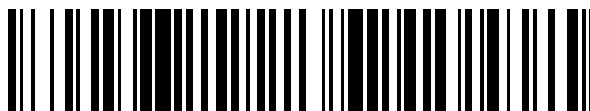


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 783**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011** **PCT/GB2011/001227**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012** **WO12022939**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011** **E 11748969 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 2605763**

54 Título: **Tratamiento**

30 Prioridad:

17.08.2010 GB 201013785

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2019

73 Titular/es:

YAQRIT LIMITED (100.0%)
UCL Business PLC The Network Building, 97
Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

JALAN, RAJIV y
SHAH, NAINA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 700 783 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención deriva del hallazgo inesperado de que la expresión del receptor de tipo Toll (TLR4) en el riñón y el cerebro está aumentada en ratas con conducto biliar ligado (un modelo para cirrosis). La expresión de TLR4 también está aumentada en los túbulos renales de pacientes con cirrosis que tienen insuficiencia renal y los niveles de TLR4 también están aumentados en la orina de dichos pacientes. Además, antagonizando TLR4, pueden reducirse muchas de las consecuencias o síntomas indeseados de disfunción renal en enfermedad hepática o insuficiencia hepática. La presente invención utiliza estos hallazgos para identificar y proporcionar antagonistas de TLR4 que pueden usarse en el tratamiento o prevención de disfunción renal en un individuo que tiene insuficiencia hepática crónica agudizada (ACLF).

Antecedentes de la invención

La insuficiencia renal y la disfunción renal son complicaciones que se presentan frecuentemente en pacientes con cirrosis o insuficiencia hepática y está asociada con altas tasas de morbilidad y mortalidad. La insuficiencia renal se caracteriza por un rápido deterioro en la función renal y habitualmente es mortal salvo que se realice un trasplante de hígado, aunque diversos tratamientos, tales como diálisis, pueden evitar el avance de la afección.

La disfunción renal y la insuficiencia renal pueden afectar a individuos con cirrosis (independientemente de la causa), hepatitis alcohólica grave o insuficiencia hepática fulminante, y habitualmente se produce cuando la función hepática se deteriora rápidamente a causa de una lesión aguda. La disfunción renal en cirrosis puede deberse a infección e inflamación solapadas o en su ausencia, una situación mencionada como síndrome hepatorenal (HRS). Estas son complicaciones relativamente comunes de cirrosis, que se producen en un 18 % de los pacientes con cirrosis en un año desde su diagnóstico, y en un 39 % de los pacientes con cirrosis en cinco años desde su diagnóstico.

Existe la hipótesis de que el HRS se produce por cambios en la circulación que alimenta los intestinos, alterando el flujo sanguíneo y el tono de los vasos sanguíneos en los riñones. Existe la hipótesis de que la insuficiencia renal en HRS es una consecuencia de estos cambios en el flujo sanguíneo, en lugar de un daño directo al riñón; los propios riñones parecen normales a simple vista y el tejido es normal cuando se observa al microscopio, y los riñones incluso funcionan normalmente cuando se ubican en un entorno por lo demás sano (tal como si se trasplantara a una persona con un hígado sano). Sin embargo, la situación en pacientes que desarrollan disfunción renal asociada con infección o inflamación solapada a menudo está asociada con evidencias de daño renal anatómico en histopatología.

La disfunción cerebral de cirrosis a menudo se precipita por infección o inflamación. Los estudios sugieren que la disfunción cerebral de cirrosis puede no ser completamente reversible, lo que sugiere que puede haber muerte de células cerebrales en esta situación.

Kitazawa T *et al.* (2009) J. Gastroenterology and Hepatology, 24; pág. 1089-1094 describen una estrategia terapéutica para regular la respuesta inmunitaria innata por el antagonista del receptor de tipo Toll 4 E5564 en ratas con lesión hepática grave y aguda inducida por D-galactosamina.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la sugerencia de que la disfunción renal en enfermedad hepática como se describe en la técnica anterior puede dividirse en dos afecciones diferentes. Los síntomas tradicionales de síndrome hepatorenal (HRS), tal como cambios en la circulación y flujo sanguíneo renal reducido, forman una afección mencionada en este documento como HRS. Sin embargo, en algunos pacientes, la insuficiencia renal en enfermedad hepática está asociada con infección y/o inflamación solapadas. La presente invención se refiere al último grupo de pacientes en que la disfunción renal o insuficiencia renal se observa en enfermedad hepática como resultado de inflamación o infección. La infección o inflamación en estos pacientes también da lugar a disfunción cerebral y edema cerebral.

La presente invención utiliza antagonistas del receptor de tipo Toll 4 en el tratamiento y prevención de disfunción renal e insuficiencia renal; resultante de ACLF.

Por consiguiente, la invención proporciona un antagonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) para su uso en un método de tratamiento o prevención de la disfunción renal en un individuo que tiene ACLF. Se divulga el uso de un antagonista de TLR4 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de disfunción renal o insuficiencia renal o el tratamiento de un individuo que padece disfunción renal y enfermedad hepática o un individuo que padece insuficiencia renal y enfermedad hepática o un individuo que padece disfunción cerebral y

edema cerebral y enfermedad hepática. Se divulga un método de tratamiento o prevención de la disfunción renal o insuficiencia renal o disfunción cerebral y edema cerebral en un individuo que lo necesita, particularmente cuando el individuo tiene enfermedad hepática tal como cirrosis, comprendiendo dicho método una etapa de administración a dicho individuo de un antagonista de TLR4. Se divulga el uso de un antagonista de TLR4 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de la disfunción cerebral o edema cerebral o el tratamiento de un individuo que padece disfunción cerebral y enfermedad hepática o un individuo que padece insuficiencia renal y enfermedad hepática. Se divulga un método de tratamiento o prevención de disfunción renal o insuficiencia renal en un individuo que lo necesita, particularmente cuando el individuo tiene enfermedad hepática tal como cirrosis e infección o inflamación solapada, comprendiendo dicho método una etapa de administración a dicho individuo de un antagonista de TLR4.

El individuo a tratar padece ACLF. El individuo a tratar puede padecer cirrosis, tal como cirrosis alcohólica. El individuo a tratar puede padecer insuficiencia hepática. El individuo a tratar puede padecer sobredosis de paracetamol. El individuo puede padecer síndrome hepatorenal (HRS). El individuo puede padecer, o estar en riesgo de uno o más de los siguientes, en comparación con un sujeto que no padece enfermedad hepática: disfunción renal; insuficiencia renal; HRS; disfunción cerebral y edema cerebral; creatinina en plasma aumentada; amoniaco en plasma aumentado; concentraciones aumentadas de enzima hepática; inflamación aumentada, lesión o disfunción en el hígado y/o riñón y/o cerebro y/o circulación sanguínea; daño del tejido hepático resultante de insuficiencia hepática; insuficiencia hepática aguda, hepatitis alcohólica y/o lesión por reperfusión del hígado.

La invención proporciona un antagonista de TLR4 como se describe en este documento para su uso en el tratamiento o prevención de disfunción renal en un individuo que tiene ACLF.

El antagonista para su uso de acuerdo con la invención puede dar lugar a: (a) expresión disminuida de TLR4 en el hígado y/o riñón y/o cerebro del individuo; y/o (b) niveles disminuidos de TLR4 en el hígado y/o riñón y/o cerebro del individuo; y/o (c) actividad disminuida de TLR4 en el hígado y/o riñón y/o cerebro del individuo. Esto provocaría inflamación reducida y generación de citocinas proinflamatorias y disfunción reducida de los órganos tales como el hígado y/o los riñones y/o el cerebro y/o de niveles disminuidos de TLR4 en la orina del individuo.

La invención también proporciona un método de diagnóstico de disfunción renal o insuficiencia renal o de predicción de insuficiencia renal en un paciente que tiene ACLF, comprendiendo el método: (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente, y (b) comparar el nivel de (a) con un nivel conocido de TLR4 de la orina de un paciente de control que no padece ACLF o disfunción renal, en el que un nivel aumentado en (a) en comparación con el control indica que el paciente tiene disfunción renal o insuficiencia renal o que el paciente está en riesgo aumentado de insuficiencia renal.

La invención también proporciona un método de identificación de un paciente, adecuado para el tratamiento de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el método: (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente, y (b) comparar el nivel de (a) con un nivel conocido de TLR4 de la orina de un paciente de control que no padece ACLF o disfunción renal, en el que un nivel aumentado en (a) en comparación con el control indica que el paciente puede ser adecuado para tratamiento de acuerdo con la presente invención. Por tanto, el paciente a tratar de acuerdo con la presente invención puede ser un paciente que tiene un nivel aumentado de TLR4 en orina en comparación con el nivel de TLR4 en la orina de un paciente de control, tal como un paciente sano, tal como un paciente que no padece ACLF o disfunción renal.

Se divulga un método de identificación de un agente adecuado para su uso en el tratamiento o prevención de la disfunción renal o insuficiencia renal, o disfunción cerebral o edema cerebral en cirrosis o enfermedad hepática, comprendiendo el método determinar si un agente de ensayo puede disminuir la cantidad o actividad de TLR4, en el que la capacidad de disminuir la cantidad o actividad de TLR4 indica que el compuesto puede ser adecuado para su uso en el tratamiento de disfunción renal o insuficiencia renal, o disfunción cerebral y edema cerebral en cirrosis o enfermedad hepática. En dicho método, la cantidad o actividad de TLR4 puede evaluarse en el hígado y/o riñón o en tejido o células obtenidas de hígado y/o riñón. Un método de cribado puede comprender la administración del agente de ensayo a una rata con conducto biliar ligado y determinar si la presencia del agente de ensayo da lugar a una disminución en la cantidad o actividad de TLR4 en el hígado y/o riñón y/o cerebro de la rata.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 a 7 muestran los efectos del tratamiento con acetaminofeno (APAP) o APAP y el antagonista de TLR4 STM28 en ratones. Estos se comparan con animales tratados de forma simulada.

