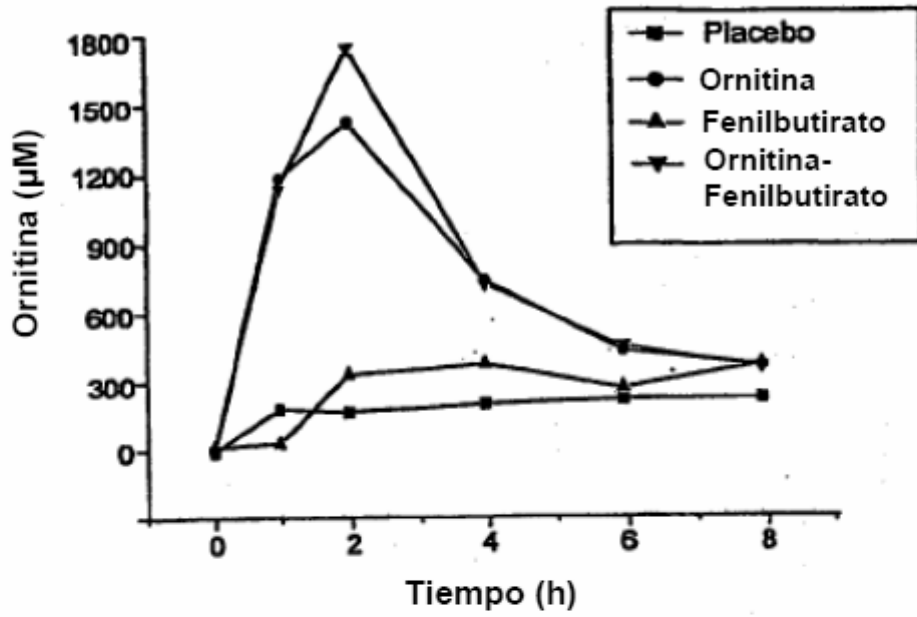


Figura 28

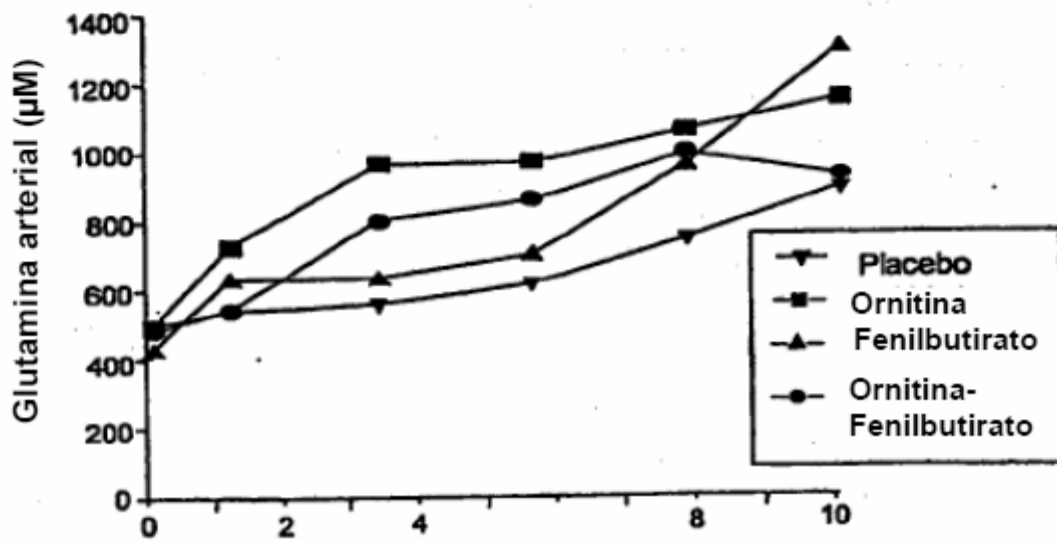


Figura 29

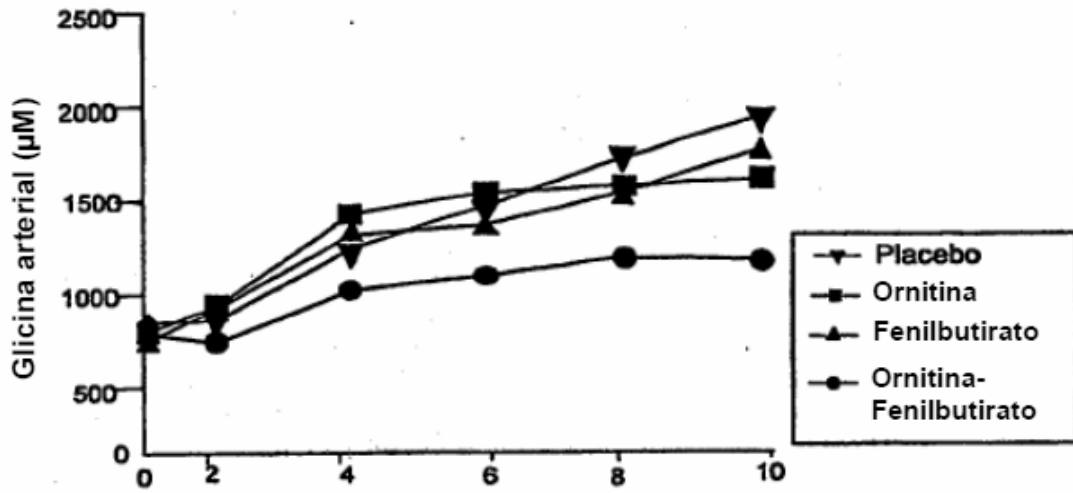


Figura 30

