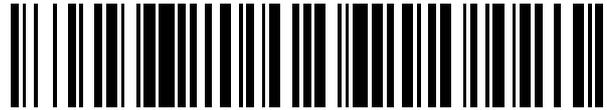


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 526**

51 Int. Cl.:

A61P 3/00 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2010 E 10803013 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2456304**

54 Título: **Métodos de modulación de ácidos de cadena ramificada y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.07.2009 US 228485 P

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

24.09.2015

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
Mail Stop BM210 One Baylor Plaza
Houston, Texas 77030-3411, US**

72 Inventor/es:

LEE, BRENDAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 546 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de modulación de ácidos de cadena ramificada y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) representan aproximadamente el 40% de los aminoácidos esenciales en sujetos sanos y deben ser adquiridos a través de una dieta bien balanceada. Los aminoácidos de cadena ramificada son tóxicos en exceso, pero son necesarios para la síntesis de proteínas. Los niveles en plasma normales en los niños para isoleucina, leucina, y valina, varían de 37 a 40 $\mu\text{mol/L}$, 70 a 170 $\mu\text{mol/L}$, y 160 a 350 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. En adultos, los niveles normales de plasma para isoleucina, leucina, y valina son 42 a 100 $\mu\text{mol/L}$, 66 a 170 $\mu\text{mol/L}$, y 150 a 310 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Los BCAA tienen importantes funciones fisiológicas además de su papel como
10 precursores de proteínas. En los tejidos periféricos tales como el músculo esquelético, los BCAA son donantes de nitrógeno para la síntesis de alanina y glutamina, moviendo así el nitrógeno derivado de la oxidación de aminoácidos del músculo al hígado para la síntesis de urea. Además, la leucina actúa como una señal de nutrientes anabólicos influyendo tanto en la secreción de insulina por las células β del páncreas y la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y algunos otros tejidos. Con el fin de equilibrar la necesidad del cuerpo de BCAA con el suministro de BCAA
15 de la dieta, la vía catabólica de BCAA está estrechamente regulada. Las vías catabólicas de BCAA tienen dos etapas comunes. La primera es una desaminación reversible catalizada por la aminotransferasa de cadena ramificada dependiente de la vitamina B6 (BCAT) para producir el correspondiente α -cetoácido de cadena ramificada (BCKA). La segunda es la descarboxilación oxidativa irreversible de los BCKA, llevada a cabo en gran parte por el control de la actividad del complejo deshidrogenasa de α -cetoácido de cadena ramificada (BCKDC).

20 La desregulación del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada conduce a un error innato del metabolismo en los recién nacidos conocida como enfermedad de la orina de jarabe de arce (MSUD). MSUD, también llamada cetoaciduria de cadena ramificada, es un trastorno autosómico recesivo, por lo general se diagnostica poco después del nacimiento. Es causada por defectos en el BCKDC. De este modo, el defecto resulta en una acumulación de los BCAA, a saber, leucina, valina, isoleucina, y sus respectivos α -cetoácidos (α -cetoisocaproato, α -cetoisovalerato, y metal
25 valerato) en las células y fluidos corporales. La acumulación de estos tres aminoácidos y sus correspondientes cetoácidos conduce a la encefalopatía y la neurodegeneración progresiva en individuos no tratados.

US3503530 aborda los trastornos de MSUD y ciclo de la urea. Propone una fórmula infantil con un nivel mínimo de proteína para el crecimiento normal. Esto se explica para posponer el daño en los lactantes metabólicamente anormales sin diagnosticar hasta que se completa la detección neonatal para trastornos metabólicos hereditarios.

30 US5434166 aborda enfermedades desmielinizantes incluyendo MSUD. Esta explica que puede ser posible inhibir tales enfermedades o sus síntomas particulares utilizando 2-fenil-3-aroilbenzotiofenos que inducen la expresión de TGF β -3.

La presente invención responde a una necesidad que se percibe desde hace mucho tiempo de terapias que sean eficaces en la regulación del catabolismo de BCAA, tal como en MSUD, que se puedan utilizar de forma independiente o junto con el cumplimiento de la dieta.

35 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a fenilbutirato o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo o un profármaco del mismo seleccionado entre butiroiloximetil-4-fenilbutirato y gliceril tri- [4-fenilbutirato] para su uso en un método de tratamiento de un individuo para un error innato del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, que comprende la etapa de administrar el fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del
40 mismo al individuo.

El individuo puede incluir un mamífero, tal como un ser humano, perro, gato, caballo, cerdo, cabra u oveja, por ejemplo. En aspectos específicos, el individuo tiene una afección médica como resultado del error innato en el metabolismo de aminoácidos. Aunque la invención en ciertos casos es aplicable a un error innato en cualquier metabolismo de los aminoácidos, en realizaciones específicas los aminoácidos son aminoácidos de cadena ramificada. En casos
45 particulares, el individuo tiene un error innato del metabolismo de la leucina, valina, o isoleucina. En realizaciones específicas, el individuo tiene MSUD, aunque en otras realizaciones el individuo tiene hipervalinemia, la deficiencia de isobutiril-CoA deshidrogenasa, la deficiencia de beta-cetotiolasa, la deficiencia de 2-Metilbutiril-CoA deshidrogenasa, hipermetioninemia, homocistinuria, cistationinuria, acidemia isovalérica, la deficiencia de 3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa, o la deficiencia 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa. En realizaciones específicas, el individuo tiene X Frágil, esclerosis
50 tuberosa, síndrome de Rett, el autismo, o la diabetes. El fenil-butirato o sal o éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo (también denominado en este documento como un "captador de amoniaco") se metaboliza a fenilacetato. En lo particular, el captador de amoniaco es fenilbutirato, BUPHENYL® (fenilbutirato de sodio), AMMONAPS®, butiroiloximetil-4-fenilbutirato, gliceril tri [4-fenilbutirato] (HPN-100). Como se describe en el presente

documento la composición para el tratamiento puede tener actividad eliminadora de amoníaco y/o actividad inhibidora de histona desacetilasa.

5 En algunos casos, el método comprende además la restricción en la dieta de la ingesta de aminoácidos de cadena ramificada en dicho individuo. La MSUD puede ser de los tipos seleccionados de la forma clásica, la forma intermedia, la forma intermitente y la forma sensible a la tiamina de la enfermedad

En aspectos específicos de la invención, el aminoácido de cadena ramificada es al menos uno de leucina, isoleucina y valina. En ciertos casos, el alfa-cetoácido de cadena ramificada es al menos uno de ácido ceto-isocaproico, ácido ceto-metilvalérico y ácido ceto-isovalérico. La sal es la sal de sodio, sal de calcio, sal de litio o una sal de potasio, en ciertos casos.

10 Como se describe en este documento, fenilbutirato o sal o éster o profármaco del mismo pueden causar la fosforilación de los residuos S293 y S303 de la subunidad E1 de la proteína del complejo enzima de cadena ramificada deshidrogenasa.

En aspectos particulares de la invención, el compuesto se administra por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

15 Lo anterior ha esbozado algunas de las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que se pueda entender mejor la descripción detallada de la invención a continuación. Las características y ventajas adicionales de la invención que serán descritas en lo sucesivo, formaran el objeto de las reivindicaciones de la invención.

Breve descripción de los dibujos

20 Las anteriores y otras características y aspectos de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada de una realización específica de la invención, cuando se lee en conjunto con los dibujos adjuntos, en donde:

25 La figura 1 es un gráfico que representa los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en sujetos control (N = 3) de referencia y luego después del tratamiento con fenilbutirato de sodio (PBA). Abreviaturas: Ile = isoleucina; Leu = Leucina; Val = valina. *: P <0.05. Los valores son la media de tres momentos después de dos días de tratamiento. Los sujetos del estudio recibieron PBA a la dosis de 10 gramos/m²/día, dividida en cuatro dosis iguales cada seis horas durante tres días. Los sujetos recibieron una ingesta de proteínas constante de 0.6 gramos/kg/día como una combinación de fórmula libre de BCAA y proteína entera. Las mediciones se realizaron en el día tres en tres momentos diferentes, separadas por 30 minutos en el estado alimentado. Tener en cuenta que el eje y, representa concentraciones que comparan el inicio del estudio hasta tres días de tratamiento. Los tres sujetos muestran una disminución significativa los niveles para los tres BCAA (leucina, isoleucina y valina) después del tratamiento PBA.

30 La Figura 2 es un gráfico que representa los niveles de cetoácidos de cadena ramificada (BCKA) en sujetos control (N = 3) de referencia y luego después del tratamiento con fenilbutirato de sodio. Abreviaturas: KMV = α -ceto- β -metilvalerato; KIC = α -cetoisocaproato; KIV = α -cetoisovalerato. *: P <0.05. Los valores son la media de tres momentos después de dos días de tratamiento. Todos los sujetos tuvieron la misma ingesta de proteínas en estado estacionario durante tres días en la prueba. Los sujetos del estudio recibieron PBA a la dosis de 10 gramos/m²/día divididos en cuatro dosis iguales cada seis horas durante tres días. Los sujetos recibieron una ingesta de proteínas constante de 0.6 gramos/kg/día como una combinación de fórmula libre de BCAA y proteína entera. Las mediciones se realizaron en el día tres en tres momentos diferentes separadas por 30 minutos en el estado alimentado. Tener en cuenta que el eje y, representa las concentraciones que comparan el inicio del estudio hasta tres días de tratamiento. Los tres sujetos disminuyeron sus BCKA.

35 La Figura 3 es un gráfico que representa los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en pacientes con MSUD (N = 5) de referencia y luego después del tratamiento con fenilbutirato de sodio. Los valores son la media de tres momentos después de dos días de tratamiento. Todos los pacientes tuvieron la ingesta de proteínas en estado estacionario durante tres días en la prueba. Los sujetos del estudio recibieron PBA a la dosis de 10 gramos/m²/día dividida en cuatro dosis iguales cada seis horas durante tres días. Los sujetos recibieron una ingesta de proteínas constante de 0.6 gramos/kg/día como una combinación de fórmula libre de BCAA y proteína entera. Las mediciones se realizaron en el día tres en tres momentos diferentes, separadas por 30 minutos en el estado alimentado. Abreviaturas: Ile = isoleucina; Leu = Leucina; Val = valina. *: P <0.05. Tener en cuenta que el eje y, representa las concentraciones que comparan el inicio del estudio hasta tres días de tratamiento. Tres de cinco pacientes con MSUD fueron "respondedores" y disminuyeron sus BCAA.

40 La Figura 4 es un gráfico que representa los niveles de cetoácidos de cadena ramificada (BCKAs) en pacientes con MSUD (N = 5) de referencia y luego después del tratamiento con fenilbutirato de sodio. Los valores son la media de tres momentos después de dos días de tratamiento. Todos los pacientes tuvieron la ingesta de proteínas en estado

estacionario durante tres días en la prueba. Los sujetos recibieron una ingesta de proteínas constante de 0.6 gramos/kg/día como una combinación de fórmula libre de BCAA y proteína entera. Los sujetos del estudio recibieron PBA a la dosis de 10 gramos/m²/día dividida en cuatro dosis iguales cada seis horas durante tres días. Las mediciones se realizaron en el día tres en tres momentos diferentes, separadas por 30 minutos en el estado alimentado.

5 Abreviaturas: KMV = α -ceto- β -metilvalerato; KIC = α -cetoisocaproato; KIV = α -cetoisovalerato. *: P <0.05. Tener en cuenta que el eje y, representa las concentraciones que comparan el inicio hasta tres días de tratamiento. Tres de cinco pacientes con MSUD fueron "respondedores" y disminuyeron sus BCKAs.

La Figura 5 es un análisis de transferencia Western del extracto de hígado usando un anticuerpo contra la forma fosforilada de la subunidad E1 de BCKDC de ratones C57B6 (N = 5 ratones por grupo) tratados con fenilbutirato o placebo. Para investigar el efecto y el mecanismo del fenilbutirato en el BCKD, los ratones (n = 5) fueron tratados con solución salina o 50 mg/kg/día de fenilbutirato dividido en tres administraciones durante tres días consecutivos y después de tres días de tratamiento se sacrificaron para los análisis. Las proteínas se extrajeron a partir de hígados de ratón y se realizó una transferencia Western, utilizando un anticuerpo de BCKDC anti-fosfoserina, el anticuerpo anti-BCKDC-E1, y el anticuerpo anti-BCKDC-E2. Cada carril corresponde al extracto de hígado de un ratón independiente (de # 1 a # 3). La forma fosforilada del BCKD se reduce significativamente en los ratones tratados con fenilbutirato en comparación con el grupo placebo.

10
15

La figura 6 muestra los niveles de transcripción del BCKDC, según la evaluación de RT-PCR cuantitativa, de aislados de las células de hígado y músculos de los ratones C57B6 (N = 5 ratones por grupo) tratados con placebo o fenilbutirato. Los ratones (n = 5) fueron tratados con solución salina o 50 mg/kg/día de fenilbutirato divididos en tres administraciones para tres días consecutivos y después de tres días de tratamiento que se sacrificaron para los análisis. El efecto de fenilbutirato no está en la expresión del ARN de las respectivas subunidades de BCKDC.