La figura 1A muestra los efectos de dichos tratamientos sobre los niveles de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). La figura 1B muestra los efectos de dichos tratamientos en los niveles plasmáticos de creatinina (a mano izquierda) y amoniaco (a mano derecha). La figura 2 muestra los efectos de dichos tratamientos sobre los niveles de NFkBp65 en el hígado (figura 2A), riñón (figura 2B, a mano izquierda) y cerebro (figura 2B, a mano derecha). Las figuras 3 y 4 muestran los efectos de dicho tratamiento sobre los niveles de TNF α en el hígado (figura 3, a mano izquierda), riñón (figura 3, a mano derecha) y plasma (figura 4). La figura 5 muestra los efectos de estos tratamientos sobre la expresión de IL1A en el hígado

y la figura 6 muestra los efectos de estos tratamientos en hidrocefalia. La figura 7 muestra la histología del hígado de un ratón normal (a); de ratón tratado con APAP (b); y de ratón tratado con APAP y STM28 (c).

Las figuras 8 a 16 muestran los efectos del ligamiento del conducto biliar (BDL) o la operación simulada, opcionalmente combinada con tratamiento con lipopolisacárido (LPS) o norfloxacin (Norflox).

La figura 9 muestra los efectos de dichos tratamientos sobre los niveles de TLR4 en el riñón, medidos por transferencia Western. Se muestran los efectos de dichos tratamientos sobre los niveles de NFkBp65 en el riñón (figura 10), TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) en el riñón (figura 11), IL-6 (interleucina-6) en el riñón (figura 12) y TNF α e IL-6 en plasma (figura 13).

La figura 14 muestra la histología (hematoxilina y eosina) de riñón de animales que (a) se trataron de forma simulada, (b) de forma simulada + LPS, (c) con BDL y (d) con BDL + LPS. La figura 15 muestra la expresión de TLR4 en el riñón de (a) animales tratados de forma simulada + LPS y (b) animales tratados con BDL + LPS. La figura 16 muestra la expresión de caspasa 3 en el riñón de (a) animales tratados de forma simulada, (b) con BDL, (c) con BDL + Norflox, (d) de forma simulada + LPS, (e) con BDL + LPS y (f) con BDL + LPS + Norflox.

Las figuras 17 y 18 muestran la expresión de TLR4 en el hígado (figura 17) y riñón (figura 18). Figura 17: A: paciente normal; B: cirrosis descompensada; C: hepatitis alcohólica. Figura 18: A: paciente normal; B: afectación renal sin infección; C: afectación renal con infección; D: hepatitis alcohólica.

La figura 19 muestra los niveles de TLR4 en orina. A: transferencia de Western u orina de pacientes con lesión renal aguda (AKI), con síndrome hepatorenal (HRS) y sanos. B: el TLR4 en orina es mayor en pacientes con insuficiencia renal (AKI) y en aquellos con ALCF (cirrosis asociada con infección o inflamación solapada) en comparación con aquellos pacientes que tienen síndrome hepatorenal (descompensado). Control = pacientes sanos, Compensado = pacientes con cirrosis compensada.

La figura 20 muestra los niveles de creatinina en ratones. Simulado = ratones tratados de forma simulada (control); BDL = ratones con el conducto biliar ligado; STM28 = ratones tratados con el antagonista de TLR4 STM28.

La figura 21 muestra los niveles de creatinina en ratones. Simulado = ratones de control. APAP = ratones tratados con paracetamol. STM28 = ratones tratados con el antagonista de TLR4 STM28.

Las figuras 22 a 25 muestran las mediciones en el cerebro de ratas con el conducto biliar ligado (BDL), ratas tratadas de forma simulada (normales) y ratas tratadas con lipopolisacáridos (LPS) y/o norfloxacin (Norflox).

La figura 22 muestra la expresión de proteína TLR4 en cerebro, la figura 23 muestra la inmunohistoquímica de TLR4 en cerebro en A: tratados de forma simulada, B: BDL, C: BDL + Norfloxacin, D: simulado + LPS, E: BDL + LPS, F: BDL + norfloxacin + LPS. La figura 24 muestra los niveles de hidrocefalia y la figura 25 muestra el efecto de norfloxacin (Norflox) y LPS sobre la supervivencia de ratas BDL.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención han descubierto inesperadamente que la expresión del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) se altera en enfermedad hepática y los síntomas y afecciones asociados con enfermedad hepática. En particular, la expresión de TLR4 está asociada con disfunción renal en enfermedad hepática y asociada con la probabilidad de insuficiencia renal en enfermedad hepática.

Los receptores de tipo Toll (TLR) son una clase de proteínas que desempeñan una función clave en el sistema inmunitario innato. Son receptores no catalíticos individuales que abarcan la membrana que reconocen moléculas estructuralmente conservadas derivadas de microbios. Una vez que estos microbios han roto las barreras físicas tales como la piel o la mucosa del tubo intestinal, se reconocen por los TLR que activan las respuestas celulares inmunitarias.

El receptor de tipo Toll 4 es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen *TLR4*. TLR4 detecta lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas y, por tanto, es importante en la activación del sistema inmunitario innato. TLR4 también se ha denominado CD284 (grupo de diferenciación 284).

Los autores de la invención han investigado la expresión de TLR4 en tejidos y órganos de animales que padecen enfermedad hepática o insuficiencia hepática. Han investigado además los efectos de inhibir TLR4 en dichos animales.

Como se describe en los ejemplos, los autores de la invención han descubierto que TLR4 parece desempeñar una función en la patogénesis de insuficiencia multiorgánica en insuficiencia hepática tal como ALF. La administración de un antagonista de TLR4 en un modelo de ALF dio lugar a una reducción en la cantidad de los síntomas clave asociados con insuficiencia hepática, incluyendo una reducción en los niveles de enzimas hepáticas, amoniaco en plasma, hidrocefalia, expresión disminuida de mediadores inflamatorios en órganos clave tales como los riñones y el cerebro, y función renal mejorada. Esto sugiere que TLR4 puede desempeñar una función clave en la mediación de los efectos de la insuficiencia hepática y que antagonizando o inhibiendo TLR4 en un paciente que lo necesite, pueden reducirse estos efectos.

Los autores de la invención también han descubierto que TLR4 puede desempeñar una función particular en el riñón y el cerebro.

Se había creído previamente que los riñones eran normales en síndrome hepatorenal (HRS) y que el HRS estaba causado por factores hemodinámicos causados por la enfermedad hepática, en lugar de algún defecto en los propios riñones. Los autores de la invención han descubierto inesperadamente que la expresión del TLR4 está aumentada en el riñón en un modelo de cirrosis y está más aumentada en un modelo de cirrosis con inflamación aumentada. La expresión de TLR4 se disminuye en dichos modelos si, por ejemplo, las bacterias intestinales se retiran por tratamiento antibiótico. Los autores de la invención, por lo tanto, proponen que varios pacientes diagnosticados previamente con HRS están padeciendo, de hecho, disfunción renal que está asociada con inflamación o infección.

En cirrosis, se creía que la disfunción cerebral estaba relacionada principalmente con los efectos neurotóxicos del amoníaco. Los autores de la invención han descubierto que la expresión del receptor de tipo Toll 4 está regulada por aumento en el cerebro en un modelo de roedor de cirrosis. Los autores de la invención, por lo tanto, proponen que varios pacientes previamente diagnosticados con disfunción cerebral relacionada con amoníaco están padeciendo, de hecho, disfunción cerebral que está asociada con inflamación o infección que está mediada mediante el receptor de tipo Toll 4.

La presente invención, por tanto, deriva de los hallazgos de los autores de la invención de la función de TLR4 en enfermedad hepática, particularmente en pacientes que padecen disfunción renal, disfunción cerebral y edema cerebral. La presente invención utiliza estos efectos proponiendo antagonistas de TLR4 como agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento o prevención de dichas afecciones.

Antagonistas de TLR4

La presente invención se refiere a un antagonismo del receptor de tipo Toll 4 (TLR4). Un antagonista de TLR4 puede ser cualquier compuesto o molécula que inhiba o disminuya la actividad, función o cantidad de TLR4. Preferiblemente, el antagonista funciona en el hígado y/o el riñón y/o el cerebro del paciente con insuficiencia hepática. El antagonista puede actuar preferentemente en el hígado y/o riñón o puede actuar en varias ubicaciones incluyendo el hígado y/o riñón y/o cerebro. Preferiblemente, el antagonista da lugar a una disminución en la actividad, función o cantidad de TLR4 en los órganos de un individuo al que se administra el antagonista, tal como en uno o más del hígado, riñones, cerebro y corazón del individuo. El antagonista puede dirigirse al hígado, riñón u otros órganos tales como los enumerados anteriormente durante la administración que se analiza adicionalmente a continuación.

Los antagonistas preferidos son aquellos que disminuyen la actividad o cantidad de TLR4 en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % en comparación con la cantidad observada en ausencia del antagonista. Por ejemplo, las disminuciones de estos tamaños pueden observarse en el hígado o tejido hepático de un sujeto al que se ha administrado el agonista. Las disminuciones de estos tamaños pueden observarse en otros tejidos u órganos del individuo, tal como en el riñón y/o el corazón del individuo.

Un antagonista de TLR4 puede reducir la actividad o cantidad de TLR4 hasta una cantidad o actividad que es igual, similar a o equivalente a la observada en un individuo que no padece enfermedad hepática. Por ejemplo, como se explica en este documento, se encuentra que la expresión de TLR4 está aumentada en asociación con un modelo de cirrosis. El uso de un antagonista de TLR4 de acuerdo con la presente invención puede dar lugar a una reducción en la expresión de TLR4 en el hígado y/o riñones y/o cerebro del individuo que se está tratando hasta un nivel normal, tal como un nivel que se observaría o se esperaría en un individuo que no padece enfermedad hepática crónica o cirrosis.