20

Las figuras 7A y 7B muestran la oxidación de leucina en células linfoblastos de sujetos control (C-660, C-661) y pacientes con MSUD (P -1, -2, -3, -4, -5) no tratados o tratados con fenilbutirato 1 mM, durante 48 h. La oxidación de leucina se midió mediante el uso de ensayo radiactivo como se describe en Materiales y Métodos y se expresa en CO₂ liberado pmol/min/mg de proteína. Los valores son la media \pm SD (n=3), * p \geq 0.05, ** p \geq 0.01. La figura 7C muestra la transferencia de Western del complejo BCKD (subunidades E1 α -fosfo {P}/E1 α y E2), BCATm y BCATc en las células linfoblastos de sujetos control (C-660, C-661) y pacientes con MSUD (P -1, -2, -3, -4, -5) no tratados o tratados con fenilbutirato (PB) 1 mM, durante 48 h. β -tubulina se utiliza como un control interno. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

25

Las figuras 8A y 8B muestran la oxidación de leucina en presencia de CIC en células linfoblastos de sujetos control (C-660, C-661) y pacientes con MSUD (P -1, -2, -3, -4, -5) no tratados o tratados con fenilbutirato 1 mM, durante 48 h. La oxidación de leucina se midió mediante el uso de ensayo radiactivo como se describe en Materiales y Métodos y se expresa en CO₂ liberado pmol/min/mg de proteína. CIC está en todas las reacciones en la concentración de 1 mM. Los valores son medias \pm SD (n = 3), * p \geq 0.05, ** p \geq 0.01. La Figura 8C muestra la transferencia Western del complejo BCKD (subunidad E1 α -fosfo {P}/E1 α) en células linfoblastos de sujetos control (C-660, C-661) y pacientes con MSUD (P -1, -2, -3, -4, -5) no tratados o tratados con CIC o fenilbutirato (PB) 1 mM, durante 2 o 48 h, respectivamente. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

30
35

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, ciertos detalles se exponen tales como cantidades específicas, tamaños, *etc.* con el fin de proporcionar un conocimiento profundo de las presentes realizaciones reveladas en este documento. Sin embargo, será obvio para los expertos en la técnica que la presente descripción puede ponerse en práctica sin tales detalles específicos. En muchos casos, los detalles relativos a tales consideraciones y similares se han omitido en la medida en que tales detalles no son necesarios para obtener una comprensión completa de la presente descripción y están dentro de las habilidades de las personas de experiencia usual en la técnica relevante.

40

I. Definiciones

45

De acuerdo con la convención de ley de patentes de mucho tiempo, las palabras "un" y "una" cuando se utilizan en el presente documento en consonancia con la palabra que comprende, incluyendo las reivindicaciones, significan "uno o más". Se contempla que cualquier método o composición descrita en el presente documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrita en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar un estado, trastorno o afección, es suficiente para efectuar dicho tratamiento. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, condición física y respuesta del mamífero que se va a tratar. Tal como se utiliza en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para prevenir, inhibir,

50

reducir, o eliminar una o más causas, síntomas o complicaciones de los niveles en plasma elevados de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácido de cadena ramificada en un individuo. En ciertas realizaciones, un efecto terapéutico deseado es el logro de los niveles en plasma diana de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácido de cadena ramificada del individuo. En realizaciones específicas, el tratamiento se considera terapéuticamente eficaz cuando hay una medida particular de la reducción en el nivel en plasma de uno o más aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa-cetoácidos de cadena ramificada. En ciertos casos, el tratamiento se considera terapéuticamente eficaz cuando hay una reducción de al menos 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, 30%, 32.5%, 35%, 37.5%, 40%, 42.5%, 45%, 47.5%, o 50% del nivel en plasma de uno o más aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada o cuando hay una reducción de al menos aproximadamente 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, 30%, 32.5%, 35%, 37.5%, 40%, 42.5%, 45%, 47.5%, o 50% del nivel en plasma de uno o más aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada. El experto en la técnica reconoce que los niveles en plasma se pueden medir por métodos estándar en la técnica, por ejemplo usando una prueba de aminoácidos plasma o la prueba de aminoácidos en orina por cromatografía y/o espectrometría de masas.

Como se utiliza en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o afección incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de los síntomas clínicos del estado, trastorno o afección en desarrollo en un mamífero que puede estar afectado por o predispuesto al estado, trastorno o afección, pero que aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección; (2) inhibir el estado, trastorno o afección, *i.e.*, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma; o (3) aliviar la enfermedad, *i.e.*, provocar la regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

El término "captador de amoniaco" se define anteriormente. Estas especies se encuentran en la clase con el fenilacetato (PAA) que funcionan para el enlace de la glutamina u otros aminoácidos y resultar en la excreción de nitrógeno. Las sales del ácido 4-fenilbutírico pueden ser del tipo alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo, litio, sodio, potasio, magnesio o calcio, por ejemplo.

II. Enfermedad de la orina de jarabe de arce

Las opciones de tratamiento para la MSUD son extremadamente limitadas y generalmente constituyen de la restricción en la dieta de la ingesta de BCAA, diseñada para mantener los niveles en plasma dentro de un rango que es aceptado para ser no tóxico y apoyar el crecimiento y desarrollo óptimo. Los niveles dietéticos diana de BCAA recomendados y por lo tanto los niveles en plasma resultantes para el manejo de la enfermedad varían según la edad (Tabla 1). En la prescripción de dietas a base de peso ideal "por kg de peso corporal", se utiliza el (percentil 50) para la edad, para optimizar el consumo. Esto es más importante en el cálculo de las dietas para los pacientes que tienen déficit de crecimiento. El cumplimiento de la dieta estricta es necesario para el manejo eficaz de la enfermedad y para prevenir el daño neurológico.

TABLA 1.

Enfermedad orina de jarabe de arce	0<0.5años	0.5<1años	1<4años	4<7 años	7<11años	11<19años	> 19años
ILE, mg	75-35/kg	65-30/kg	165-325/día	225-420/día	250-470/día	330-570/día	300-700/día *
LEU, mg	100-50/kg	75-35/kg	275-535/día	360-695/día	410-785/día	540-945/día	400-1100/día
VAL, mg	80-40/kg	70-30/kg	200-375/día	250-500/día	285-550/día	375-675/día	420-800/día *
Proteína, g	3.5-3.0/kg	3.0-2.5/kg	≥30/día	≥35/día	≥40/día	50-65/día	50-65/día
Energía, kcal	100% -125% de NAS/FNB RDA para la edad						

El BCKDC humano que es defectuoso en MSUD se codifica por seis loci genéticos (E1 α , E1 β , E2, E3, BCKD-cinasa y BCKD- fosfatasa). Sobre la base de la subunidad afectada del BCKDC humano, MSUD se clasifica en cuatro subgrupos moleculares. Estos incluyen tipos 1A, 1B, II, y III, refiriéndose a las deficiencias en E1 α , E1 β , E2, y las subunidades E3, respectivamente. Un total de 166 mutaciones de MSUD se han identificado hasta la fecha, con 50 en tipo 1A, 53 en el tipo 1B, 49 en el tipo 11, y 14 en el tipo 111. BCKDC cataliza la descarboxilación oxidativa limitante de la velocidad de los cetoácidos de cadena ramificada (BCKA) derivados de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), leucina, isoleucina, y valina. Las mutaciones o deficiencia en los resultados de la actividad de la enzima en la acumulación de 1-aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y cetoácidos de cadena ramificada (BCKA) que pueden ejercer efectos neurotóxicos. MSUD presenta como un fenotipo clínico y molecular heterogéneo. La gravedad de la enfermedad, que varía de la clásica a tipos de variantes leves, se clasifica comúnmente sobre la base de parámetros indirectos, por ejemplo, inicio, la tolerancia leucina y/o la actividad enzimática residual en las células. La terapia a largo plazo se basa en la restricción en la dieta de la ingesta de BCAA diseñada para mantener los niveles en plasma dentro del rango que se acepta que no sean tóxicos y sean apoyo con el crecimiento y el desarrollo óptimo (Tabla 2). El requerimiento diario de BCAA, ante la deficiencia marcada de descarboxilación oxidativa, se determina generalmente indirectamente monitorizando el efecto del tratamiento dietético en el crecimiento.

TABLA 2

Aminoácido de cadena ramificada	Niveles diana (mmol/L)	Intervalo de referencia normal (mmol/L)
Leucina	200-500	65-220
Isoleucina	100-200	26-100
Valina	100-300	90-300

Dado que sólo hay una enzima deshidrogenasa para los tres BCAA, los tres α -cetoácidos se acumulan y se excretan en la orina, dándole el olor perfumado característico en los individuos afectados. Tal acumulación puede causar una variedad de síntomas que incluyen letargo, irritabilidad, falta de apetito, movimientos anormales y un olor característico del jarabe de arce en la cera de los oídos (cerumen), el sudor y la orina de los individuos afectados.

MSUD se confirma además por detección de BCKA elevados, por cromatografía gases-espectroscopía de masas, análisis de orina, y BCAA elevados en sangre mediante análisis de aminoácidos. El diagnóstico definitivo se establece por la baja actividad medida de BCKDC en linfocitos o fibroblastos cultivados.

La gravedad de la enfermedad, que varía de la clásica hasta tipos de variantes leves, se clasifica comúnmente sobre la base de parámetros indirectos, por ejemplo, inicio de los síntomas, y la tolerancia de la dieta de leucina y/o la actividad enzimática residual en las células. Existen cinco subtipos clínicos de MSUD: la forma clásica neonatal severa, una forma intermedia, una forma intermitente, una forma sensible a la tiamina, y una forma deficiente E3 con acidosis láctica. Tradicionalmente, el fenotipo metabólico se clasifica como clásico o intermedio sobre la base de la actividad de BCKDC residual. En raras ocasiones, las personas afectadas tienen deficiencia de BCKDC parcial que sólo se manifiesta de forma intermitente o responde a la terapia dietética de tiamina. Sin embargo, las diferencias fenotípicas no son absolutas; individuos con formas intermedias o intermitentes pueden experimentar intoxicación metabólica grave y encefalopatía bajo suficiente estrés catabólico. Por otra parte, los ensayos *in vitro* de la actividad enzimática no predicen confiablemente gravedad clínica, edad de inicio, o la respuesta a las terapias potenciales.

En la MSUD clásica, que es la forma más común del trastorno, 50% o más de los cetoácidos se derivan de leucina, y la actividad de BCKDC es menos de 2% de lo normal. Los recién nacidos afectados parecen normales al nacer, los síntomas se manifiestan entre 4 a 7 días después del nacimiento. El fenotipo de MSUD clásico incluye olor de jarabe de arce evidente en cerumen poco después del nacimiento y en la orina de cinco a siete días de edad. En los recién nacidos no tratados, se observa cetonuria, irritabilidad y falta de apetito dentro de las 48 horas del alumbramiento. Otros síntomas clásicos como letargia, apnea intermitente, opistótonos y movimientos estereotipados como "cercado" y "bicicleta" son evidentes por cuatro a cinco días del nacimiento. Si se deja sin tratar sigue el coma y la insuficiencia respiratoria central. Además, tras el período neonatal, intoxicación aguda de leucina (leucinosis) y deterioro neurológico pueden desarrollarse rápidamente a una edad como resultado de la degradación neta de la proteína precipitada por infección, cirugía o estrés psicológico. Cada episodio de leucinosis se asocia con un alto riesgo de edema cerebral. En las personas mayores, los síntomas neurológicos varían y pueden incluir el deterioro cognitivo, hiperactividad, anorexia, alteraciones del sueño, alucinaciones, cambios de humor, distonía focal, coreoatetosis y ataxia. En los individuos de todas las edades con diagnóstico de MSUD, náuseas y vómitos son comunes durante la crisis y, a menudo requieren

hospitalización. El aumento de las concentraciones en plasma de leucina y ácido alfa-cetoisocaproico también conducen al coma en diferentes individuos.

5 Los individuos con actividad de BCKDC residual, entre 3-30% *ex vivo*, pueden parecer normales durante el período neonatal pero sin embargo tienen olor de jarabe de arce en el cerumen y un perfil de aminoácidos en plasma constantemente anormal. Estos individuos pueden presentar problemas de alimentación, crecimiento deficiente y retraso en el desarrollo como lactantes, o pueden presentar mucho más tarde en la vida retraso mental no sindrómico. La mayoría de las personas con MSUD intermedio se diagnostican entre los cinco meses y siete años de edad. La leucinosis grave, hinchazón del cerebro y la muerte pueden ocurrir si las personas con MSUD intermedia están sometidas al estrés catabólico grave. Los principios de manejo básicos para estos individuos son los mismos que para 10 las personas con MSUD clásica, y la distinción entre el tipo clásico e intermedio de MSUD no es absoluta.

15 La MSUD intermitente se caracteriza por un crecimiento normal y el desarrollo intelectual durante toda la lactancia y la primera infancia. Los individuos normalmente pueden tolerar ingesta normal de leucina. Los perfiles de ácidos orgánicos en orina y de aminoácidos en plasma, para estos individuos son normales o muestran una elevación leve de BCAA. Durante una infección o estrés fisiológico, estos individuos desarrollan las características clínicas y bioquímicas de MSUD clásica, y en raros casos pueden progresar a coma lo que lleva a la muerte. La actividad de BCKDC es aproximadamente 5-20% de normal.

20 La MSUD sensible a la tiamina fue descrita como una variante de MSUD, en donde la hiperaminoacidemia fue completamente corregida por medio de clorhidrato de tiamina con la restricción en la dieta. La existencia de individuos que presentan cierta MSUD sensible a la tiamina no es segura. En general, dichos individuos putativos tienen una actividad de BCKDC residual *ex vivo* de hasta 40% normal y no están enfermos en el período neonatal, pero presentan más tarde en la vida una manifestación clínica similar a la MSUD intermedia. El tratamiento consiste en una combinación de tiamina y la restricción en la dieta de BCAA. Por lo tanto, la contribución *in vivo* de la tiamina no es discernible.