El antagonista puede actuar específicamente antagonizando TLR4. Es decir, el efecto del antagonista sobre TLR4 puede ser mayor que cualquier otro efecto biológico del antagonista. Dicho antagonista puede ser específico para la inhibición de TLR4, es decir, puede disminuir la actividad de TLR4, pero no otros receptores tales como otros receptores de tipo Toll. Dicho antagonista, de forma adicional o alternativa, puede ser específico para la expresión de TLR4, es decir, puede disminuir la expresión de TLR4, pero no otros receptores tales como otros receptores de tipo Toll. Un antagonista para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser un antagonista de TLR4 como se describe en este documento, que no actúa como antagonista de otros receptores de tipo Toll. Un antagonista para su uso de acuerdo con la presente invención puede actuar sobre TLR4 en preferencia a otros receptores de tipo Toll. Por ejemplo, un antagonista de TLR4 para su uso de acuerdo con la presente invención puede tener una o más de las características de un antagonista de TLR4 como se describe en este documento, pero puede no tener dichas característica en relación con otros receptores de tipo Toll, o puede tener dichas características a un nivel inferior en relación con otros receptores de tipo Toll en comparación con TLR4. Por ejemplo, un antagonista que disminuye la actividad de TLR4 puede no disminuir la actividad de otros receptores de tipo Toll, o puede disminuir la actividad de otros receptores de tipo Toll a un grado menor, tal como un menor porcentaje de disminución, que su efecto sobre TLR4. Un antagonista que disminuye la expresión o cantidad de TLR4 puede no disminuir la expresión o cantidad de otros receptores de tipo Toll, o puede disminuir la expresión de otros receptores de tipo Toll a un grado menor, tal como un menor porcentaje de disminución, que su efecto sobre TLR4. Un antagonista de TLR4 como se describe en este documento puede tener un efecto sobre otros receptores de tipo Toll, tal como antagonismo de la

actividad, señalización o expresión de uno o más receptores de tipo Toll diferentes, es decir, menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 %, menos de un 5 %, menos de un 1 % o menos de un 0,1 % del efecto de ese antagonista sobre la actividad, señalización o expresión de TLR4.

Mediante otros receptores de tipo Toll en este documento se entiende cualquier receptor de tipo Toll que no sea TLR4. Se han identificado en mamíferos al menos 13 grupos de receptor de tipo Toll. El otro receptor de tipo Toll puede ser cualquiera de dichos receptores de tipo Toll que no sea TLR4. El otro receptor de tipo Toll puede ser uno o más de estos receptores de tipo Toll. El otro receptor de tipo Toll puede ser todos los demás receptores de tipo Toll que no son TLR4.

La especificidad del antagonista de TLR4 puede aplicarse dentro del organismo completo del individuo a tratar, es decir, las acciones del antagonista de TLR4 pueden ser específicas como se analiza anteriormente en todo el organismo del individuo. La especificidad del antagonista de TLR4 puede aplicarse dentro de tejidos particulares del individuo, tal como el hígado riñones y/o corazón y/o cerebro. Es decir, en una realización, el antagonista de TLR4 puede actuar específicamente antagonizando TLR4 como se analiza anteriormente dentro del hígado y/o riñón y/u otros órganos del individuo que se está tratando.

El antagonista de TLR4 puede ser, por lo tanto, un antagonista específico de TLR4 como se describe anteriormente. Por ejemplo, el antagonista de TLR4 puede no ser un antagonista de otros receptores de tipo Toll, o puede no tener efectos significativos sobre la actividad o expresión de otros receptores de tipo Toll.

Cualquier agente que pueda inhibir la actividad o función de TLR4 puede ser adecuado para su uso en los métodos de la presente invención. Los antagonistas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden ser antagonistas directos o indirectos de TLR4.

Los antagonistas directos son agentes cuya actividad es directamente sobre TLR4. Por ejemplo, los antagonistas directos pueden ser agentes que actúan directamente sobre el receptor TLR4 disminuyendo su actividad. Un antagonista directo puede ser un agente que altera la función de TLR4 o que desestabiliza el receptor TLR4. Un antagonista directo puede disminuir la cantidad de TLR4 destruyendo o alterando las moléculas TLR4 dentro del paciente. Un antagonista directo puede ser un agente que actúa sobre el gen de TLR4, promotor u otra región reguladora génica para disminuir la expresión del TLR4. Un antagonista directo puede disminuir la expresión de TLR4 evitando o reduciendo la expresión a partir del gen de TLR4 endógeno.

Un antagonista de TLR4 puede actuar alterando la actividad de TLR4. Por ejemplo, el antagonista puede actuar evitando la activación de TLR4 o y evitando la formación de complejos funcionales que comprenden TLR4.

Puede usarse cualquier agente o molécula que tengan las propiedades descritas anteriormente como antagonista de TLR4 de acuerdo con la presente invención. El agente de ensayo puede ser, o puede comprender, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, polinucleótido, molécula pequeña u otro compuesto que pueda diseñarse mediante diseño racional de fármacos partiendo de antagonistas conocidos de TLR4.

Los ejemplos de antagonistas o inhibidores de TLR4 que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen:

El péptido STM28 como se describe en Sugiyama *et al.* (European Journal of Pharmacology 594 (2008) 152-156);
(6R)-6-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoyl]ciclohex-1-eno-1-carboxilato de etilo (TAK-242) que actúa bloqueando la señalización mediada por el dominio intracelular de TLR4, pero no el dominio extracelular;
[(2R,3R,4R,5S,6R)-4-decoxi-5-hidroxi-6-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-4-[(3R)-3-metoxidecoxi]-6-(metoximetil)-3-[[[Z]-octadec-11-enoyl]amino]-5-fosfonatooxioxan-2-il]oximetil]-3-(3-oxotetradecanoilamino)oxan-2-il]fosfato de tetrasodio (eritorano), que puede proporcionarse como E5564. E5564 contiene eritorano de tetrasodio como ingrediente activo. E5564 bloquea la transducción de señales del receptor e inhibe a liberación de las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF.

NI-0101 es un anticuerpo monoclonal anti-TLR4 que se une a un epítipo en TLR4 que impide su dimerización necesaria para la señalización intracelular y la inducción de rutas proinflamatorias. NI-0101 es un producto de NovImmune SA.

OxPAPC (1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina), es un fosfolípido oxidado que ha demostrado inhibir la señalización inducida por el lipopéptido y lipopolisacárido (LPS) bacteriano.

Compuestos IAXO tales como IAXO-101 (yoduro de 6-desoxi-6-N-dimetil-N-ciclopentilamonio-2,3-di-O-tetradecil- α -D-glucopiranosido de metilo), IAXO-102 6-desoxi-6-amino-2,3-di-O-tetradecil- α -D-glucopiranosido de metilo o IAXO-103 (yoduro de N-(3,4-bis-tetradeciloxi-bencil)-N-ciclopentil-N,N-dimetilamonio)

Los compuestos que abordan TLR tales como TLR4 se revisan en Hennessy *et al.* (2010) Nature Reviews Drug Discovery 9: 293-307.

Preferiblemente el antagonista de TLR4 no es LPS.

El antagonista de TLR4 puede ser una molécula que puede unirse a y prevenir o alterar la actividad de TLR4.

Por consiguiente, un grupo de antagonistas de TLR4 para su uso de acuerdo con esta invención es anticuerpos anti-TLR4. Dicho anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal o puede ser un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno puede ser o comprender un fragmento F(ab)₂, Fab o Fv, es decir, un fragmento de la región "variable" del anticuerpo, que comprende el sitio de unión a antígeno. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de CDR injertada o un anticuerpo humanizado.

Un anticuerpo puede estar dirigido a la molécula TLR4, es decir, puede unirse a epítomos presentes en TLR4 y, por tanto, unirse selectiva y/o específicamente a TLR4. Un anticuerpo puede estar dirigido a otra molécula que está implicada en la expresión y/o actividad de TLR4. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo policlonal que tiene un efecto de amplio espectro contra uno o más epítomos en TLR4 y/o una o más moléculas diferentes que están implicadas en la expresión y/o actividad de TLR4.

Los anticuerpos pueden producirse por cualquier método adecuado. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Por ejemplo, un anticuerpo puede producirse generando anticuerpo en un animal hospedador contra el polipéptido completo o un fragmento del mismo, por ejemplo, un epítipo antigénico del mismo, en este documento después del "inmunoógeno".

Un anticuerpo, u otro compuesto, "se une específicamente" a una molécula cuando se une con afinidad preferente o elevada a la molécula para la que es específica, pero no se une sustancialmente o se une con afinidad únicamente baja a otras moléculas. Una diversidad de protocolos para unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos para determinar la capacidad de unión específica de un anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993). Dichos inmunoensayos típicamente implican la formación de complejos entre la proteína específica y su anticuerpo y la medición de la formación de complejos.

El antagonista de TLR4 puede ser un oligonucleótido de antisentido, tal como un oligonucleótido de antisentido contra el gen que codifica una proteína TLR4. La expresión "oligonucleótido de antisentido", como se usa en este documento, significa una secuencia de nucleótidos que es complementaria al ARNm para un gen deseado. Dicho oligonucleótido de antisentido puede hibridar selectivamente con el gen deseado. En el contexto de la presente invención, el gen deseado puede ser el gen que codifica TLR4.

El antagonista de TLR4 puede modular la expresión del gen de TLR4. Por ejemplo, el antagonista de TLR4 puede ser una molécula de ácido nucleico interferente corto (ARNic), ARN bicatenario (ARNbc) microARN, interferencia de ácido nucleico de desoxirribosa (iADN) o molécula de ARN de horquilla corta (ARNhc).

La expresión "hibrida selectivamente", como se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un ácido nucleico de unirse de forma detectable y específica a un segundo ácido nucleico. Los oligonucleótidos hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para conseguir condiciones de hibridación selectivas conocidas en la técnica. Típicamente, las condiciones de hibridación y lavado se realizan a alta rigurosidad de acuerdo con procedimientos de hibridación convencionales. Las condiciones de lavado típicamente son SSC 1-3x, SDS al 0,1-1 %, 50-70 °C con un cambio de solución de lavado después de aproximadamente 5-30 minutos.

El antagonista de TLR4 puede ser una molécula de ácido nucleico tal como una molécula de antisentido o un aptámero. La molécula de ácido nucleico puede unirse a una molécula diana específica.

Los aptámeros pueden genomanipularse completamente *in vitro*, se producen fácilmente por síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca a ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Estas características los hacen particularmente útiles en herramientas farmacéuticas y terapéuticas.

Las expresiones "molécula de ácidos nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en este documento y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un ácido nucleico puede comprender bases convencionales, restos de azúcar y enlaces internucleotídicos, pero también puede comprender bases modificadas, restos de azúcar modificados o enlaces modificados. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria.

En general, los aptámeros pueden comprender oligonucleótidos que son de al menos 5, al menos 10 o al menos 15 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden comprender secuencias que son de hasta 40, hasta 60 o hasta 100 o más nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los aptámeros pueden ser de 5 a 100 nucleótidos, de 10 a 40 nucleótidos o de 15 a 40 nucleótidos de longitud. Cuando es posible, se prefieren aptámeros de longitud más corta ya que estos a menudo darán lugar a menor interferencia por otras moléculas o materiales.

Los aptámeros pueden generarse usando métodos rutinarios tales como el procedimiento de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento EXonential (SELEX). SELEX es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana. Se describe en, por ejemplo, los documentos US 5654151, US 5503978, US 5567588 y WO 96/38579. El método SELEX implica la selección de aptámeros de ácidos nucleico y en particular ácidos nucleicos monocatenarios que pueden unirse a una diana deseada, de una colección de oligonucleótidos. Una colección de ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ADN, ARN o variantes de los mismos) se pone en contacto con una diana, en condiciones favorables para la unión, aquellos ácidos nucleicos que se unen a las dianas en la mezcla se separan de aquellos que no se unen, los complejos de ácidos nucleico-diana se disocian, aquellos ácidos nucleicos que se habían unido a la diana se amplifican para producir una colección o banco que está enriquecido en ácidos nucleicos que tienen la actividad de unión deseada y después esta serie de etapas se repite según lo necesario para producir una colección de ácidos nucleicos (aptámeros) que tienen afinidad de unión específica por la diana relevante.

Cualquiera de los antagonistas descritos en este documento, por lo tanto, puede usarse para antagonizar TLR4, es decir, para disminuir la cantidad de TLR4 que está presente, y/o la actividad o la función del TLR4. Preferiblemente, estos efectos antagonistas tienen lugar en el hígado y/o riñón y/o cerebro.

Un antagonista de TLR4 puede ser un agente que disminuye la producción de TLR4 endógeno. Por ejemplo, el agente puede actuar dentro de las células del sujeto inhibiendo o evitando la expresión de TLR4. Dicho agente puede ser un factor de transcripción o potenciador que actúa sobre el gen de TLR4 inhibiendo o evitando la expresión génica.

Preferiblemente, el antagonista de TLR4 es un agente que puede reducir la lesión y/o disfunción orgánica causada por la administración de una hepatotoxina, tal como acetaminofeno. Por ejemplo, esta capacidad puede ensayarse en un modelo animal adecuado, tal como un animal no humano (por ejemplo, un ratón o rata), que se trata con dicha hepatotoxina. Pueden evaluarse los efectos del antagonista de TLR4 potencial sobre dicho animal. El antagonista de TLR4 puede administrarse antes de, al mismo tiempo que o después de la administración de la hepatotoxina al animal. Los efectos de la hepatotoxina en presencia del antagonista pueden compararse con los efectos de la hepatotoxina en ausencia del antagonista de TLR4, por ejemplo, en un animal tratado con vehículo. Un antagonista de TLR4 adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención puede reducir la lesión o disfunción orgánica en el animal en comparación con lo observado en ausencia del antagonista de TLR4. Esta lesión o disfunción reducida puede caracterizarse usando cualquiera de los criterios analizados adicionalmente en este documento, tal como una reducción en las enzimas hepáticas, una reducción en los niveles plasmáticos de creatinina y/o amoníaco, una alteración en los niveles de modulador de la inflamación tales como los niveles de NF6B o TNF γ , una reducción en el nivel de interleucina 1a en el hígado, una disminución en la hidrocefalia, una disminución en el daño tisular en el órgano u otras características de lesión o disfunción orgánica que se esperaría que se produjeran por el tratamiento con una hepatotoxina. El órgano puede ser, por ejemplo, el hígado, el riñón, el corazón y/o el cerebro. Se esperaría que un antagonista de TLR4 adecuado tuviera dichos efectos mejorados en comparación con los efectos que se observan con la administración de la hepatotoxina en ausencia del antagonista de TLR4.

Métodos de cribado

Se describe métodos para la identificación de agentes adecuados para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad hepática o de disfunción renal o de insuficiencia renal, o disfunción cerebral y edema cerebral, asociados con enfermedad hepática. Por ejemplo, se describen métodos para la identificación de antagonistas de TLR4 que son adecuados para su uso en el tratamiento de enfermedad hepática, tal como en el tratamiento o prevención de disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática. Los antagonistas identificados por este método pueden ser antagonistas de TLR4 que tienen cualquiera de las características o efectos descritos anteriormente. Los antagonistas identificados por los métodos descritos en este documento pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad hepática o en el tratamiento o prevención de cualquiera de las afecciones o síntomas descritos en este documento, tal como disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática.

Por consiguiente, se describe un método de identificación de un agente para su uso en el tratamiento o prevención de disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática, comprendiendo el método determinar si un agente de ensayo puede disminuir la actividad o expresión de TLR4. Por ejemplo, el método puede implicar la determinación de si un agente de ensayo puede disminuir la cantidad o actividad de TLR4, en el que la capacidad de disminuir la cantidad o actividad de TLR4 indica que el compuesto puede ser adecuado para su uso en el tratamiento o prevención de disfunción renal o

insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática como se describe en este documento.

Un agente de ensayo para su uso en un método de cribado se refiere a cualquier compuesto, molécula o agente que pueda antagonizar potencialmente TLR4. El agente de ensayo puede ser, o puede comprender, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, polinucleótido, molécula pequeña u otro compuesto que pueda diseñarse mediante diseño racional de fármacos partiendo de antagonistas conocidos de TLR4.

El agente de ensayo puede ser cualquier agente que tenga una o más características de un antagonista de TLR4 como se describe anteriormente.

El agente de ensayo a cribar podría obtenerse o sintetizarse de composiciones químicas o compuestos fabricados de forma artificial. Los agentes candidatos pueden obtenerse mediante una amplia diversidad de fuentes incluyendo colecciones de compuestos sintéticos o naturales. Los agentes de ensayo adecuados que pueden ensayarse en los ensayos anteriores incluyen compuestos derivados de colecciones combinatorias, colecciones de moléculas pequeñas y colecciones de productos naturales, tales como colecciones de presentación (por ejemplo, presentación en fagos). Pueden cribarse múltiples agentes de ensayo usando un método para identificar uno o más agentes que tienen un efecto adecuado sobre TLR4, tal como inhibición de la actividad o expresión de TLR4.

Los métodos de cribado pueden realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. En particular, la etapa de contacto de un agente de ensayo con TLR4 o con una célula o tejido que comprende TLR4 puede realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los métodos de cribado pueden realizarse en un sistema basado en células o sin células. Por ejemplo, el método de cribado puede comprender una etapa de contacto de una célula o tejido que comprende TLR4 con un agente de ensayo y determinar si la presencia del agente de ensayo da lugar a una disminución en la cantidad o actividad de TLR4 en la célula o tejido.

Por ejemplo, puede ensayarse la capacidad de un agente de ensayo de disminuir la actividad o expresión de TLR4 en una célula hospedadora o tejido que expresa TLR4. Por ejemplo, la cantidad o actividad de TLR4 puede evaluarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* en el hígado o en tejido o células derivadas del hígado o riñón.

En dicho ensayo basado en células, el TLR4 y/o el agente de ensayo pueden ser endógenos a la célula hospedadora o tejido, pueden introducirse en una célula hospedadora o tejido, o pueden introducirse en la célula hospedadora o tejido causando o permitiendo la expresión de una construcción de expresión o vector o pueden introducirse en la célula hospedadora o tejido estimulando o activando la expresión a partir de un gen endógeno en la célula.

En dicho método basado en células, la cantidad de TLR4 puede evaluarse en presencia o ausencia de un agente de ensayo para determinar si el agente está alterando la cantidad de TLR4 en la célula o tejido, tal como mediante regulación de la expresión de TLR4 en la célula o tejido o mediante desestabilización de la proteína TLR4 dentro de la célula o tejido. La presencia de una actividad TLR4 inferior o una cantidad disminuida de TLR4 dentro de la célula o tejido en presencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo puede ser un antagonista adecuado de TLR4 para su uso de acuerdo con la presente invención en el tratamiento de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con ACLF.

En un aspecto, dicho ensayo basado en células puede realizarse *in vitro* o *ex vivo* en células o tejido que se obtienen del paciente a tratar. Por lo tanto, puede determinarse si el agente de ensayo puede disminuir o no la actividad o cantidad de TLR4 en las células o tejido de ese sujeto. Por ejemplo, dicho método puede realizarse en una muestra de células o tejido del hígado o riñón del paciente.

Un método puede usar un ensayo sin células. Por ejemplo, el TLR4 puede estar presente en un entorno sin células. Un ensayo sin células adecuado puede realizarse en un extracto celular. Por ejemplo, las etapas de contacto de los métodos pueden realizarse en extractos obtenidos de células que pueden expresar, producir o contener de otro modo TLR4 y/o un agente de ensayo. Un sistema sin células que comprende TLR4 puede incubarse con los otros componentes de los métodos y dicho agente de ensayo.

En dicho método sin células, la cantidad de TLR4 puede evaluarse en presencia o ausencia de un agente de ensayo para determinar si el agente está alterando la cantidad de TLR4 en la célula o tejido, tal como mediante desestabilización de la proteína TLR4. En cualquier caso, la presencia de una actividad TLR4 inferior o una cantidad disminuida de TLR4 en presencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo puede ser un antagonista adecuado de TLR4 para su uso de acuerdo con la presente invención en el tratamiento de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con ACLF.

La etapa o etapas de contacto del método pueden comprender incubación de los diversos componentes. Dichas incubaciones pueden realizarse a cualquier temperatura adecuada, típicamente entre 4 °C y 40 °C. Los periodos de incubación pueden seleccionarse para una actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar un rápido cribado de alto rendimiento. Después del contacto y las etapas de incubación opcionales, los presente

métodos pueden incluir además una etapa de lavado para eliminar los componentes no unidos, donde dicha etapa de lavado generalmente se emplea cuando se requiere eliminar el marcador que daría lugar a una señal de fondo durante la detección, tal como componentes unidos de forma no específica marcados de forma radiactiva o fluorescente.

5 La incubación en sistemas celulares o sin células puede realizarse en una placa de microvaloración (por ejemplo, una placa de 96 pocillos u otra placa de micropocillos). Además, la incubación puede realizarse de un modo automatizado (por ejemplo, para cribado de alto rendimiento).