25 La MSUD deficiente en E3 con acidosis láctica o MSUD tipo III, presenta una deficiencia combinada de la alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, piruvato deshidrogenasa, y los complejos alfa-ceto glutarato deshidrogenasa.

30 El manejo de MSUD incluye la restricción en la dieta de leucina, fórmulas libres de BCAA de alto contenido calórico, y monitoreo frecuente (Tablas 1 y 2). La descompensación metabólica se corrige mediante el tratamiento del estrés precipitante al tiempo que ofrece suficientes calorías, insulina, aminoácidos libres, isoleucina y valina, y en algunos casos la hemodiálisis/hemofiltración, para establecer la acreción proteica neta positiva. El edema cerebral es una complicación potencial común de descompensación metabólica y requiere tratamiento inmediato en una unidad de cuidados intensivos. Los adolescentes y adultos con MSUD y el ADHD, depresión, o ansiedad responden a los fármacos psicoestimulantes y antidepresivos. El trasplante ortotópico de hígado puede ser una terapia efectiva aunque la terapia no es óptima para la MSUD clásica. La monitorización frecuente de las concentraciones de aminoácidos en plasma y el crecimiento del feto quizás sean necesarias para evitar deficiencias de aminoácidos esenciales durante el 35 embarazo.

III. Realizaciones generales de la invención

40 Los trastornos que resultan de los errores innatos del metabolismo (EIM) afectan a un número muy pequeño de personas, a pesar de toda la población de pacientes que sufren los resultados de los trastornos metabólicos hereditarios es grande. Los defectos genéticos individuales dan lugar a alteraciones en la síntesis o catabolismo de proteínas, hidratos de carbono o grasas. La mayoría se deben a un defecto en una proteína de transporte o enzimática, lo que resulta en un bloque en una vía metabólica. Los efectos son tóxicos debido a la acumulación de sustratos antes del bloque, los compuestos intermedios de las vías metabólicas alternativas, los defectos en la producción y uso de energía causados por una deficiencia de los productos más allá del bloque, o una combinación de estas desviaciones metabólicas. Casi cada enfermedad metabólica tiene varias formas que varían en la edad de inicio, la gravedad clínica, 45 y, a menudo, modo de herencia.

50 En ciertas realizaciones de la invención, MSUD, es el resultado de un error congénito del metabolismo que da lugar a la acumulación de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa-cetoácidos de cadena ramificada. La invención abarca el tratamiento de la MSUD con un captador de amoniaco. En casos particulares, se emplea un régimen de tratamiento específico. Por ejemplo, las dosificaciones particulares, formulaciones, el programa de administración, y así sucesivamente se utilizan en la terapia del individuo.

Por lo tanto, se revela en este documento un método para disminuir los niveles en plasma de al menos uno de un aminoácido de cadena ramificada y/o alfa-cetoácido de cadena ramificada, que comprende administrar a un individuo, en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto captador de amoniaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad del compuesto administrado estimula la actividad

enzimática basal de la proteína complejo enzima deshidrogenasa de cadena ramificada, a niveles eficaces para alcanzar los niveles en plasma diana de los aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácido de cadena ramificada, para el individuo. En algunas realizaciones, los "niveles en plasma diana" de BCAA o BCKAs son los niveles que alcanzan un efecto terapéutico y son, por ejemplo, como se define en, pero no limitando a, la Tabla 2. Un efecto terapéutico se refiere a prevenir, inhibir, reducir, o eliminar una o más causas, síntomas o complicaciones de los niveles en plasma elevados de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácido de cadena ramificada en un individuo. Los niveles en plasma diana de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácido de cadena ramificada se pueden variar dependiendo de la edad del individuo y la gravedad de la enfermedad.

En general, la actividad enzimática basal en individuos con MSUD es de aproximadamente 3% a aproximadamente 30% de la actividad normal del complejo de proteína enzima de cadena ramificada deshidrogenasa. Específicamente, la actividad enzimática basal es de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de la actividad normal del complejo de proteína enzima de cadena ramificada deshidrogenasa. En una realización, la actividad basal es de aproximadamente 0% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 40%, aproximadamente 3% a aproximadamente 30%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, o 0% a aproximadamente 2% de la actividad normal del complejo de proteína enzima de cadena ramificada deshidrogenasa.

En realizaciones específicas de la invención, tras la administración de las composiciones terapéuticas de la invención, hay un aumento de la actividad enzimática basal en individuos con MSUD de al menos 1% 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con respecto al nivel de actividad antes del tratamiento.

IV. Preparaciones Farmacéuticas

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se proporcionan para el tratamiento de individuos que sufren de una condición médica que resulta en un error innato o el metabolismo. Las composiciones farmacéuticas particulares de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más captadores de amoníaco; en ciertos casos se disuelven o dispersan en un portador farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un captador de amoníaco será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración en animales (por ejemplo, humano), se entenderá que las preparaciones deben satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, según se requiere por la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como los materiales y combinaciones de los mismos, como será conocido por un experto normal en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329. Excepto en la medida que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

El captador de amoníaco puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en forma de aerosol, y si tiene que ser estéril para tales vías de administración como la inyección, por ejemplo. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, por vía intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, subcutánea, por vía mucosal, nasal, por vía intranasal, oral, tópica, local, por inhalación (*por ejemplo*, inhalación de aerosoles), inyección, infusión, la infusión continua, las células diana de baño de perfusión localizada directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como sería conocido por un experto normal en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990).

El captador de amoníaco se puede formular en una composición en una base libre, forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, *por ejemplo*, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como por ejemplo, sodio, potasio, amonio,

5 calcio o hidróxidos férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como las formuladas para administraciones parenterales como soluciones inyectables, o de aerosoles para la entrega en los pulmones, o formuladas para las administraciones alimentarias tales como cápsulas de liberación del fármaco y similares.

10 Además, de acuerdo con la presente invención, la composición de la presente invención apropiada para la administración se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El portador debe ser asimilable e incluye, portadores líquidos, semisólidos *i.e.*, pastas o portadores sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o portador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición contenida en el mismo, su uso en la composición administrable para su uso en la práctica de los métodos de la presente invención, es apropiado. Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, agentes de carga y similares, o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero no limitado a los parabenos (*por ejemplo*, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

20 De acuerdo con la presente invención, la composición se combina con el portador de cualquier manera conveniente y práctico, *i.e.*, por solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Tales procedimientos son de rutina para los expertos en la técnica.

25 En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o mezcla concienzudamente con un portador sólido o semi-sólido. La mezcla se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, tal como molienda. Los agentes estabilizantes también se pueden adicionar en el proceso de mezcla con el fin de proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, *i.e.*, la desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizantes para uso en una composición incluyen soluciones reguladoras, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, *etc.*

30 En realizaciones adicionales, la presente invención se puede referir al uso de una composición de portadores de lípidos farmacéuticos que incluyen un captador de amoniaco, uno o más lípidos, y un solvente acuoso. Tal como se utiliza en este documento, el término "lípidos" será definido para incluir cualquiera de un amplio rango de sustancias que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un solvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida por los expertos en la técnica, y como el término "lípidos" se usa en el presente documento, no se limita a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (*i.e.*, diseñados o producidos por el hombre). Sin embargo, un lípido normalmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glicolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos de éter y ligado con éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos. Por supuesto, los compuestos distintos de los descritos específicamente en este documento que se entiende por un experto en la técnica como los lípidos también se abarcan por las composiciones y métodos de la presente invención.

40 Un experto en la técnica estaría familiarizado con el rango de técnicas que se pueden emplear para dispersar una composición en un portador de lípidos. Por ejemplo, el captador de amoniaco se puede dispersar en una solución que contiene un lípido, disolver con un lípido, emulsificar con un lípido, mezclar con un lípido, combinar con un lípido, unir covalentemente a un lípido, contener como una suspensión en un lípido, contener o formar un complejo con una micela o liposoma, o de otra manera asociar con un lípido o estructura lipídica por cualquier medio conocido por los expertos normales en la técnica. La dispersión puede o no dar lugar a la formación de liposomas.

50 La cantidad de dosificación actual de una composición de la presente invención administrada a un paciente animal puede ser determinada por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la condición, el tipo de enfermedad a tratar, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, idiopatía del paciente y de la vía de administración. Dependiendo de la dosis y la vía de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad efectiva puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El practicante responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración del lo(s) ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para el sujeto individual.

55 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0.1%, 0.5%, 0.75%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%,

38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 1% a aproximadamente 90%, aproximadamente 5% a aproximadamente 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 20% a aproximadamente 75%, aproximadamente 25% a aproximadamente 70%, aproximadamente 30% a aproximadamente 65%, aproximadamente 35% a aproximadamente 60%, aproximadamente 2% a aproximadamente 75%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente 60% a aproximadamente 80% o más del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo. Naturalmente, la cantidad del(los compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil, se puede preparar de tal manera que una dosificación apropiada se obtendrá en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por alguien experto en la técnica de preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, pueden ser deseables una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, hasta aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números indicados en el presente documento, un intervalo de 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, *etc.*, se puede administrar, basado en los números descritos anteriormente. En ciertos casos, la cantidad que se utiliza es de al menos 250 mg/kg/día, al menos 275 mg/kg/día, al menos 300 mg/kg/día, al menos 325 mg/kg/día, al menos 350 mg/kg/día, al menos 375 mg/kg/día, al menos 400 mg/kg/día, al menos 425 mg/kg/día, al menos 450 mg/kg/día, al menos 475 mg/kg/día, al menos 500 mg/kg/día, al menos 525 mg/kg/día, al menos 550, al menos 575 mg/kg/día, al menos 600 mg/kg/día, al menos 625 mg/kg/día, al menos 650 mg/kg/día, al menos 675 mg/kg/día, al menos 700 mg/kg/día, al menos 725 mg/kg/día, al menos 750 mg/kg/día, al menos 775 mg/kg/día, al menos 800 mg/kg/día, al menos 825 mg/kg/día, al menos 850 mg/kg/día, al menos 875 mg/kg/día, al menos 900 mg/kg/día, al menos 925 mg/kg/día, al menos 950 mg/kg/día, al menos 975 mg/kg/día, al menos 1000 mg/kg/día, al menos 1.25 g/kg/día, al menos 1.5 g/kg/día, al menos 1.75 g/kg/día, al menos 2 g/kg/día, al menos 2.5 g/kg/día, al menos 3 g/kg/día, al menos 3.5 g/kg/día, al menos 4 g/kg/día, al menos 4.5 g/kg/día, al menos 5 g/kg/día, al menos 5.5 g/kg/día, al menos 6 g/kg/día, al menos 6.5 g/kg/día, al menos 7 g/kg/día, al menos 7.5 g/kg/día, or al menos 10 g/kg/día. En realizaciones específicas, se administra una dosificación de 450-600 mg/kg/día.

A. Formulaciones y composiciones alimentarias

En realizaciones particulares de la presente invención, el captador de amoniaco está formulado para ser administrado a través de una ruta alimenticia. Las rutas alimenticias incluyen todas las rutas posibles de administración en las que la composición está en contacto directo con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas reveladas en el presente documento se pueden administrar por vía oral, bucal, rectal, o sublingual, por ejemplo. Como tales, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se puede encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o suave, o se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta.

En ciertas realizaciones, los compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares (Mathiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; Patentes de los Estados Unidos N° 5,641,515; 5,580,579 y 5,792,451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio, un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, aroma de

cereza, aroma de naranja, etc. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar, o ambos. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, ésta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, portadores tales como un portador líquido. Las cápsulas de gelatina, comprimidos o píldoras pueden tener recubrimiento entérico. Los recubrimientos entéricos evitan la desnaturalización de la composición en el estómago o el intestino superior, donde el pH es ácido. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos N° 5,629,001. Al alcanzar el intestino delgado, el pH básico disuelve el recubrimiento en el mismo y permite que la composición sea liberada y absorbida por las células especializadas, *por ejemplo*, los enterocitos epiteliales y células M de los parches de Peyer. Un jarabe de elixir puede contener la sacarosa del compuesto activo como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en la preparación de liberación sostenida y formulaciones.

Para la administración oral, las composiciones de la presente invención se pueden incorporar alternativamente con uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, pulverización oral, o formulación sublingual administrada por vía oral, por ejemplo. Por ejemplo, un enjuague bucal se puede preparar incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo se puede incorporar en una solución oral tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o se dispersa en un dentífrico, o se adiciona en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, y humectantes. Alternativamente, las composiciones se pueden formar en una forma de comprimido o solución que se puede colocar bajo la lengua o de lo contrario se disuelve en la boca.

Las formulaciones adicionales que son apropiadas para otros modos de administración alimentaria incluyen supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólidas de varios pesos y formas, por lo general medicados, para su inserción en el recto. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, se funden o se disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para los supositorios, los portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, los supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en el intervalo de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, por ejemplo.

B. Formulaciones y composiciones parenterales

En realizaciones adicionales, un captador de amoniaco se puede administrar a través de una ruta parenteral. Tal como se utiliza en este documento, el término "parenteral" incluye rutas que pasan por el tracto digestivo. Específicamente, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar por ejemplo, pero no limitando a, por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal (ver las Patentes de los Estados Unidos N° 6,613,308; 5,466,468; 5,543,158; 5,641,515; y 5,399,363, por ejemplo).

Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de forma apropiada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos o en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de los Estados Unidos 5,466,468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una capacidad de inyección fácil. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (*i.e.*, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas apropiadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede provocar por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar estandarizada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se debe hacer isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán

5 conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis se puede disolver en solución isotónica de NaCl y, o bien se adiciona fluido de hipodermocclisis o se inyecta en el sitio propuesto de infusión, ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 y 1570-1580). Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Por otra parte, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir de las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

10 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Una composición en polvo se combina con un portador líquido tal como, *por ejemplo*, agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizante.

C. Diversas composiciones farmacéuticas y formulaciones

20 En otras realizaciones preferidas de la invención, el compuesto activo captador de amoniaco se puede formular para administración a través de varias rutas diversas, por ejemplo, administración tópica (*i.e.*, transdérmica), administración mucosal (intranasal, vaginal, *etc.*) y/o inhalación.

25 Las composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir el compuesto activo formulado para una aplicación medicinal tal como un ungüento, pasta, crema o polvo. Los ungüentos incluyen todas composiciones a base de solubilidad en agua, oleaginosas, adsorción, y emulsión, para aplicación tópica, mientras que las cremas y lociones son aquellas composiciones que incluyen solamente una base de emulsión. Los medicamentos administrados por vía tópica pueden contener un potenciador de la penetración para facilitar la adsorción de los ingredientes activos a través de la piel. Los potenciadores de la penetración apropiados incluyen glicerina, alcoholes, alquil metilsulfóxidos, pirrolidonas y laurocapram. Posibles bases de composiciones para aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema fría y vaselina, así como cualquier otra de base de ungüento soluble en agua o emulsión de absorción apropiada. Las preparaciones tópicas pueden incluir también emulsionantes, agentes gelificantes y conservantes antimicrobianos como necesarias para preservar el ingrediente activo y proporcionar una mezcla homogénea. La administración transdérmica de la presente invención también puede comprender el uso de un "parche". Por ejemplo, el parche puede suministrar una o más sustancias activas a una velocidad predeterminada y de una manera continua durante un periodo fijo de tiempo.

35 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar por los colirios, aerosoles intranasales, inhalación, y/o en otros vehículos de administración de aerosol. Los métodos de administración de composiciones directamente a los pulmones a través de aerosoles nasales aerosoles se han descrito por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 5,756,353 y 5,804,212. Del mismo modo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga *et al.*, 1998) y los compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de los Estados Unidos N° 5,725,871) también son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Del mismo modo, suministro transmucosal de fármacos en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5,780,045.

45 El término aerosol se refiere a un sistema coloidal de sólido finamente dividido de partículas líquidas dispersas en un propelente licuado o gas presurizado. El aerosol típico de la presente invención para la inhalación constará de una suspensión de ingredientes activos en propulsor líquido o una mezcla de propelente líquido y un solvente apropiado. Los propelentes apropiados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Los recipientes apropiados variarán de acuerdo con los requisitos de presión del propelente. La administración del aerosol variará de acuerdo con la edad del sujeto, el peso y la gravedad y la respuesta de los síntomas.

50 Los compuestos de la presente invención se pueden usar por separado o en forma de mezclas, incluyendo mezclas de ácidos y/o sales. Los compuestos de la presente invención pueden estar en las formas normalmente empleados, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y similares, y pueden contener aromatizantes, edulcorantes, *etc.*, en portadores sólidos o líquidos o diluyentes apropiados, o en medios estériles apropiados para formar soluciones o suspensiones inyectables. Los compuestos activos de la invención estarán presentes en dichas composiciones farmacéuticas en las cantidades suficientes para proporcionar la dosificación deseada en el intervalo descrito anteriormente. Por lo tanto, para la administración oral, los compuestos se pueden combinar con un portador líquido, sólido o diluyente apropiado para formar cápsulas, comprimidos, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden, si se desea, contener componentes adicionales tales como

5 aromatizantes, edulcorantes, excipientes y similares. Para la administración parenteral, los compuestos se pueden combinar con medios acuosos u orgánicos estériles para formar soluciones o suspensiones inyectables. Por ejemplo, se pueden utilizar soluciones en propilenglicol acuoso y similares, así como soluciones acuosas de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables solubles en agua o se pueden utilizar sales con base de los compuestos de la presente invención. Además, las soluciones inyectables preparadas de esta manera se pueden administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular, prefiriéndose la administración intramuscular en seres humanos. En algunas realizaciones, la formulación está sobresaturada, incluyen enmascaramiento del sabor, y/o abarcan formulaciones concentradas líquidas, por ejemplo.

10 Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular en diversas formas de dosificación unitarias tales como comprimidos, cápsulas blandas y duras, soluciones y similares, mediante la adición de portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo diluyentes tales como lactosa, lubricantes tales como estearato de magnesio, agentes aglutinantes tales como polivinilpirrolidona y agentes de desintegración tales como el calcio carboximetilcelulosa. La liberación prolongada de los compuestos activos de acuerdo con la presente invención también se contempla y se ha de entender que es, especialmente, una velocidad de liberación del ingrediente activo durante un periodo de aproximadamente 6 a 12 o hasta 24 horas, por ejemplo.

15 Además, una dosis de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede determinar apropiadamente dependiendo de varios factores tales como la edad y los síntomas de los pacientes, las formas de dosificación y los tipos de fármacos. El tamaño y la frecuencia de las dosis administradas en cualquier momento se pueden variar, según se desee siempre que la dosis diaria total indicada no se modifique de manera significativa. A pesar de que una dosis unitaria de los compuestos de acuerdo con la presente invención varía dependiendo de diversos factores tales como la gravedad de la enfermedad y la edad del individuo, puede ser generalmente en el intervalo de 8-13 gramos/m²/día mg, y preferiblemente 10 gramos/m²/día. Tal como se utiliza en este documento, el término "dosis unitaria" se refiere a una dosis diaria de los compuestos de la presente invención para un individuo que se pueden administrar sola o como una dosis dividida una vez o varias veces al día. Los compuestos de acuerdo con la presente invención se administran por vía oral preferentemente mediante la administración de la dosis unitaria en una dosis única o dosis divididas de una a cuatro veces al día. Sin embargo, las cantidades de dosificación y frecuencia de administración pueden variar.

D. Formulaciones de ejemplo específicas

30 En ciertas realizaciones de la invención, hay un uso terapéutico novedoso para un captador de amoníaco como un modulador efectivo de los niveles en plasma de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada y sus metabolitos para el tratamiento eficaz de MSUD, y en algunos casos en combinación con una restricción en la dieta de la ingesta de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada, en casos específicos.

35 En ciertas realizaciones de la invención, hay un uso terapéutico novedoso para fenilbutirato de sodio y sus ésteres o profármacos o derivados como un modulador efectivo de los niveles en plasma de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada y sus metabolitos para la el tratamiento eficaz de MSUD, y en algunos casos en combinación con una restricción en la dieta de la ingesta de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa cetoácidos de cadena ramificada, en aspectos particulares.

40 En realizaciones específicas de la invención, el captador de amoniaco comprende fenilbutirato (PBA) y en casos particulares se utiliza como un comprimido o un polvo. PBA tiene múltiples actividades biológicas, incluyendo su conocido actividad de inhibición de la histona deacetilasa (HDAC), uso de chaperones químicos bajo estrés del retículo endoplasmático (ER), y la captación de amoniaco en la disfunción del ciclo de la urea. El fenilbutirato de sodio es un profármaco y se metaboliza rápidamente a fenilacetato. El fenilacetato, un compuesto metabólicamente activo, se activa por primera vez a su co-enzima A éster, y luego se convierte fenilacetilCoA a través de la beta-oxidación de conjugados con glutamina a través de la acetilación para formar fenilacetilglutamina en el hígado y los riñones. La fenilacetilglutamina entonces se excreta por los riñones, proporcionando un vehículo alternativo para la excreción de nitrógeno. Sobre una base molar, es comparable a la urea (que contiene cada uno dos moles de nitrógeno). Por lo tanto, la fenilacetilglutamina proporciona un vehículo alternativo para la excreción de nitrógeno residual mediante el aumento de aclaramiento de glutamina.

45 En ciertas realizaciones, la presente invención revela un nuevo uso del compuesto químico fenilbutirato bien conocido, como un modulador terapéuticamente eficaz de los niveles en plasma de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa-cetoácidos de cadena ramificada y sus metabolitos. Sin desear estar ligado por ninguna teoría, se cree que el mecanismo de la depresión de BCAA por fenilbutirato de sodio puede surgir a través de dos posibilidades diferentes. El primer mecanismo de acción del PBA puede explotar su actividad conocida como un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), mediante la cual afecta a los niveles de transcripción de la proteína objetivo, el BCKDC. Un segundo nuevo

mecanismo de acción de PBA revelado en este documento es su efecto en el estado de fosforilación de BCKDC, que es eficaz en el aumento de la actividad enzimática de la proteína complejo enzima de cadena ramificada deshidrogenasa.

5 Ciertos captadores de amoníaco se pueden emplear en la invención, incluidos los de la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos US2010/0008859. En realizaciones particulares de la invención, se utilizan comprimidos Bufenil®/Ammonaps. En otras realizaciones de la invención, se utilizan Bufenil®/Ammonaps en polvo. El experto en la técnica reconoce que cada comprimido de Bufenil®, contiene 500 mg de fenilbutirato de sodio y los ingredientes inactivos celulosa microcristalina NF, estearato de magnesio NF, y dióxido de silicio coloidal NF, y también que cada gramo de Bufenil® polvo contiene 0.94 gramos de fenilbutirato de sodio y los ingredientes inactivos estearato de calcio NF, y dióxido de silicio coloidal NF; dicha composición se puede emplear en la invención.

10 En algunos casos, HPN-100 se administra al individuo. En ciertos casos, una formulación se prepara y/o se administra como se describe en la publicación PCT WO/2008/083226 y WO 2007005633.

15 En casos específicos, hay preparaciones de alta dosificación líquida de un captador de amoníaco (por ejemplo, sodio 4-fenilbutirato) en una composición acuosa concentrada, en algunos casos que comprenden al menos uno de un conservante y un agente edulcorante, y en ambos casos específicos, además con un agente aromatizante. En ciertas realizaciones, también se puede adicionar una fragancia. La composición sobresaturada puede tener una concentración de hasta 500 mg/mL de 4-fenilbutirato de sodio o más, por ejemplo, tales como los intervalos de concentración desde aproximadamente 300 mg/mL a aproximadamente 700 mg/mL. Un conservante tal como benzoato de sodio puede estar presente, tal como a aproximadamente 2.5 mg/mL, en aspectos específicos. En otras realizaciones, la dosificación puede incluir un edulcorante y/u otro agente saborizante, tal como aproximadamente 2 mg/mL de sacarina sódica o 0.01 mg/mL de la sucralosa. En algunas realizaciones un agente aromatizante tal como aproximadamente 2 mg/mL de aromatizante. Esta dosificación líquida altamente concentrada es más concentrada y más agradable al paladar, lo que lleva a una administración más fácil a los pacientes jóvenes y facilitar un mejor cumplimiento con el régimen de dosificación. Esta solución concentrada es eficaz y muy fácil de administrar a los lactantes, ya que requiere sólo unos pocos mililitros en cualquier momento en una sola dosis y es fácil de administrar a los niños, ya que cada dosis es de sólo unos pocos mililitros de solución en cualquier momento.

25 El experto en la técnica reconoce que hay un proceso de preparación de una composición sobresaturada de sodio 4-fenilbutirato, por ejemplo, en agua mediante la adición de agua suficiente para una cantidad conocida de sodio 4-fenilbutirato a una temperatura elevada de aproximadamente 30° a alrededor de 800 °C, para producir una concentración de aproximadamente 600 mg/mL, o por la adición del compuesto a una cantidad conocida de agua. La composición se puede ajustar a un pH diferente, tal como con un ácido tal como ácido clorhídrico, por ejemplo. Existe un proceso para la fabricación de 4-fenilbutirato a partir de ácido 4-fenilbutírico por disolución del mismo en un medio orgánico, el tratamiento con un álcali inorgánico, calentamiento, la adición de un segundo solvente para precipitar el producto, y aislar/purificar el producto.

30 Aún otro objeto es proveer un procedimiento para la fabricación de sodio 4-fenilbutirato, por ejemplo, con impurezas a un nivel de menos de 0.05% (base de peso/peso). El proceso general proporcionado es tratar Ph-(CH₂)₂-CH(COOEt)₂ (i.e., dietil 2-feniletilmalonato) con ácido acético y ácido clorhídrico acuoso para producir el ácido A-fenilbutírico (o 4-fenilbutanoico). La conversión del ácido 4-fenilbutírico en su sal de sodio se puede llevar a cabo en un medio solvente orgánico con una base inorgánica. En realizaciones específicas la presente invención utiliza una composición farmacéutica líquida que comprende una solución de sodio 4-fenilbutirato en un medio acuoso a una concentración de al menos aproximadamente 300 mg/mL, incluyendo generalmente a una concentración de aproximadamente 300 mg/mL a aproximadamente 700 mg/mL, y más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 400 mg/mL a aproximadamente 600 mg/mL, por ejemplo. Como una dosificación de la composición preferiblemente comprende además al menos uno o más de un agente aromatizante, incluyendo edulcorantes, un conservante, y mezclas compatibles de los mismos. La composición también puede incluir una base inorgánica.

45 En ciertas realizaciones, la composición administrada al paciente comprende un conservante, un agente saborizante, una fragancia, o una mezcla de los mismos. La composición también puede comprender, además, un conservante y un agente aromatizante. La composición también puede comprender además una fragancia y un edulcorante como el agente aromatizante.