10 Un método de cribado puede realizarse *in vivo*. Por ejemplo, un método de cribado puede realizarse en un modelo animal. En dicho modelo *in vivo*, los efectos de un agente de ensayo pueden evaluarse en el hígado, o en otros órganos tales como el riñón o el corazón. Preferiblemente, el animal es un animal no humano tal como una rata. Por ejemplo, un método de cribado puede realizarse en un modelo de rata de conducto biliar ligado como se describe en los ejemplos. Como se muestra en los ejemplos, el ligamiento de conducto biliar en la rata da lugar a un aumento en los niveles de TLR4 en el riñón de la rata. Dicho modelo, por lo tanto, puede ser adecuado para identificar agentes que pueden disminuir los niveles de TLR4. Por consiguiente, el método de cribado puede comprender la etapa de administrar un agente de ensayo a una rata con conducto biliar ligado y determinar si la presencia del agente de ensayo da lugar a una disminución en la cantidad o actividad de TLR4 en el hígado, riñón u otros órganos de la rata.

20 Dicho modelo puede usarse para evaluar los efectos *in vivo* de un agente de ensayo. Por ejemplo, dicho modelo puede usarse para evaluar si el agente de ensayo puede disminuir la actividad o cantidad de TLR4 *in vivo*. En dicho método, puede evaluar la cantidad de TLR4 y/o puede evaluarse la actividad de TLR4. Dicho modelo puede usarse para evaluar si el agente de ensayo puede disminuir la cantidad de TLR4 que se excreta en la orina.

25 También puede usarse un modelo *in vivo* para determinar si el agente de ensayo tiene algún efecto secundario indeseado. Por ejemplo, un método puede comparar los efectos de un agente de ensayo sobre TLR4 con sus efectos sobre otros receptores para determinar si el agente de ensayo es específico.

30 En un modelo *in vivo* como se describe en este documento, o un modelo *in vitro* tal como un modelo de ensayo basado en células o sin células como se describe en este documento, los efectos de un agente de ensayo sobre TLR4 pueden compararse con los efectos del mismo agente sobre otros receptores de tipo Toll. Como se analiza anteriormente, un antagonista de TLR4 preferido para su uso en un método de tratamiento como se describe en este documento puede ser un agente que antagoniza TLR4, pero que no antagoniza otros receptores de tipo Toll. Los métodos de cribado, por tanto, pueden incluir una etapa adicional de evaluación de si el agente de ensayo tiene algún efecto sobre la actividad o cantidad de uno o más receptores de tipo Toll diferentes tales como uno o más receptores de tipo Toll que no son TLR4. En dicho método, un agente de ensayo puede identificarse como un antagonista de TLR4 adecuado si se encuentra que disminuye la actividad o cantidad de TLR4, pero no disminuye, no disminuye significativamente, no altera o no altera significativamente, la actividad o cantidad de uno o más receptores de tipo Toll diferentes en el mismo ensayo.

40 Cuando el ensayo se realiza *in vivo*, por ejemplo, en un modelo de rata de conducto biliar ligado como se describe en este documento, dicho método puede comprender la comparación de la cantidad o actividad de TLR4 en el hígado, riñón u otros órganos del animal de ensayo en presencia o ausencia del agente de ensayo. Una observación de que el nivel o actividad de TLR4 está disminuido en el hígado, riñón u otros órganos de animales tratados con el agente de ensayo sugiere que el agente de ensayo puede ser un antagonista adecuado de TLR4. Un hallazgo adicional de que el tratamiento con el mismo agente de ensayo no disminuye significativamente o altera los niveles o actividad de uno o más receptores de tipo Toll diferentes, puede indicar además que el agente de ensayo es un antagonista específico adecuado de TLR4 que puede usarse en los métodos de tratamiento descritos en este documento.

50 En los métodos de cribado descritos en este documento, la presencia de una actividad TLR4 inferior o una cantidad disminuida de TLR4 en presencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo puede ser un antagonista adecuado de TLR4 para su uso de acuerdo con la presente invención para tratar a un individuo que tiene ACLF, tal como para tratar o prevenir la disfunción renal o insuficiencia renal asociada con ACLF.

55 Un agente de ensayo que es un antagonista de TLR4 puede provocar una disminución en la actividad o niveles de TLR4 de al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 75 % o al menos un 85 % o más en presencia del agente de ensayo en comparación con la ausencia del agente de ensayo. Un agente de ensayo que es un antagonista de TLR4 puede provocar una disminución en la actividad o niveles de TLR4 de modo que la actividad o nivel de TLR4 ya no es detectable en presencia del agente de ensayo. Dicha disminución puede observarse en la muestra que se está ensayando o, por ejemplo, cuando el método se realiza en un modelo animal, en particular, tejido del animal tal como el hígado o riñón.

65 Un agente de ensayo que es un antagonista de TLR4 puede ser un antagonista específico o selectivo de TLR como se describe anteriormente. Por ejemplo, el agente puede tener un efecto sobre otros receptores de tipo Toll, tal como antagonismo de la actividad, señalización o expresión de uno o más receptores de tipo Toll diferentes, que es de

menos de un 25 %, menos de un 20 %, menos de un 15 %, menos de un 10 %, menos de un 5 %, menos de un 1 % o menos de un 0,1 % del efecto de ese agente sobre la actividad, señalización o expresión de TLR4.

Los niveles o cantidades de TLR4 pueden medirse evaluando la expresión del gen de TLR4. La expresión génica puede evaluarse observando la producción o niveles de ARNm o la producción o niveles de proteína. Los productos de expresión tales como ARNm y proteínas pueden identificarse o cuantificarse por métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos pueden utilizar hibridación para identificar específicamente el ARNm de interés. Por ejemplo, dichos métodos pueden implicar estrategias de PCR o PCR en tiempo real. Los métodos para identificar o cuantificar una proteína de interés pueden implicar el uso de anticuerpos que se unen a esa proteína. Por ejemplo, dichos métodos pueden implicar transferencia de Western. La regulación de la expresión génica de TLR4 puede compararse en presencia y ausencia de un agente de ensayo. Por tanto, pueden identificarse agentes de ensayo que disminuyen la expresión génica de TLR4 en comparación con el nivel observado en ausencia del agente de ensayo. Dichos agentes de ensayo pueden ser antagonista adecuados de TLR de acuerdo con la invención.

Los métodos de cribado pueden evaluar la actividad de TLR4. Por ejemplo, dicho método puede realizarse usando leucocitos mononucleares de sangre periférica. Dichas células producirán citocinas tales como TNF α y NF6B en respuesta a estimulación con, por ejemplo, lipopolisacárido (LPS). Por lo tanto, un método de cribado puede comprender la combinación de leucocitos mononucleares de sangre periférica con el agente de ensayo o un vehículo y la adición de LPS. Las células entonces pueden incubarse durante una cantidad de tiempo (por ejemplo, 24 horas) para permitir la producción de moléculas inflamatorias tales como citocinas. El nivel de citocinas tales como TNF α o NF6B producidas por las células en ese periodo de tiempo puede evaluarse después. Si el agente de ensayo tiene propiedades anti-TLR4, entonces la producción de dichas citocinas o NF6B debe estar reducida en comparación con las células tratadas con vehículo.

También pueden realizarse ensayos adicionales para confirmar que el agente de ensayo es adecuado para su uso en los métodos reivindicados. Por ejemplo, como se explica anteriormente, un antagonista adecuado de TLR4 debe poder reducir las consecuencias perjudiciales del tratamiento con una hepatotoxina tal como acetaminofeno (paracetamol). Los métodos de cribado, por lo tanto, pueden incorporar etapas adicionales, tales como las analizadas anteriormente, que implican evaluar el efecto del agente de ensayo en un animal tratado con dicha hepatotoxina y determinar si los efectos de esa hepatotoxina, tal como en lesión o disfunción de órganos tales como el hígado, riñón o cerebro, se reducen en presencia del agente de ensayo en comparación con lo observado con el tratamiento con la hepatotoxina en solitario. Un antagonista de TLR4 adecuado podrá mejorar al menos algunos de los efectos de la hepatotoxina en el animal de ensayo.

Formulaciones farmacéuticas

Un antagonista de TLR4 adecuado como se describe en este documento se formula típicamente para su administración con un vehículo diluyente farmacéuticamente aceptable. El antagonista puede ser cualquier antagonista como se define en este documento, que incluye cualquier antagonista identificado por un método de cribado de la invención. El antagonista, por tanto, puede formularse como un medicamento con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales, como es rutinario en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de la formulación dependerá de varios factores, incluyendo la vía deseada de administración. Típicamente, el antagonista puede formularse para administración oral, intravenosa, intragástrica, intravascular o intraperitoneal.

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

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

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

Cuando el antagonista a administrar es una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, cuando el antagonista está en forma de un vector de expresión, también pueden incluirse determinados facilitadores de la captación de ácido nucleico y/o la expresión ("agentes facilitadores de la transfección") en las composiciones, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos facilitadores de la transfección tales como preparaciones liposómicas o lipídicas que se usan de forma rutinaria para suministrar moléculas de ácido nucleico.

Una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, la formulación puede comprender uno o más antagonistas de TLR4 como se define en este documento. La formulación puede comprender uno o más antagonistas de TLR4 como se describe en este documento y también uno o más agentes terapéuticos adicionales. Preferiblemente, el uno o más agentes terapéuticos adicionales son agentes que ayudarán en el tratamiento o profilaxis del individuo a tratar. Por ejemplo, puede administrarse uno o más agentes que son eficaces en el tratamiento de enfermedad hepática, como parte de una formulación como se describe en este documento. Puede administrarse uno o más agentes que son eficaces en el tratamiento de una afección hepática subyacente o síntoma de la misma en el paciente, como parte de una formulación como se describe en este documento.

Tratamiento

La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de individuos que tienen ACLF, particularmente para el tratamiento o prevención de síntomas y afecciones asociados con o resultantes de insuficiencia hepática o cirrosis tal como disfunción renal o insuficiencia renal. Se divulga un método de tratamiento de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y/o edema cerebral asociado con enfermedad hepática, que comprende administrar a dicho sujeto un antagonista de TLR4. Asimismo, un antagonista de TLR4 tiene que proporcionarse para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con ACLF. También se divulga el uso de un antagonista de TLR4 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática.