50 En una realización, se utiliza una composición farmacéutica líquida que comprende sodio 4-fenilbutirato en un medio acuoso a una concentración de al menos aproximadamente 300 mg/mL. En ciertas realizaciones, la composición comprende además un conservante. La composición también puede comprender además un agente aromatizante. En ciertas realizaciones, la composición comprende tanto un conservante como un sabor. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos agentes aromatizantes y un conservante. La composición puede incluir sodio 4-fenilbutirato en un intervalo de concentración de aproximadamente 300 mg/mL a aproximadamente 700 mg/mL. La composición también puede contener sodio 4-fenilbutirato en el intervalo de aproximadamente 400 mg/mL a aproximadamente 600 mg/mL. La composición también puede contener el compuesto en una concentración de

aproximadamente 500 mg/mL. En ciertas realizaciones, la fracción en peso de agua es menor que la fracción en peso de sodio 4-fenilbutirato.

En ciertos casos, el conservante puede ser benzoato de sodio. En ciertas realizaciones, el agente edulcorante es sacarina sódica. En otras realizaciones, el agente edulcorante es sucralosa. La composición puede comprender una mezcla de sacarina sódica y sucralosa.

La composición también puede comprender además una base. En ciertas realizaciones, la base es carbonato de sodio. La base también puede ser hidróxido de sodio. La composición puede comprender además ácido 4-fenilbutírico. La composición también puede comprender además carbonato de sodio. En algunas realizaciones, la composición acuosa no se congela a 0 °C.

En cuanto al fenilbutirato de sodio como un captador de amoníaco a modo de ejemplo, se sabe que en algunos casos los niveles en plasma máximos de fenilbutirato ocurren dentro de 1 hora después de una sola dosis de 5 gramos del comprimido fenilbutirato de sodio con una C_{max} de 218 mg/mL en condiciones de ayuno; los niveles en plasma máximos de fenilbutirato ocurren dentro de 1 hora después de una sola dosis de 5 gramos de polvo de fenilbutirato de sodio con una C_{max} de 195 mg/mL en condiciones de ayuno. El Bufenil® se combina con la restricción de proteínas en la dieta y, en algunos casos, la administración de suplementos de aminoácidos esenciales. Cada comprimido de Bufenil® contiene 62 mg de sodio (9.2% peso/peso) (correspondientes a 124 mg de sodio por gramo de fenilbutirato de sodio [12.4% peso/peso]) y Bufenil® en polvo contiene 11.7 gramos de sodio por cada 100 gramos de polvo, correspondiente a 125 mg de sodio por gramo de fenilbutirato de sodio (12.4% peso/peso).

En realizaciones particulares de la invención, 450-600 mg/kg/día de fenilbutirato de sodio se da en recién nacidos, lactantes y niños que pesan menos de 20 kg, y de 9.9 - 13.0 g/m²/día se da en niños con un peso superior de 20 kg, incluidos los adolescentes y adultos. El experto en la técnica reconoce que un mol de fenilbutirato de sodio se metaboliza con un mol de fenilacetilglutamina, y a partir del nitrógeno estimado que se excreta en una ingesta restringida. La excreción de 0.09 g/kg/d de nitrógeno de fenilacetilglutamina requeriría una dosis de 0.6 g/kg/d de fenilbutirato de sodio, en ciertos casos.

De acuerdo con los datos farmacocinéticos del fenilbutirato en los seres humanos, así como estudios cinéticos *in vitro* de fenilbutirato en el complejo de BCKD, se requiere un régimen de dosificación específico para lograr niveles en plasma suficientes para alterar la fosforilación de E1a del complejo BCKD. En base a las células *in vitro*, la proteína recombinante, y el análisis PK humano, al menos 1 mM de C_{max} en plasma se requiere para lograr este efecto. Para lograr esto, un régimen de dosificación de fenilbutirato de sodio de 10 gramos/m² de área superficial/día dividida, ya sea tres veces al día o más sería necesario. Esta dosificación debe ser modificada en base a las propiedades de PK de otras formulaciones o derivados de fenilbutirato.

AMMONAPS se puede administrar al individuo, en algunos casos con una dieta reducida en proteínas. En ciertos casos, se administra por vía oral, a través de una gastrostomía, o a través de una sonda nasogástrica y, en algunos casos, con cada comida o alimentación. En ciertos casos, por lo menos tres horas deben pasar antes de la siguiente dosis. El experto reconoce que AMMONAPS comprende fenilbutirato de sodio y que en 1 g hay 940 mg de fenilbutirato de sodio; otros ingredientes incluyen estearato de calcio y sílica coloidal anhidra. Con el fin de dosificar con precisión y especialmente para cantidades más pequeñas requeridas para lactantes, se utilizan tres cucharas de medición para los gránulos, dando dosis de 0.95 g, 2.9 g y 8.6 g.

La farmacocinética después de la administración oral de fenilbutirato se ha estudiado en voluntarios sanos (dosis únicas de 2.5 g, n = 2; dosis única de 5 g, n = 21), en un paciente con deficiencia de ornitina transcarbamilasa y en 8 pacientes con hemoglobinopatías. Fenilbutirato se absorbe rápidamente: los niveles en plasma medibles de fenilbutirato se detectan 15 minutos después de la administración oral. Las concentraciones máximas de aproximadamente 1 mmol/l se alcanzan después de 1 h. En un estudio, la vida media de eliminación se estimó en 0.8 h. Los niveles en plasma medibles de fenilacetato (PA) y fenilacetatoglutamina (PAG) se detectan 30-60 minutos después de la administración por vía oral de fenilbutirato (la concentración máxima media es de 45.3 y 62.8 mg/mL, respectivamente). El tiempo hasta la concentración máxima aumenta con la dosis de PB y es de alrededor de 3.5 h para ambos metabolitos después de una dosis de 5 g de fenilbutirato. La vida media de eliminación se estimó en 1.3 y 2.4 horas, respectivamente para PA y PAG. La recuperación de fenilbutirato y PAG de las colecciones en serie de la orina se ha evaluado en algunos de los estudios citados. Está demostrado que en la mayoría de los sujetos, los riñones dentro de 24h excretan aproximadamente 80-100% del fármaco como el producto conjugado, PAG.

V. Manejo Nutricional

En ciertas realizaciones de la invención, el individuo está sujeto a la restricción en la dieta además del uso de los métodos y composiciones de la invención. Para promover el crecimiento y el desarrollo en los lactantes y los niños, los niveles en plasma de aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa-cetoácidos de cadena ramificada son monitoreados

5 cuidadosamente; también se monitorean los niveles en los adultos. En los individuos con MSUD, una dieta con niveles mínimos de los aminoácidos leucina, isoleucina, y valina debe ser mantenida con el fin de prevenir el daño neurológico. Cuando se diagnostica la afección y durante los episodios, el tratamiento puede incluir una dieta libre de proteínas. Los líquidos, azúcares y grasas, posiblemente, se pueden administrar por vía intravenosa (IV). La diálisis peritoneal o hemodiálisis se pueden utilizar para reducir el nivel de ciertos aminoácidos.

El médico seguirá de cerca los niveles de los aminoácidos de cadena ramificada y/o alfa-cetoácidos de cadena ramificada y ajustará la dieta con base en los niveles de aminoácidos. El tratamiento a largo plazo requiere una dieta especial, y la dieta en los lactantes puede incluir una fórmula infantil artificial con bajos niveles de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina. Las personas con esta condición pueden permanecer en esta dieta de forma permanente.

10 En ciertas realizaciones de la invención, la dieta del individuo con MSUD incluye una variedad de factores generales. La ingesta de los aminoácidos ramificados, que son esenciales, debe ser monitoreada cuidadosamente. Por ejemplo, la tolerancia del individuo de leucina debe calcularse siguiendo la medición de los niveles de BCAA y volviendo a medir a intervalos apropiados durante aproximadamente los primeros 6 a 12 meses de vida. El individuo puede ingerir un sustituto de proteína que proporciona los aminoácidos libres de BCAA, en ciertos casos. En aspectos particulares, el individuo ingiere un suplemento que proporciona las vitaminas necesarias, minerales y elementos traza. En algunos casos, suplementos de isoleucina, leucina, y/o valina, tomados según sea necesario. En algunos casos los niveles del paciente de isoleucina y valina caen debajo de los niveles deseables, o son demasiado bajos en relación con el nivel de leucina.

20 El individuo puede consumir una ingesta apropiada de calorías provenientes de uno o más de los alimentos bajos en o libres de las proteínas naturalmente; alimentos bajos en proteínas especialmente formulados; y suplementos de energía libres de proteínas que contienen polímeros de glucosa y grasas, en ciertos aspectos de la invención.

25 A los lactantes diagnosticados con MSUD se les puede administrar una fórmula de MSUD especial suplementada con cantidades controladas de fórmula infantil. La lactancia materna es beneficiosa para algunos niños con MSUD, pero no elimina la necesidad de la fórmula especial. Desde la infancia a la edad de 10 años, el individuo debe seguir tomando un sustituto proteico junto con otros alimentos que son monitoreados para suministrar la cantidad correcta de leucina. Los niveles de BCAA deben ser reevaluados al menos cada 6 hasta 12 meses. En los individuos que están sobre la edad de alrededor de 8 años de edad, el sustituto de proteína puede contener una cierta cantidad de una proteína equivalente (por ejemplo, 10 gramos, 12 gramos, 15 gramos, 17 gramos, o 20 gramos) y pueden ser tomados como una bebida de bajo volumen. La mezcla puede ser suministrada en forma de polvo que contiene los requerimientos diarios de aminoácidos, vitaminas, minerales y/o oligoelementos. Al igual que con los niños, pacientes adolescentes y adultos deben tener sus niveles de leucina medidos periódicamente.

30 A la dosis recomendada de fenilbutirato de sodio, por ejemplo, se sugiere que los lactantes con CPS de inicio neonatal y deficiencias de OTC inicialmente reciban una ingesta diaria de proteínas en la dieta limitada a aproximadamente 1.6 g/kg/día durante los primeros 4 meses de vida. Si se tolera, la ingesta diaria de proteínas puede aumentarse a 1.9 g/kg/día durante este período. La tolerancia a las proteínas disminuirá a medida que disminuye la tasa de crecimiento, lo que requiere una reducción en la dieta de la ingesta de nitrógeno. A partir de 4 meses a 1 año de edad, se recomienda que el lactante reciba al menos 1.4 g/kg/día, pero es aconsejable 1.7 g/kg/día. De 1 a 3 años de edad, la ingesta de proteínas no debe ser inferior a 1.2 g/kg/día; es aconsejable 1.4 g/kg/día durante este período. Si se indica la administración de suplementos calóricos, se recomienda un producto libre de proteínas. La ingesta calórica se debe basar en the "Recommended Dietary Allowances", 10th ed., Food and Nutrition Board, National Research Council, National Academy of Sciences, 1989.

VI. Kits

45 Cualquiera de las composiciones descritas en este documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, un captador de amoniaco puede estar comprendido en un kit. De este modo, los kits comprenden, en medios de envases apropiados, un captador de amoniaco y, opcionalmente, una composición de la dieta con aminoácidos de cadena ramificada restringidos de la presente invención. Los componentes del kit se pueden envasar o bien en medios acuosos o en forma liofilizada. Los medios de envase del kit incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otros medios de envase, en donde un componente se puede colocar y, preferiblemente, en alícuotas de forma apropiada. Donde hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro envase adicional en el cual los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Por lo general, los kits también incluirán un medio para contener el captador de amoniaco y otros envases de reactivo en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos envases pueden incluir envases de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retengan los viales deseados.

El captador de amoníaco se puede formular en una composición inyectable. En cuyo caso, los medios de envase pueden ser en sí mismos una jeringa, pipeta, y/u otros tales como aparatos, a partir de los cuales la formulación se puede aplicar a un área infectada del cuerpo, inyectar en un animal, y/o incluso aplicar y/o mezclar con los otros componentes del kit.

- 5 Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar en forma de polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede ser reconstituido mediante la adición de un solvente apropiado. Se prevé que el solvente también puede proporcionar en otros medios de envase.

VII. Ejemplos

- 10 Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, de ninguna manera, deben ser considerados como limitativos del amplio alcance de la invención.

Ejemplo 1

Protocolo Clínico

- 15 El protocolo clínico fue aprobado por the Human Subjects Institutional Review Board of the Baylor College of Medicine. Los sujetos de control sanos y los pacientes con MSUD fueron admitidos en el Centro de Investigación Clínica del Hospital General de Niños de Texas y se incluyeron en el protocolo de estudio después de que se obtuvo un consentimiento informado. Cada sujeto o un padre para los menores de 18 años dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Tanto los controles sanos (N = 3) como los pacientes con MSUD (N = 5) fueron ingresados dos veces en el centro de investigación clínica durante 3 días cada uno. Para ambas admisiones, los sujetos
20 recibieron una ingesta de proteínas constante de 0.6 gramos/kg/día como una combinación de fórmula libre de BCAA y proteína entera. En el tercer día de ingreso, el paciente tuvo el muestreo de sangre a las 0, 4, 6 y 8 horas durante un período de alimentación usual de cada dos horas, en el que se le dio 1/8^o de suscripción de proteína del día. En la segunda admisión, a cada sujeto se le dio fenilbutirato de sodio (Bufenil) a una dosis de 10 gramos/m²/día dividido en cuatro dosis iguales. Por otro lado, el muestreo de sangre se realizó en el estado alimentado en el día 3 como en la
25 admisión al inicio del estudio. A las muestras de plasma se les realizó el análisis de aminoácidos y su correspondiente BCKA: α -ceto- β -metilvalerato (KMV), α -cetoisocaproato (KIC), y α -cetoisovalerato (KIV). Las concentraciones de los aminoácidos en plasma se midieron con el método analizador de aminoácidos. El plasma de BCKA se derivatizó con o-fenilendiamina y la separación se hizo por elución en gradiente a partir de una columna de Spherisorb ODS2™ (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Waters) de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente.