El antagonista puede ser cualquier antagonista como se describe en este documento, incluyendo cualquier antagonista identificado por un método de cribado. El antagonista puede proporcionarse en una formulación como se describe en este documento. Un antagonista de TLR4 como se describe en este documento se administra, por tanto, a un sujeto para tratar o prevenir la disfunción renal o insuficiencia renal asociada con ACLF, o síntomas particulares o afecciones asociadas con disfunción renal o insuficiencia renal o disfunción cerebral y edema cerebral en el sujeto. Un antagonista de TLR4 como se describe en este documento, por tanto, puede administrarse para mejorar la afección de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que padece enfermedad hepática, cirrosis, disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o sobredosis de paracetamol o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática o sobredosis de paracetamol. Un antagonista de TLR4 como se describe en este documento puede administrarse para aliviar los síntomas de un sujeto, por ejemplo, los síntomas asociados con enfermedad hepática, cirrosis, disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática o sobredosis de paracetamol o disfunción cerebral y edema cerebral asociados con enfermedad hepática o sobredosis de paracetamol. Un antagonista de TLR4 como se describe en este documento puede administrarse para combatir o retardar la aparición de hipertensión portal o cualquier síntoma asociado con la misma, tal como varices. La invención, por lo tanto, puede prevenir las consecuencias médicas de cirrosis. El uso de un antagonista de TLR4 como se describe en este documento, por tanto, puede prolonga la vida de un paciente con enfermedad hepática o insuficiencia hepática.

El tratamiento de enfermedad hepática, o el tratamiento de un individuo que tiene enfermedad hepática, como se describe en este documento, se refiere al tratamiento de un individuo que tiene enfermedad hepática. El individuo puede estar padeciendo insuficiencia hepática, tal como insuficiencia hepática aguda (ALF). El individuo está padeciendo insuficiencia hepática crónica agudizada (ACLF). El individuo puede estar padeciendo enfermedad hepática crónica tal como cirrosis o cirrosis alcohólica. El paciente puede estar padeciendo enfermedad hepática o cirrosis asociada con o causada por una infección tal como infección vírica de hepatitis tal como infección vírica de hepatitis C. El paciente puede estar padeciendo enfermedad hepática o cirrosis asociada con o causada por el tratamiento con una hepatotoxina tal como acetaminofeno (paracetamol). Los métodos descritos en este documento pueden usarse en el tratamiento de cualquiera de dichas enfermedades.

El individuo puede estar padeciendo uno o más síntomas o afecciones causados por o asociados con ACLF. Cualquiera de una o más de estas afecciones o síntomas puede tratarse de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el individuo puede estar padeciendo, o estar en riesgo de, uno o más de los siguientes, como resultado de su ACLF: disfunción renal; insuficiencia renal; HRS; creatinina plasmática aumentada; disfunción cerebral y edema cerebral; amoniaco plasmático aumentado; concentraciones hepáticas aumentadas de enzimas (tal como concentraciones aumentadas de ALT y/o AST en el hígado); inflamación aumentada, lesión y/o disfunción en el hígado y/o riñón y/o cerebro y/o circulación sanguínea; daño en el tejido hepático debido a insuficiencia hepática, tal como resultado de toxicidad con acetaminofeno (APAP). El individuo puede estar padeciendo, o estar en riesgo de insuficiencia hepática aguda, hepatitis alcohólica y/o lesión por reperfusión del hígado. Esas afecciones pueden

resultar de la ACLF del individuo. Los métodos y usos descritos en este documento pueden ser de utilidad en el tratamiento o prevención de uno cualquiera o más de estos síntomas o afecciones, particularmente, en un individuo que está padeciendo enfermedad hepática.

En particular, los métodos descritos en este documento pueden usarse en el tratamiento de un paciente que tiene disfunción renal como resultado de ACLF. Por ejemplo, el paciente puede tener o estar en riesgo de insuficiencia renal. El paciente puede tener cirrosis. El paciente puede no tener HRS. Por ejemplo, el paciente puede no tener flujo sanguíneo renal reducido. La ACLF y/o disfunción renal pueden resultar de una infección y/o inflamación. La ACLF y/o disfunción renal pueden resultar de exposición a una hepatotoxina tal como acetaminofeno (paracetamol) tal como exposición a un alto nivel de la hepatotoxina, tal como una sobredosis con paracetamol. Los métodos descritos en este documento pueden usarse para tratar o prevenir cualquiera de estas afecciones o síntomas, particularmente para tratar o prevenir la disfunción renal resultante de dicha afección o exposición.

Como se describe en ese documento, el antagonista de TLR4 puede dar lugar a expresión disminuida y/o niveles disminuidos de TLR4 en el hígado y/o riñón del sujeto. Por ejemplo, el antagonista puede ser un agente que inhibe la transcripción de TLR4 en células del sujeto.

Como se describe en este documento, el antagonista de TLR4 puede dar lugar a actividad disminuida de TLR4 en el hígado y/o riñón del individuo.

El sujeto se trata con un antagonista de TLR4 como se describe en este documento. Como se describe anteriormente, el antagonista de TLR4 puede administrarse en solitario o en forma de una formulación farmacéutica. La formulación puede comprender uno o más antagonistas de TLR4 y puede comprender uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales.

Pueden usarse dos o más antagonistas de TLR4 diferentes como se describe en este documento en combinación para tratar un sujeto. Los dos o más antagonistas pueden administrarse juntos, en una única formulación, al mismo tiempo, en dos o más formulaciones diferentes, o por separado o secuencialmente como parte de un régimen de administración combinado.

Un antagonista o formulación de la invención puede administrarse por cualquier vía adecuada. Preferiblemente, se administra por vía oral, intravenosa, intragástrica, intraperitoneal o intravascular. El antagonista o formulación puede administrarse directamente al hígado del sujeto.

El antagonista se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una dosis adecuada de un antagonista de la invención puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros tales como la edad, peso y estado del sujeto a tratar; el tipo y gravedad de la enfermedad hepática, la vía de administración; y el régimen requerido. Una dosis adecuada puede determinarse para un antagonista individual. Por ejemplo, para algunos antagonistas, una dosis típica puede ser del orden de 0,1 mg/kg/día a 30 g/kg/día. Un médico podrá determinar la dosificación requerida de antagonista y para cualquier sujeto particular.

La presente invención es ampliamente aplicable a métodos terapéuticos y es relevante para el desarrollo de tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Debe apreciarse que todas las referencias de este documento a tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

La profilaxis o tratamiento incluye, aunque sin limitación, provocar una disminución eficaz en la cantidad, función o actividad de TLR4 para causar una reducción en uno o más síntomas o afecciones asociados con, o resultantes de, enfermedad hepática, insuficiencia hepática o cirrosis, tal como disfunción renal o insuficiencia renal o disfunción cerebral y/o edema cerebral. Los síntomas o afecciones pueden ser, por ejemplo, cualquiera de los analizados anteriormente. Por ejemplo, la profilaxis o tratamiento puede provocar: síntomas reducidos de disfunción renal, prevención o síntomas reducidos de insuficiencia hepática, niveles reducidos de creatinina plasmática, amoniaco plasmático, concentraciones hepáticas de enzimas (tales como concentraciones reducidas de ALT y/o AST en el hígado), inflamación reducida en el hígado y/o riñón y/o cerebro y/o circulación sanguínea, y/o una reducción en el daño de tejido hepático resultante de insuficiencia hepática, tal como resultante de toxicidad con acetaminofeno (APAP). La profilaxis o tratamiento puede provocar el mantenimiento de un nivel particular de disfunción renal, insuficiencia renal, creatinina plasmática, disfunción cerebral y/o edema cerebral, amoniaco plasmático, concentraciones hepáticas de enzimas (tales como concentraciones de ALT y/o AST en el hígado), inflamación en el hígado y/o riñón y/o cerebro y/o circulación sanguínea, y/o daño en el tejido hepático resultante de insuficiencia hepática, tal como resultante de toxicidad por acetaminofeno (APAP), en un paciente donde dichos síntomas han estado aumentando o se espera que aumenten como resultado de la enfermedad hepática, insuficiencia hepática y/o cirrosis. La profilaxis o tratamiento puede provocar dichos cambios en síntomas o afecciones en dicho individuo, cambiando una tasa reducida en comparación con los cambios que se habrían observado o se habrían esperado en ausencia de dicho tratamiento.

La profilaxis o tratamiento puede tener efectos similares en relación a cualquiera de los síntomas o consecuencias de enfermedad hepática, insuficiencia hepática o cirrosis descrito en este documento. Es decir, el tratamiento de

acuerdo con la presente invención puede dar lugar a una reducción en la gravedad de dichos síntomas o consecuencias, el mantenimiento de un nivel existente de dichos síntomas o consecuencias o una ralentización o reducción en el empeoramiento de dichos síntomas o consecuencias.

5 Pacientes a tratar

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de disfunción renal o insuficiencia renal en individuos que los necesitan. Un individuo a tratar de acuerdo con la presente invención tiene ACLF, y puede tener enfermedad hepática tal como cirrosis o puede estar en riesgo aumentado de enfermedad hepática tal como cirrosis. El sujeto puede tener insuficiencia renal o disfunción cerebral y/o edema cerebral.

Los métodos para diagnosticar insuficiencia hepática, disfunción renal, disfunción cerebral, edema cerebral o HRS son bien conocidos en la técnica y en particular por los médicos y veterinarios del campo. Por ejemplo, la disfunción renal y HRS se caracterizan por una reducción o pérdida de función renal, que puede evaluarse controlando el volumen de orina, o la concentración de sodio y la osmolalidad de la orina. El HRS también está asociado con una reducción en el flujo sanguíneo renal. Preferiblemente, el sujeto se diagnosticará con insuficiencia renal y/o HRS, por ejemplo, por un médico o veterinario profesional. El sujeto puede presentar uno o más síntomas asociados con insuficiencia hepática, disfunción renal o insuficiencia renal.

El individuo a tratar puede tener expresión aumentada de TLR4 en el hígado y/o riñón en comparación con un individuo sano, tal como un individuo que no tienen enfermedad hepática o disfunción renal. El individuo a tratar puede tener expresión aumentada de TLR4 en los túbulos renales en comparación con un individuo sano, tal como un individuo que no tiene enfermedad hepática o disfunción renal. El individuo a tratar puede tener TLR4 aumentado en la orina en comparación con un individuo sano, tal como un individuo que no tiene enfermedad hepática o disfunción renal.

Un paciente puede identificarse como adecuado para tratamiento como se describe en este documento por un método que comprende medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente y comparar el nivel de TLR4 en la orina con el nivel de TLR4 en la orina de un individuo sano, tal como un individuo que no tiene enfermedad hepática o disfunción renal. En dicho método, un nivel aumentado de TLR4 en la orina indica que el paciente puede ser adecuado para tratamiento de acuerdo con la presente invención.