30 Tratamiento con PBA provoca una disminución en los niveles de BCAA y BCKA

- Al distinguir el mecanismo de la depresión BCAA por fenilbutirato de sodio, los niveles de BCAA y de BCKA se midieron en sujetos control sanos en una ingesta de proteínas en estado estacionario, antes y después de la administración fenilbutirato de sodio. Estos sujetos control forman parte de un estudio más amplio que compara la eficacia de fenilbutirato de sodio vs. benzoato de sodio para disminuir ureagénesis. Se encontró que los niveles en plasma de BCAA (Figura 1) y de BCKA (Figura 2) se reducen en los sujetos control tratados con fenilbutirato de sodio (Figuras 1 y
35 2).

Administración de PBA correlacionada con la disminución de los niveles de expresión de BCAA y de BCKA en pacientes con MSUD

- 40 Para determinar si la depresión de BCAA y de BCKA por el fenilbutirato de sodio pueden ser de beneficio terapéutico en MSUD, se midieron los niveles en plasma de BCAA y de BCKA en sujetos con MSUD, en un ingesta de proteínas en estado estacionario, antes y después de la administración de fenilbutirato de sodio. Se encontró que los niveles de BCAA (Figura 3) se redujeron y se encontró que los niveles de BCKA (Figura 4) se disminuyeron significativamente en tres de los cinco sujetos con MSUD, tratados con fenilbutirato de sodio (Figuras 3 y 4). En los tres pacientes con MSUD, que demostraron una disminución de niveles en plasma de BCAA y BCKA, en respuesta a la administración de fenilbutirato de sodio, la reducción de leucina osciló entre 24% a 34% de los niveles al inicio del estudio. No hubo una correlación clara entre los niveles de actividad residual o la subunidad mutada del complejo BCKD y la respuesta bioquímica al fenilbutirato.
45

Ejemplo 2

Medición de la expresión de BCKDC y actividad en pacientes con MSUD intermedia y de inicio tardío

5 Cincos pacientes con formas intermedia y/o de inicio tardío de MSUD fueron reclutados para un ensayo con fenilbutirato. Los pacientes con la forma intermedia tienen algún grado de actividad de la enzima residual y, por lo tanto, se planteó la hipótesis de que tengan mayor probabilidad de responder al tratamiento en comparación con los pacientes con la forma clásica que no tienen actividad residual. El diagnóstico de la forma intermedia se hizo sobre la base de la aparición
 10 clínica de los síntomas clínicos más allá del período neonatal. El diagnóstico de MSUD fue confirmado bioquímicamente basado en la leucina elevada y en la presencia de aloisoleucina en el plasma. El ensayo de la enzima y el análisis de ADN para la actividad de BCKDC y el genotipo, respectivamente, sobre estos sujetos se realizaron y se resumen (Tabla 3). La actividad de la enzima BCKDC se midió en fibroblastos de piel obtenidas a partir de los cinco pacientes, utilizando el método radiactivo descrito anteriormente. En este método, las células fibroblastos cultivados se incuban con α -1-¹⁴C-leucina, durante 4 horas en presencia de α -cloroisocaproato 1 mM en el medio para estimular la actividad de BCKDC. Al final de la incubación, se captura la cantidad de ¹⁴CO₂ liberado de la descarboxilación de la leucina sobre papel de filtro humedecido. La actividad de descarboxilación de BCKDC se expresa como pmol de CO₂ liberado/mg de proteína/hora y el porcentaje de actividad normal.

15 Se analizaron muestras de ADN de los cinco pacientes para mutaciones en los genes de BCKDHA, BCKDHB, y DBT por secuenciación de todos los exones de codificación y regiones intrónicas flanqueantes. Cuando sólo se encontró una mutación por secuenciación, las muestras de ADN fueron analizadas por matriz dirigida CGH para descartar microdeleciones. Curiosamente, la actividad enzimática *in vitro* en no se correlacionó con la presentación clínica porque tres de los cinco pacientes tienen una actividad muy baja (<5%) a pesar de la aparición tardía de la enfermedad.

TABLA 3

	Edad (años)	Género	actividad BCKD*		análisis de ADN		
			Media \pm SD	% de control normal	Subunidad de enzima afectada	Alelo 1	Alelo 2
Paciente 1 (AG) 24 M 3 \pm 2.81 0.96	24	M	3 \pm 2.81	0.96	Pendiente	Pendiente	Pendiente
Paciente 2 (JK)	17	M	74 \pm 6.7	0.9	E1 α	c.887_894del	p.Y393N
Paciente 3 (CR)	5	F	2 \pm 0.74	0.26	E1 α	p.v412M	p.V412M
Paciente 4 (GP)	6	F	272 \pm 31	36.1	E2	c.75_76del	p.R301C
Paciente 5 (CG)	16	F	7 \pm 1	1.62	E2	p.S366P	Exón 11 del

* CO₂ liberado pmol/mg de proteína/hora

20

Ejemplo 3

Tratamiento de PBA aumenta específicamente la actividad de BCKDC

25 La Tabla 4 muestra los efectos del fenilbutirato sobre las células fibroblastos de control y MSUD. Para confirmar que el efecto de la fenilbutirato era específico para la actividad de BCKD, la actividad enzimática se midió en los fibroblastos de pacientes control y con MSUD antes y después de la incubación con fenilbutirato a la concentración de 2 mM de dos pacientes independientes (un respondedor clínico y un no respondedor clínico) y en uno control. La línea celular de fibroblastos de control mostró un aumento de 1.7 veces en la actividad de la enzima después de la incubación con fenilbutirato. También se observó, un incremento similar (1.7 veces) sobre la actividad al inicio del estudio en una línea celular MSUD (paciente 5), consistente con la respuesta bioquímica para BCAA y α -cetoácidos en ese paciente. Sin embargo, los fibroblastos del paciente 3 no mostraron un aumento de la actividad enzimática sobre los niveles al inicio del estudio.

30

TABLA 4

	Fenilbutirato
--	---------------

	-	+
Control normal	100%	176.08%
Paciente 3 (CR) - no respondedores clínicamente	0.59%	0.52%
Paciente 5 (CG) - respondedor clínicamente	4.47%	7.62%

Ejemplo 4

Tratamiento con PBA disminuye la fosforilación de la subunidad E1-alfa del BCKDC

5 Un mecanismo post-traduccional de la regulación de la actividad de BCKDC por modificación covalente por fosforilación. Con el fin de investigar el efecto y el mecanismo de aumento de la actividad de BCKDC mediada por fenilbutirato, se administran por vía oral Bufenil® o solución salina a ratones C57B6 (N = 5 ratones por grupo) mediante sonda gástrica a la dosis de 50 mg/kg/día dividida en 3 administraciones durante 3 días consecutivos. Después de tres días de tratamiento se sacrificaron los animales para recoger las muestras de hígado. Las proteínas se extrajeron a partir de hígados de ratón, homogeneizando el tejido en una solución reguladora que contiene 5% de SDS y Tris HCl 0.0625 M. 10 Se realizaron análisis de transferencia Western, utilizando un anticuerpo anti-fosfo del BCKDC (regalo del Dr. Lynch), el anticuerpo anti-BCKDC-E1 (21), y el anticuerpo anti-BCKDC-E2 (Kamiya Biomedical Company). El análisis de transferencia de Western en el extracto de hígado mostró que el tratamiento con fenilbutirato (PBA) resultó en una reducción significativa de la subunidad E1- α fosforilada de BCKDC en comparación con los ratones tratados con solución salina ($p < 0.05$) (Figura 5).

15 Ejemplo 5

Niveles de transcripción del BCKDC inalterado después del tratamiento con PBA

Puesto que PBA es un conocido inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC), se midieron los niveles de transcripción del BCKDC después del tratamiento con PBA utilizando RT-PCR cuantitativa. Cinco ratones de tipo salvaje fueron tratados con ya sea placebo o PBA. Después del tratamiento se recogieron las células hepáticas y musculares. Se aisló el ARN y se sometió RT-PCR a tiempo real, para evaluar los niveles de transcripción de todas las subunidades del BCKDC y cinasa reguladora. Se encontró que los niveles de transcripción de la E1A, E1B, E2 reducen significativamente ($p < 0.006$) en el hígado. Por lo tanto, la observada actividad enzimática de BCKDC aumentada, inducida por PBA no se debe a un aumento en la cantidad de la enzima (ya que hay una disminución en la transcripción después del tratamiento con PBA), que más bien es debida a la modificación post-traduccional (disminución de la fosforilación) de la proteína existente. No se observaron cambios significativos en los niveles de transcripción de cualquiera de las subunidades del BCKDC o en los niveles de la BDK (cinasa de BCKDC) entre el placebo y las muestras tratadas con PBA (Figura 6). Por lo tanto, observada actividad enzimática de BCKDC aumentada, inducida por PBA no se debe a los efectos conocidos de PBA como un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC). 20 25

Ejemplo 6

30 Fenilbutirato potencia la actividad E1 e inhibe la fosforilación e inactivación de E1 α .

Para determinar el efecto del fenilbutirato sobre las enzimas catabólicas de BCAA individuales, actividades de amino transferasa de cadena ramificado mitocondrial (BCATm) y las enzimas del BCKDC se midieron con y sin fenilbutirato utilizando enzimas recombinantes purificadas. La BCATm genera los productos de BCKA que se elevan en MSUD y son los sustratos de BCKDC. La actividad de BCATm se midió a pH 8.0 y 298 K tal como se describe en el Ejemplo 2. La cinética de la reacción de la descarboxilasa E1 con y sin fenilbutirato se determinó en presencia de un aceptor de electrones artificial 2, 6-diclorofenolindofenol (DCPIP). La mezcla de ensayo contenía fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, MgCl₂ 2.0 mM, difosfato de tiamina 0.2 mM (ThDP) y DCPIP 0.1 mM. La velocidad de descarboxilación a 30 °C se midió mediante el control de la reducción del colorante a 600 nm (24, 25). Para el ensayo de la actividad global del BCKDC, las enzimas se intercambiaron en solución reguladora de fosfato (fosfato de potasio 30 mM, pH 7.5) que contiene DTT 5 mM usando una columna PD-10 y las concentraciones de enzima se calcularon a partir de los máximos de absorción a 280 nm. El complejo de proteínas se reconstituyó con E1, E2 lipoilada (lip-E2) y E3 en una relación molar de 12:1: 55, en la que lip-E2 existe como un 24-mero. La mezcla de ensayo contenía fosfato de potasio 30 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, NAD⁺ 3 mM, CoA 0.4 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM, 0,1% de Triton X-100, y ThDP 2 mM. La reacción global se monitorizó mediante la formación de NADH a 340 nm. Las constantes de velocidad aparente (K_{app}) a diferentes concentraciones de sustrato para todos los ensayos anteriores, se determinaron a partir de los cambios de 35 40 45

absorción a la longitud de onda máxima individual. Las constantes de velocidad de K_{app} se ajustaron usando la siguiente ecuación:

$$k_{app} = k_{cat} [S] / (K_m + [S])$$

5 La fosforilación de E1 se llevó a cabo en la mezcla de reacción de fosforilación (HEPES 30 mM, pH 7.4, DTT 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 0.2 mM y) con y sin adición de fenilbutirato. Las proteínas de E1, E2, y E3 se mezclaron a una relación molar 12:1:55 en una mezcla de reacción de 0.1 mL, y se adicionaron 0.1 µg de BCKDC-cinasa (BDK) de rata etiquetada con una proteína de enlace con maltosa. La mezcla se pre-incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción de fosforilación se inició después de la adición de ATP 0.4 mM a la mezcla de reacción, y la reacción se terminó en diferentes momentos mediante la adición de la concentración más alta de sal. La actividad de BCKDC general se midió como se ha descrito anteriormente.

15 Como se muestra en la Tabla 5, no hubo ningún efecto del fenilbutirato sobre la cinética de BCATm incluyendo k_{cat} y K_m . BCKDC tiene múltiples actividades enzimáticas y por lo tanto, se ha probado las siguientes actividades enzimáticas en presencia y ausencia de fenilbutirato: descarboxilasa E1 - tanto no fosforilada (completamente activa) como E1 completamente fosforilada (inactiva), la capacidad de BCKDC cinasa para fosforilar e inactivar E1, y la actividad de BCKDC general. Como se muestra en la Tabla 6, fenilbutirato mejoró la descarboxilación catalizada de E1 no fosforilada (enzima totalmente activa) de los tres BCKA significativamente. No sólo aumentó la k_{cat} si no también aumentó la sensibilidad de la enzima para BCKA mediante la reducción de sus valores de K_m . El fenilbutirato no tuvo un efecto sobre E1 fosforilada (enzima inactiva), pero evitó por completo la fosforilación e inactivación de E1 en presencia de BCKDC-cinasa (la Tabla 5, compara los valores de k_{cat} y K_m para E1 fosforilada y E1 más fenilbutirato y BDK). El fenilbutirato mejoró la actividad de BCKDC general como se muestra por los aumentos de 50% a 70% en los valores de k_{cat} para BCKA (Tabla 6). Por lo tanto, el fenilbutirato parece activar la actividad descarboxilasa y aumentar el estado de actividad de BCKDC mediante el bloqueo de la inactivación de E1 catalizada por cinasa.