El individuo a tratar puede haberse diagnosticado de insuficiencia hepática aguda, cirrosis, disfunción renal y/o insuficiencia renal, o uno o más síntomas o afecciones como se describe en este documento que pueden estar asociadas con dichas afecciones, por ejemplo, por cualquiera de estos métodos. El individuo a tratar puede haberse diagnosticada en riesgo de insuficiencia hepática, cirrosis, disfunción renal y/o insuficiencia renal o dichos síntomas o afecciones. Por ejemplo, el individuo puede haberse diagnosticado con uno o más síntomas que están asociados con insuficiencia hepática, cirrosis, insuficiencia renal y/o insuficiencia renal. Por ejemplo, el individuo a tratar puede tener cirrosis hepática, hepatitis alcohólica, hipertensión portal no cirrótica idiopática, fibrosis hepática congénita, transformación nodular parcial, síndrome de Budd-Chiari, trombosis de la vena porta, insuficiencia cardíaca derecha o infección por esquistosomiasis.

El sujeto a tratar puede ser cualquier individuo que sea susceptible a enfermedad hepática tal como insuficiencia hepática. El sujeto puede ser de género masculino o femenino. Las mujeres pueden ser más susceptibles a los efectos adversos del alcohol que los hombres. Las mujeres pueden desarrollar enfermedad hepática crónica en un tramo de tiempo más corto y por cantidades más pequeñas de alcohol que los hombres.

El sujeto a tratar puede ser un ser humano. El sujeto a tratar puede ser un animal no humano. El sujeto a tratar puede ser un animal de granja, por ejemplo, una vaca o toro, oveja, cerdo, buey, cabra o caballo o puede ser un animal doméstico tal como un perro o un gato. El sujeto puede ser o no un modelo animal de enfermedad hepática. El animal puede ser de cualquier edad, pero a menudo será un sujeto adulto maduro.

Biomarcadores para diagnóstico

Como se explica anteriormente, la presente invención se refiere a disfunción renal, en pacientes que padecen ACLF.

El indicador más habitualmente usado de la función renal es medir el nivel de creatinina en la sangre. Sin embargo, una elevación en el nivel sanguíneo de creatinina se observa únicamente con daño notable a las nefronas en funcionamiento. Por lo tanto, este ensayo no es adecuado para detectar enfermedad renal en las primeras fases. Por lo tanto, existe una necesidad de un ensayo alternativo que pueda usarse para identificar la enfermedad renal en las primeras fases.

Como se presenta en los ejemplos, los autores de la invención han descubierto inesperadamente que hay cambios detectables en los riñones en individuos que tienen disfunción renal asociada con enfermedad hepática tal como cirrosis. Esto significa que puede ser posible detectar la enfermedad renal, tal como disfunción renal o insuficiencia renal en una fase muy anterior de lo que es posible controlando los niveles de creatinina en plasma. Los autores de

la invención han descubierto que la aparición de disfunción renal está asociada con la expresión de TLR4 en el riñón, particularmente la expresión tubular de TLR4 y también está asociada con daños a los túbulos proximales del riñón. Los autores de la invención también han descubierto que los niveles de TLR4 en la orina aumentan en dichos pacientes. Además, los niveles de TLR4 en la orina son incluso mayores en pacientes que van a padecer insuficiencia renal. Cualquiera de estos factores puede usarse para detectar o predecir una enfermedad renal tal como disfunción renal o insuficiencia renal, en un individuo como se describe en este documento que está padeciendo o está en riesgo de enfermedad hepática o insuficiencia hepática. Por ejemplo, estos factores pueden usarse para detectar insuficiencia renal o un riesgo aumentado de insuficiencia renal en un individuo en riesgo de ello, tal como un individuo que tiene enfermedad hepática, un individuo que tiene o está en riesgo de insuficiencia hepática o un individuo que tiene cirrosis hepática.

Por consiguiente, se proporciona un método para la detección o predicción de lesión renal, insuficiencia renal en un individuo como se describe anteriormente que está padeciendo ACLF. El individuo puede ser cualquiera de los individuos como se describe anteriormente en el encabezado "pacientes a tratar".

Como se presenta en los ejemplos, los autores de la invención han descubierto que la expresión de TLR4 está aumentada en el riñón, particularmente en los túbulos en pacientes que tienen disfunción renal. Por ejemplo, un método de diagnóstico de la disfunción renal o la insuficiencia renal o de predicción de la insuficiencia renal en un paciente que tiene ACLF puede comprender las etapas de (a) detectar la expresión o el patrón de expresión de TLR4 en el riñón del paciente y (b) comparar el nivel de expresión o el patrón de expresión de (a) con un nivel o patrón de control de la expresión de TLR4 basándose en la expresión de TLR4 encontrada en el riñón de un individuo sano tal como un individuo que no está padeciendo enfermedad hepática o disfunción renal. El método puede comprender medir el nivel o expresión de TLR4 en un riñón del paciente y en el riñón de un individuo de control tal como un individuo sano descrito anteriormente y comparar el nivel o expresión de TLR4 en las dos muestras. El método puede comprender medir el nivel o expresión de TLR4 en el riñón del paciente y comprar el nivel con un nivel o patrón de expresión de control conocido basándose en mediciones previas de un individuo de control o grupo de individuos de control como se describe anteriormente.

En dichos métodos, las mediciones pueden hacerse en una muestra del riñón, tal como una muestra de biopsia de riñón. La muestra del riñón puede comprender una muestra de los glomérulos o los túbulos renales. Dicha muestra puede comprender el borde en cepillo apical de los túbulos renales.

En dichos métodos, un nivel aumentado de la expresión de TLR4 en el riñón del paciente en comparación con el nivel de control indica que el paciente tiene probabilidad aumentada de, un riesgo aumentado de o que el individuo ya padece disfunción renal o insuficiencia renal. Un nivel aumentado de expresión de TLR4 en los túbulos renales del paciente en comparación con el nivel de control indica que el paciente tiene probabilidad aumentada de, un riesgo aumentado de o que el individuo ya padece disfunción renal o insuficiencia renal.

También se proporcionan métodos que utilizan los hallazgos de los autores de la invención de que los niveles de TLR4 en la orina están aumentados en disfunción renal.

Por ejemplo, un método de diagnóstico de disfunción renal o insuficiencia renal o de predicción de insuficiencia renal en un paciente que tiene ACLF puede comprender las etapas de (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente y (b) comparar el nivel de (a) con un nivel de control de TLR4 basándose en el nivel de TLR4 encontrado en la orina de un individuo sano tal como un individuo que no padece enfermedad hepática o disfunción renal. El método puede comprender medir el nivel de TLR4 en una muestra de orina del paciente y en una muestra de orina de un individuo de control tal como un individuo sano descrito anteriormente y comparar los niveles de TLR4 en las dos muestras. El método puede comprender medir el nivel de TLR4 en una muestra de orina del paciente y comparar ese nivel con un nivel de control conocido basándose en mediciones previas de un individuo de control o grupo de individuos de control como se describe anteriormente. En dichos métodos, un nivel aumentado de TLR4 en la orina en el paciente en comparación con el nivel de control indica que el paciente tiene probabilidad aumentada de, un riesgo aumentado de o que el individuo ya padece disfunción renal o insuficiencia renal.

Puede usarse un método adicional para predecir si el paciente tiene probabilidades de padecer insuficiencia renal. Esta información puede usarse por un médico para determinar la manera en que tratar al paciente y controlar su afección. Dicho método puede comprender las etapas de (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente y (b) comparar el nivel de (a) con un nivel conocido de TLR4 basándose en el nivel de TLR4 encontrado en la orina de un individuo de control que padece enfermedad hepática y disfunción renal que no progresó hasta padecer insuficiencia renal. El método puede comprender medir el nivel de TLR4 en una muestra de orina del paciente y en una muestra de orina del individuo de control y comparar los niveles de TLR4 en las dos muestras. El método puede comprender medir el nivel de TLR4 en una muestra de orina del paciente y comparar ese nivel con un nivel de control conocido basándose en mediciones previas de un individuo de control como se describe anteriormente. En dichos métodos, un nivel aumentado de TLR4 en la orina en el paciente en comparación con el nivel de control indica que el paciente tiene probabilidad aumentada de, un riesgo aumentado de o el individuo ya padece insuficiencia renal.

Un nivel aumentado de TLR4 en la orina o de la expresión de TLR4 en estos métodos en comparación con un nivel de control puede ser un aumento estadísticamente significativo en la concentración de TLR4 en la orina o nivel de expresión de TLR4. Un nivel aumentado de TLR4 o expresión de TLR4 en la orina en estos métodos puede ser un aumento de al menos un 15 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 % o más en comparación con un control adecuado. El control puede ser el nivel de TLR4 en la orina de un único individuo de control o puede ser un valor promedio obtenido de un grupo de individuos de control.

El método puede comprender el ensayo de una muestra del individuo para la presencia de uno o más marcadores de insuficiencia renal o descompensación renal. La presencia de dichos marcadores en la muestra del individuo puede indicar que el individuo está padeciendo insuficiencia renal, o que el individuo está en las primeras fases de, o está en riesgo de, insuficiencia renal. Los marcadores pueden ser marcadores asociados con daño a los glomérulos o los túbulos renales. Por ejemplo, si la muestra es una muestra de orina, la muestra puede ensayarse para la presencia de (a) una combinación de IL-18 (interleucina-18) y KIM-1 (molécula 1 de lesión renal) y/o (b) LFABP de orina (proteína de unión a ácido graso hepático). Si la muestra es una muestra de suero, la muestra puede ensayarse para la presencia de uno o más marcadores seleccionados de (a) IL-6 (interleucina-6) y/o IL-10 (interleucina-10) y/o TNF α , (b) MMP-9 (metaloproteinasa 9 de matriz), (c) NAG (N-acetilglucosamina), (d) mieloperoxidasa y (e) glutatión S transferasa. Si hay muestras de suero y orina disponibles, estas dos muestras pueden ensayarse para uno o más de cistatina C, NGAL (lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), osteopontina y beta-2-microglobulina y/o para una combinación de KIM-1 e IL-18. Puede usarse cualquier combinación de estos marcadores, opcionalmente con marcadores adicionales no mencionados específicamente en este documento. Preferiblemente, se evalúan más de uno de los marcadores mencionados anteriormente, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de estos marcadores.