TABLA 5

25 E1 protegida con fenilbutirato a partir de inactivación inducida por BDK y no tuvo efecto sobre la actividad de E1^a fosforilada.

Adiciones	Actividad de descarboxilasa catalizada por E1					
	k_{cat} (min ⁻¹)			K_m (µM)		
	KIC	KMV	KIV	KIC	KMV	KIV
[-] Fenilbutirato	7.6±1.0	5.2±0.8	12.0±1.2	39.0±2.0	45.0±4.0	48.0±3.0
[+] Fenilbutirato	20.2±1.5	18.0±1.0	25.0±2.0	24.0±2.0	21.0±3.0	22.0±2.0
[+] fenilbutirato ^b	19.8±1.7	20.0±1.1	28.0±1.9	27.0±2.0	18.0±2.0	20.0±3.0
[-] BDK						
[+] fenilbutirato ^b	20.6±2.5	22.0±1.8	26.0±2.2	21.0±1.9	21.0±3.0	25.0±2.0
[+] BDK						
	Actividad descarboxilasa catalizada por E1 medida después de la inactivación por BDK ^b					
[-] Fenilbutirato	0.9±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	532.0±35.0	610.0±28.0	680.0±20.0
[+] Fenilbutirato	0.9±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	550.0±27.0	642.0±38.0	720.0±47.0

^a la proteína E1 se reconstituyó primero con fenilbutirato (1.0 mM) y luego se adicionaron BCKDC-cinasa (BDK) (0.1 a 0.5 µg) y ATP (0.4- 1.0 mM).

^b la proteína E1 se fosforiló primero con la adición de BDK (0.1 µg) y ATP (0.4 mM).

Abreviaturas: KMV, α-ceto-β-metilvalerato; KIC, α-cetoisocaproato; KIV, α-cetoisovalerato.

Tabla 5. Fenilbutirato mejoró la actividad^a de BCKDC general.

Adiciones	Actividad de BCKDC ^b					
	k_{cat} (min ⁻¹)			k_m (μM)		
	KIC	KMV	KIV	KIC	KMV	KIV
[-] Fenilbutirato	140.0±15.0	118.0±10.0	197.0±12.0	45.0±6.0	53.0±7.0	55.0±4.0
[+] Fenilbutirato	255.0±10.0	226.0±18.0	309.0±15.0	41.0±5.0	50.0±3.0	40.0±5.0

Abreviaturas: KMV, α-ceto-β-metilvalerato; KIC, α-cetoisocaproato; KIV, α-cetoisovalerato.

5 Así, la presente invención proporciona un nuevo mecanismo de acción de PBA para la regulación de la actividad enzimática BCKDC que afecta la modificación post-traducciona de este complejo de proteína, a saber, la desfosforilación, aumentando así su actividad enzimática. El aumento de la actividad enzimática de BCKDC obtenida de este modo es eficaz en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el catabolismo defectuoso de aminoácidos de cadena ramificada.

10 Por ejemplo, la acción global del fenilbutirato y sus derivados en la fosforilación global se puede aplicar al tratamiento de enfermedades donde el estado de fosforilación de proteínas diana está regulado por la fosforilación en donde la alteración del estado de fosforilación de la proteína puede conducir a disminuir o aumentar en la actividad enzimática. Esta alteración de la actividad enzimática se traduciría en puntos finales terapéuticamente beneficiosos en el proceso de la enfermedad asociada.

Ejemplo 7

15 Actividad enzimática en líneas celulares de linfoblastos de control y de pacientes.

Después del tratamiento con fenilbutirato, se midió la actividad enzimática de líneas celulares de linfoblastos en el control y en los pacientes. Las líneas celulares de linfoblastos transformadas estaban disponibles de los 5 pacientes con MSUD y de los 2 controles para medir la actividad de BCKDC. Los linfoblastos se incubaron durante 48 h con y sin fenilbutirato 1 mM (una concentración menor de fenilbutirato fue utilizada debido a la mayor sensibilidad de estas células en comparación con los fibroblastos para el fármaco), entonces se midió la actividad de BCKDC sin la adición de α-cloroisocaproato (CIC). Como se muestra en la Figura 3, el cultivo de linfoblastos de los controles con fenilbutirato mejoró significativamente la oxidación de leucina tanto en linfoblastos de control (Figura 7A) como de pacientes (Figura 7b), con la excepción del paciente 5, en el cual el aumento no fue significativo. La transferencia Western (Figura 7C) con anticuerpos que detectan E1α, E1α-P, E2, y las isoenzimas de BCAT reveló un efecto complejo de fenilbutirato. De los 3 pacientes respondedores, los linfoblastos de los pacientes 4 y 5 mostraron una disminución en el estado de fosforilación de E1α sin cambio aparente en los niveles de E1. Ni los controles ni los pacientes 1, 2 y 3 respondieron. También parece que el fenilbutirato influye en los niveles de las isoenzimas BCAT, en particular la isoenzima citosólica BCATc que se expresó en linfoblastos y parece que aumenta en respuesta al fenilbutirato en todos los linfoblastos excepto en las células de linfoblastos del paciente 5. Los niveles de la isoenzima mitocondrial, BCATm, se elevaron ligeramente en ambos controles, así como en los pacientes 1 a 3 después del tratamiento con fenilbutirato. Por lo tanto, en las células de los dos pacientes con mutaciones E2 (Tabla 7), la activación de resultados de la actividad de la enzima a partir de la inhibición del estado de fosforilación de E1α, en realizaciones específicas de la invención. En las otras líneas celulares de pacientes, una mayor actividad no parece estar en correlación con los cambios de fosforilación, pero fue más bien relacionada con el aumento de los niveles de las isoenzimas BCAT.

35

TABLA 7. Características de los pacientes con MSUD.

	Edad (años)	Género	actividad ^a de BCKDC de fibroblastos		actividad ^a BCKDC de linfoblastos		Análisis de ADN		
			Media ± SD	% de control normal	Media ± SD	% de control normal	Subunidad enzima afectada	Alelo 1 ^o	Alelo 2 ^o
Paciente 1	24	Hombre	3±2.81	0.96	463.6±32.1	9.13	E1α	p.G290R (p.G245R) ^c	p.G290R (p.G245R) ^c
Paciente 2	17	Hombre	7.4±6.7	0.9	560.6±98.8	11.04	E1α	c.887_894del ^d	p.Y438N (p.Y393N) ^d
Paciente 3	5	Mujer	2±0.74	0.26	689.9±72	13.59	E1α	p.V412M (p.V367M) ^c	p.V412M (p.V367M) ^c
Paciente 4	6	Mujer	272±31	36.1	157.1±100.7	3.09	E2	c.75_76del ^f	p.R301C (p.R240C) ^e
Paciente 5	16	Mujer	7±1	1.62	73.7±18.1	1.45	E2	p.S366P (p.S305P) ^g	Exón 11 del ^g

^a Actividad de enzima medida en fibroblastos o linfoblastos se expresa en el pmol de CO₂ liberado/mg de proteína/hora.

^b Los sistemas de numeración de residuos de aminoácidos que comienzan con la iniciación de metionina como 1 o con el extremo amino terminal (entre paréntesis) son ambas enumerados.

^c Esta mutación informada anteriormente en estado homocigoto por Chuang *et al.* (1995) en los pacientes con una forma intermedia de MSUD.

^d Mutaciones informadas anteriormente por Zhang *et al.* (1989) y Chuang *et al.* (1995) en un paciente con MSUD clásica.

^e Mutaciones informadas anteriormente por Henneke *et al.* (2003) en pacientes con MSUD clásica.

^f Mutación informada anteriormente por Fisher *et al.* (1993) en estado heterocigoto compuesto con la mutación p.E163X en un paciente con MSUD clásica.

^g Mutaciones no reportadas previamente.

Ejemplo 8

5 Fenilbutirato mejora de la oxidación de los BCAA involucra tanto los efectos en estado de fosforilación de E1 y una acción directa sobre la actividad enzimática

Alfa-cloroisocaproato (CIC) es un conocido inhibidor de alfa-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa cinasa (BDK) (Harris et al., 1982) y se adiciona rutinariamente cuando se ensaya la actividad de BCKDC en líneas celulares humanas. Debido a que el fenilbutirato afecta el estado de fosforilación de E1α *in vivo* (véase la Figura 5), la oxidación de leucina se midió en las mismas líneas celulares como en la Figura 8 con CIC en el ensayo. Ambas células de control mostraron una mayor actividad en presencia de CIC que solas y la oxidación se incrementó en fenilbutirato (Figuras 8A y 8B). En las muestras de los pacientes, los pacientes 1 y 2 mostraron un patrón similar de respuesta a fenilbutirato como se observa en la ausencia de CIC. Por otro lado, en los linfoblastos del paciente 3, la oxidación de leucina de fue mayor que en las otras líneas celulares y las tasas casi se duplicaron en las células incubadas con fenilbutirato. La transferencia de Western (Figura 8C) con anticuerpos que detectan E1α y E1α-P mostró que CIC solo, o junto con fenilbutirato, disminuye el estado de fosforilación de E1α en tanto los controles como en los pacientes 4 y 5, pero no tuvo efecto en los pacientes 1, 2, y 3. CIC no tuvo ningún efecto sobre E2 o los niveles de isoenzimas BCAT. Tomados en conjunto, los resultados indican que la capacidad de fenilbutirato para mejorar la oxidación BCAA involucró ambos efectos en estado de fosforilación de E1 y una acción directa sobre la actividad enzimática. Los cambios en la actividad

de la isoenzima BCAT también afectan la producción de BCKA, en casos específicos. Todas las líneas celulares de pacientes acumularon más KIC que el observado en las líneas celulares de control.

Referencias

- 5 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.
- Patentes y solicitudes de patentes
- Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US2010/0008859
- Publicación PCT WO/2008/083226
- Patente de los Estados Unidos No. 6,613,308
- 10 Patente de los Estados Unidos No. 5,641,515
- Patente de los Estados Unidos No. 5,580,579
- Patente de los Estados Unidos No. 5,792,451
- Patente de los Estados Unidos No. 5,466,468
- Patente de los Estados Unidos No. 5,543,158
- 15 Patente de los Estados Unidos No. 5,641,515
- Patente de los Estados Unidos No. 5,399,363
- Patente de los Estados Unidos No. 5,629,001
- Publicaciones
- 20 Chuang, J. L., J. R. Davie, J. M. Chinsky, R. M. Wynn, R. P. Cox, and D. T. Chuang. Molecular and biochemical basis of intermediate maple syrup urine disease. Occurrence of homozygous G245R and F364C mutations at the E1 alpha locus of Hispanic-Mexican patients. *J Clin Invest* 95:954-63 (1995).
- Fisher, C. W., C. R. Fisher, J. L. Chuang, K. S. Lau, D. T. Chuang, and R. P. Cox. Occurrence of a 2-bp (AT) deletion allele and a nonsense (G-to-T) mutant allele at the E2 (DBT) locus of six patients with maple syrup urine disease: multiple-exon skipping as a secondary effect of the mutations. *Am J Hum Genet* 52:414-24 (1993).
- 25 Harris, R. A., R. Paxton, and A. A. DePaoli-Roach. Inhibition of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase activity by alpha-chloroisocaproate. *J Biol Chem* 257:13915-8 (1982).
- Henneke, M., N. Flaschker, C. Helbling, M. Muller, P. Schadewaldt, J. Gartner, and U. Wendel. Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 22:417 (2003).
- 30 Recommended Dietary Allowances", 10th ed., Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences, 1989
Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990.
- Zhang, B., H. J. Edenberg, D. W. Crabb, and R. A. Harris. Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 83:1425-9 (1989).
- 35 Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, se debe entender que se pueden hacer diversos cambios, sustituciones y alteraciones en el presente documento sin apartarse de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fenilbutirato o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo o un profármaco del mismo seleccionado de butiroiloximetil-4-fenilbutirato y tri-[4-fenilbutirato] de glicerilo para su uso en un método para tratar a un individuo por un error innato del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, que comprende la etapa de administrar el fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo al individuo.
2. El fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el individuo tiene la enfermedad de orina de jarabe de arce (MSUD).
- 10 3. El fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además la restricción en la dieta de la ingesta de aminoácidos de cadena ramificada en dicho individuo.
4. El fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha MSUD se selecciona de un grupo que consiste en la forma clásica, la forma intermedia, la forma intermitente y la forma sensible a la tiamina de la enfermedad .
- 15 5. La sal farmacéuticamente aceptable para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal es la sal de sodio, sal de calcio, sal de litio o una sal de potasio.
6. El fenilbutirato o la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fenilbutirato la sal o éster farmacéuticamente aceptable o profármaco o del mismo se administra por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

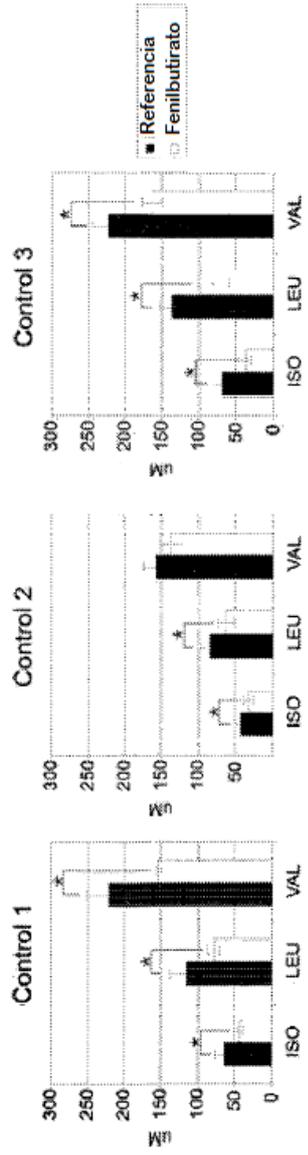


Figura 1

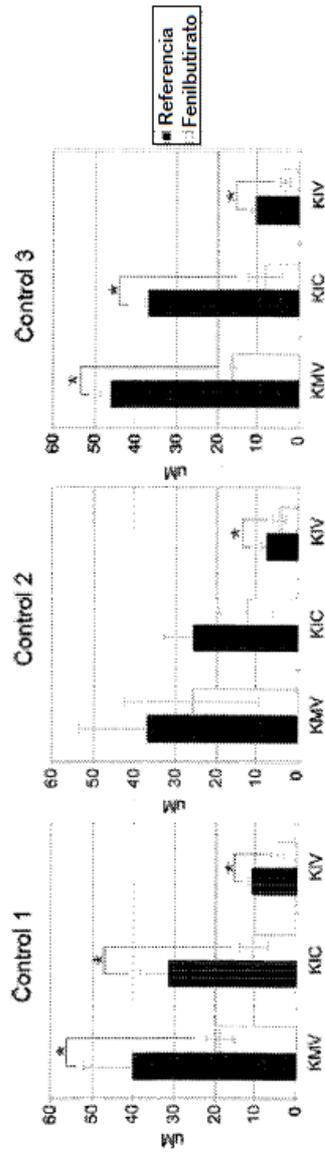


Figura 2

Pacientes con MSUD evaluados en PB y referencia

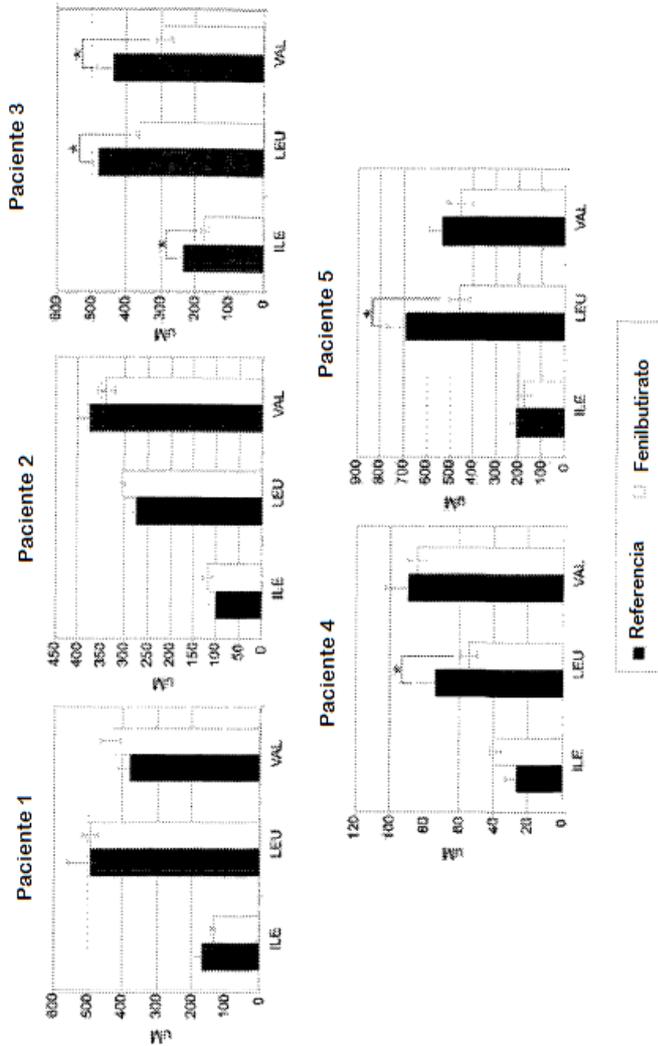


Figura 3

Pacientes con MSUD evaluados en PB y referencia

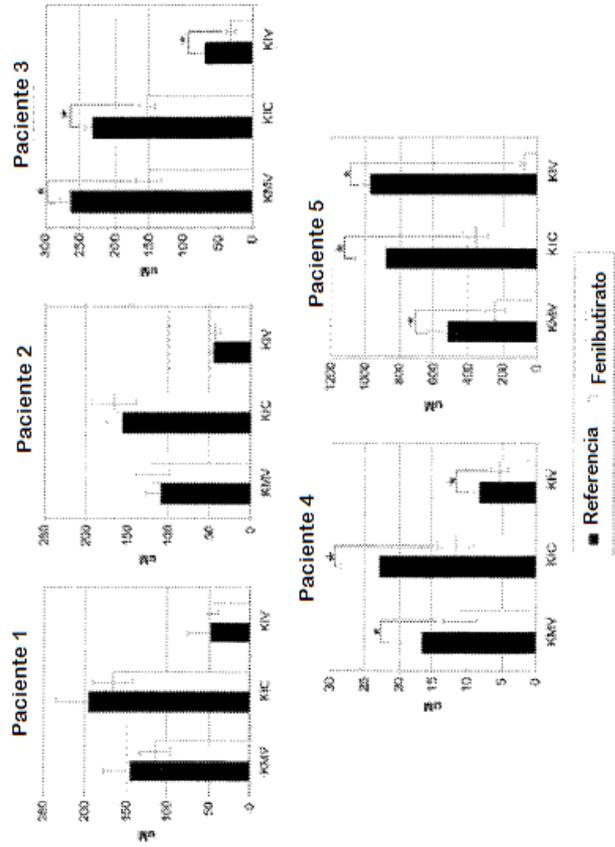


Figura 4

Efecto de PB sobre fosfo-E1 BCKD

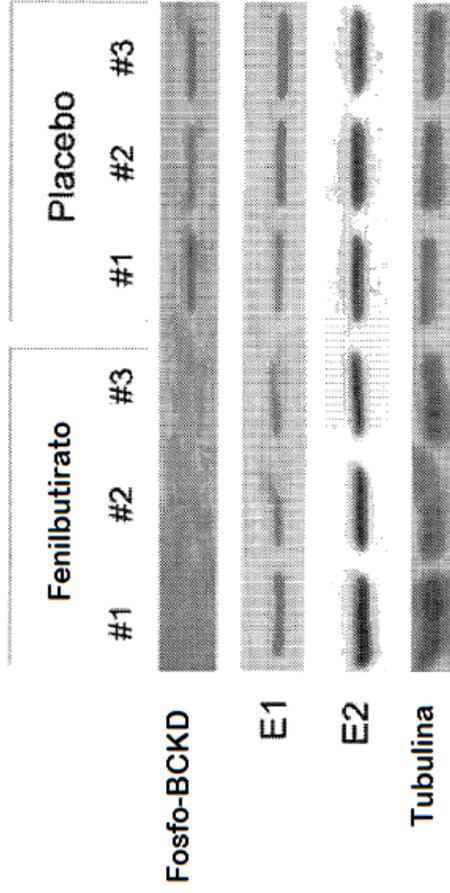


Figura 5

P<0.006

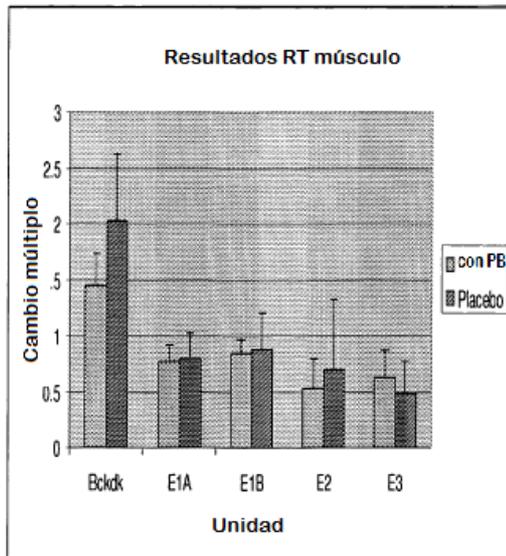
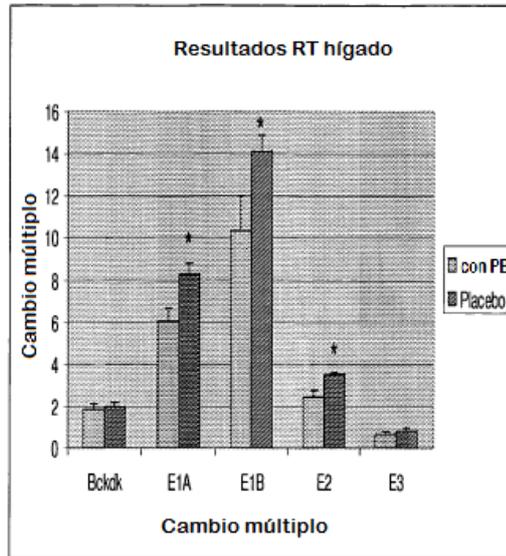


Figura 6

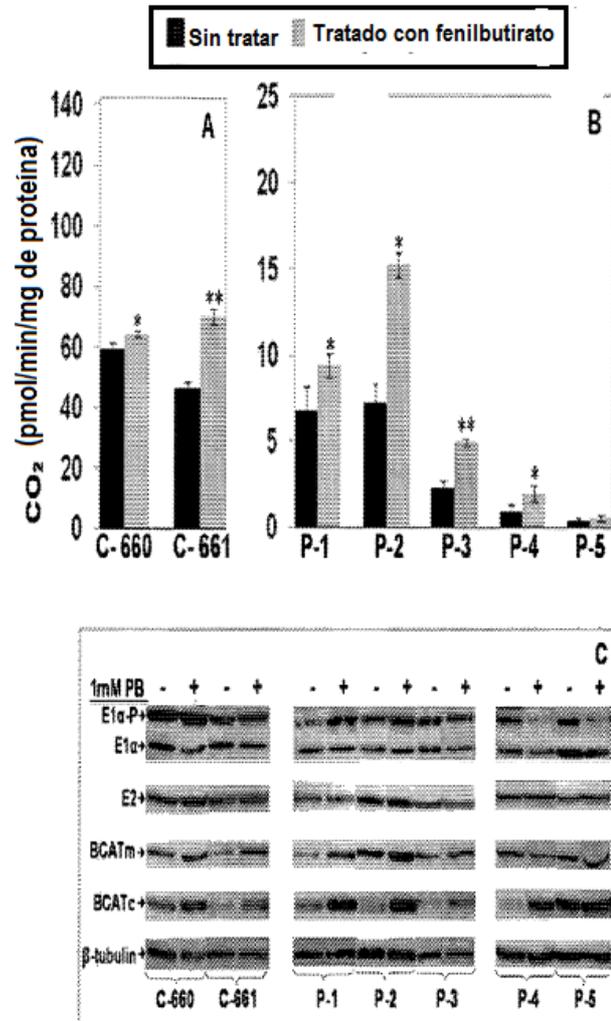


Figura 7

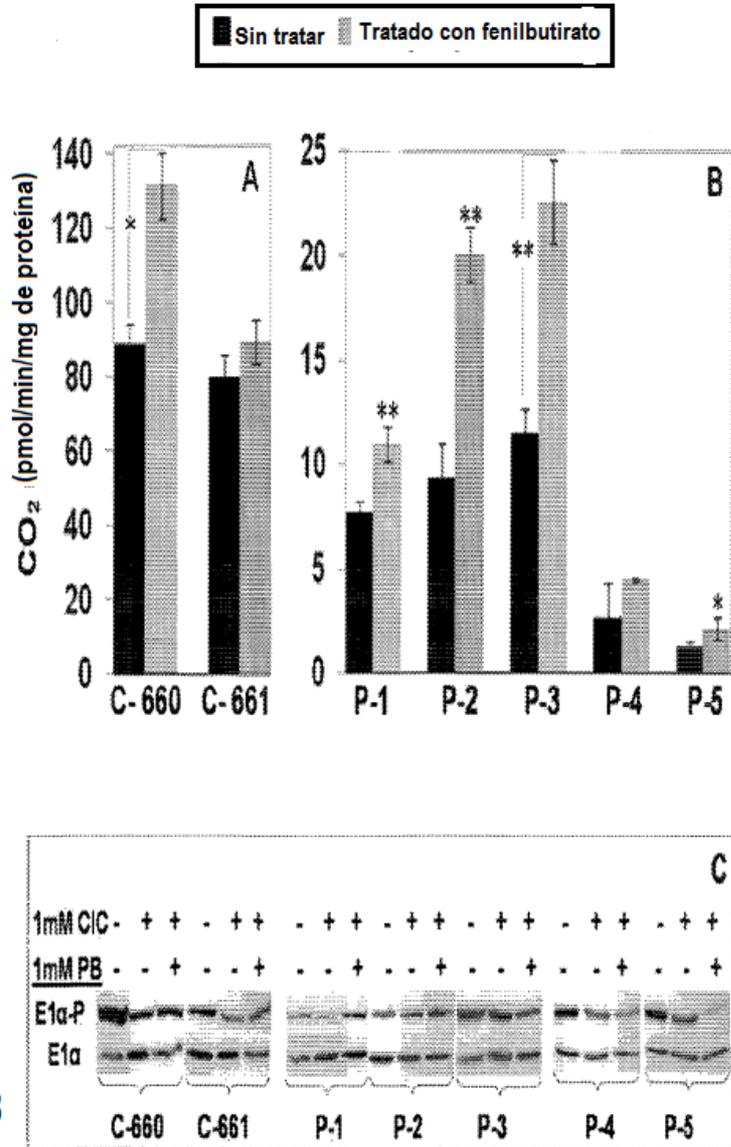


Figura 8