Como se explica anteriormente, el método puede comprender el ensayo de una muestra de riñón del individuo para la expresión de TLR4. La expresión de TLR4 en el riñón del individuo indica que el individuo puede tener insuficiencia renal, o que el individuo puede estar en las primeras fases de, o en riesgo aumentado de, insuficiencia renal.

Los métodos descritos en este documento pueden comprender además el ensayo de una muestra de riñón del individuo para la expresión de uno o más moduladores inflamatorios, tal como NF κ B, IL-6 o TNF α . La expresión de uno o más de dichos moduladores inflamatorios indica que el individuo puede tener insuficiencia renal, o que el individuo puede estar en las primeras fases de, o en riesgo aumentado de, insuficiencia renal.

En los métodos descritos en este documento, la muestra del riñón puede comprender una muestra de los glomérulos o los túbulos renales. La expresión de TLR4 en dicha muestra puede indicar que el individuo tiene insuficiencia renal, o que el individuo puede estar en las primeras fases de, o en riesgo aumentado de, insuficiencia renal. Dicha muestra puede comprender el borde en cepillo apical de los túbulos renales. La expresión de TLR4 en dicha muestra puede indicar que el individuo tiene insuficiencia renal, o que el individuo puede estar en las primeras fases de, o en riesgo aumentado de, insuficiencia renal.

Un método puede comprender evaluar el riñón del paciente, tal como los glomérulos o túbulos renales o el borde en cepillo apical de los túbulos renales proximales, para enfermedad renal. Puede usarse cualquier método adecuado. El método puede realizarse en una muestra del individuo, tal como una muestra de riñón como se describe anteriormente. El método puede realizarse evaluando directamente la estructura o función del riñón, o los túbulos renales proximales, *in vivo*. La presencia de estructura o función anómala, tal como una estructura con enfermedad o dañada o función reducida, puede indicar que el individuo tiene insuficiencia renal o HRS, o que el individuo puede estar en las primeras fases de, o en riesgo aumentado de, insuficiencia renal o HRS.

A un individuo que se ha identificado por cualquiera de dichos métodos que tiene, o está en riesgo de, disfunción renal o insuficiencia renal, se le puede proporcionar entonces tratamiento terapéutico o preventivo apropiado para esa afección. Esto puede permitir el tratamiento adecuado a proporcionar antes de lo que habría sido posible cuando se detecta disfunción renal o insuficiencia renal usando los niveles de creatinina. A un individuo que se ha identificado por cualquiera de estos métodos que tiene, o está en riesgo de, disfunción renal o insuficiencia renal, entonces se le puede tratar por cualquiera de los métodos terapéuticos o profilácticos descritos en este documento.

También puede proporcionarse un método para identificar biomarcadores adecuados adicionales que podrían usarse en los métodos de detección descritos en este documento. Pueden implicar la comparación de muestras obtenidas de individuos que tienen insuficiencia renal o disfunción renal ligada a enfermedad hepática, con muestras obtenidas de un individuo normal o un individuo que no tiene insuficiencia renal o disfunción renal o enfermedad hepática. El método puede implicar la identificación de marcadores que pueden distinguir entre una muestra de un individuo con insuficiencia renal/disfunción hepática y una muestra de un individuo normal.

Un marcador adecuado puede identificarse usando muestras del organismo de interés, tal como muestras de individuos humanos. Un marcador adecuado puede identificarse usando muestras de un modelo animal, tal como la rata con conducto biliar ligado (BDL) o la rata BDL tratada con endotoxina o lipopolisacárido. Dichas muestras

pueden compararse con muestras de una rata normal o tratada de forma simulada.

La muestra puede ser cualquier muestra adecuada que pueda recuperarse fácilmente de un individuo adecuado, tal como una muestra de orina, plasma, suero o sangre. El marcador puede ser una proteína u otra molécula que esté presente en una de las muestras, pero no en la otra muestra, o que esté presente en cantidad significativamente diferentes en las dos muestras, de modo que las muestras puedan distinguirse basándose en esa molécula. Un marcador que se identifica de esta manera como capaz de distinguirse entre los dos tipos de muestra puede usarse en un método como se describe anteriormente para determinar si un individuo, particularmente un individuo que tiene enfermedad hepática tiene o está en riesgo de, o no, insuficiencia renal o disfunción renal. Esto puede conseguirse comparando la presencia, ausencia o cantidad del marcador en una muestra obtenida del individuo de interés con la presencia, ausencia o cantidad conocida de ese marcador en muestras conocidas, y correlacionando de ese modo la muestra del individuo con una muestra de control de un individuo normal o una muestra con enfermedad de un individuo que tiene disfunción renal o insuficiencia renal asociada con enfermedad hepática.

Ejemplos

Ejemplo 1: Función de TLR4 en insuficiencia hepática aguda

Se estudiaron 3 grupos de ratones macho Cdl. Simulado, APAP (acetaminofeno, dosis individual IP de 500 mg/kg después de ayuno de una noche), APAP + antagonista de TLR4 (STM28; 20 µg, 1 hora antes de la administración de APAP y 6 horas después). Se recogió sangre para el ensayo de bioquímica y de citocinas. Se recogió el hígado, el riñón y el cerebro para transferencia de Western y análisis de citocinas y la corteza frontal cerebral para la hidrocefalia. Los animales se sacrificaron a las 12 horas después de la administración de APAP.

La toxicidad por acetaminofeno (APAP) se manifiesta por lesión hepática aguda rápida, edema cerebral grave e insuficiencia renal. La inflamación regulada por aumento en dicho caso da lugar a la liberación de citocinas junto con la activación de NFκB y lesión hepática progresiva. La administración de APAP (500 mg/kg) a los ratones dio lugar a un aumento en las enzimas hepáticas ALT (p=0,004) y AST (p=0,007) (figura 1A). La administración de un antagonista de TLR4 novedoso (STM28) redujo significativamente la ALT (p=0,01) y AST (p=0,008) (figura 1A). La insuficiencia multiorgánica se manifestó por un aumento en el amoníaco y la creatinina (p=0,001 y p=0,004), respectivamente. STM28 redujo significativamente el amoníaco (p=0,03) y la creatinina (p=0,09) (figura 1B). APAP induce la apoptosis y la necrosis, que da lugar a lesión hepática progresiva. NFκB se ha implicado en la mediación del efecto hepatoprotector mediante la ruta de prosupervivencia y la inhibición de la apoptosis. STM28 (antagonista de TLR4) en el grupo de APAP restauró el NFκBp65 en hígado, promoviendo de ese modo la supervivencia de los hepatocitos (figura 2A). En oposición al NFκB en hígado, hubo un aumento de la expresión de NFκBp65 en cerebro y riñón en el grupo de APAP (p=0,02) cada uno. El grupo de APAP tratado con STM28 mostró una reducción en la expresión de proteína NFκBp65 en riñón y cerebro (p=0,02) y (p=0,04) respectivamente (figura 2B). APAP dio lugar a un aumento rápido masivo en los niveles de TNFα en el hígado y en el riñón, que contribuye a los cambios inflamatorios fisiopatológicos. La administración del antagonista de TLR4 (STM28) mejoró esta respuesta hasta un cierto grado tanto en hígado como en riñón (figura 3). Un aumento en TNFα tisular se asoció con una elevación concomitante en los niveles plasmáticos de TNFα en toxicidad por APAP. STM28 anuló esta elevación de TNFα en el grupo de tratamiento (figura 4). ILIA desempeña una función importante en la promoción de la apoptosis y la necrosis. Se encontró una elevación significativa en los niveles de ILIA en el hígado con APAP, este se redujo notablemente en el grupo de APAP tratado con STM28 (figura 5). En pacientes con ALF la inflamación y el edema cerebral progresivo contribuyen al coma. Hubo un aumento en el edema cerebral, averiguado por la medición de la hidrocefalia en el grupo de APAP, esto se revirtió satisfactoriamente en el grupo de APAP tratado con STM28 (figura 6). La toxicidad por acetaminofeno (APAP) dio lugar a necrosis centrilobular profunda como se muestra en la figura 7 portaobjetos b). El tratamiento con STM28 (antagonista de TLR4) redujo notablemente el grado de la lesión como se muestra en la figura 7 portaobjetos c), la figura 7 portaobjetos a) muestra hígado normal para su comparación. Los resultados de este estudio muestran por primera vez una función para TLR4 en la patogénesis de insuficiencia multiorgánica en ALF. Los datos apoyan fuertemente una función terapéutica potencial para el antagonista de TLR4 en la prevención de insuficiencia hepática aguda.

Ejemplo 2: Función de TLR4 en disfunción hepática en enfermedad hepática

Estos experimentos utilizaron un modelo animal establecido de cirrosis, la rata de conducto biliar ligado (BDL). Las ratas BDL pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g) para este procedimiento. Después de anestesiarse, puede realizarse una laparotomía en la línea media, exponerse el conducto biliar, ligarse de forma tripe con sutura de seda 4.0 y seccionarse entre la segunda y la tercera ligadura. La herida entonces se cierra en capas con sutura absorbible y se permite que el animal se recupere en una estancia tranquila antes de devolverse a la instalación de almacenamiento de animales.

Se estudiaron 6 grupos de ratos Sprague-Dawley: n=6 en cada grupo. Operado de forma simulada (estos se usaron como grupo de control que tenían una laparotomía abdominal). Operado de forma simulada + LPS (grupo de control con una dosis adicional de lipopolisacárido (LPS). Ligamiento del conducto biliar (BDL): 4 semanas, un modelo

crónico de BDL a las 4 semanas se ha usado para estudiar el síndrome hepatorenal. BDL + norfloxacina: la norfloxacina es el antibiótico usado habitualmente en el tratamiento de infección de líquido ascítico (peritonitis bacteriana espontánea) en pacientes con cirrosis. BDL + LPS (1 mg/kg): BDL con un mimético adicional (LPS), la disfunción orgánica que se encuentra habitualmente en pacientes con descompensación aguda de cirrosis. BDL + norfloxacina + LPS. Cuando se usaba, la norfloxacina 20 mg/kg se administró por sonda oral durante 10 días.

Los objetivos de este estudio fueron determinar (1) si la cirrosis está asociada con una regulación por aumento de TLR4, NFkB y citocinas proinflamatorias en el riñón. (2) Si la descontaminación selectiva del intestino con norfloxacina provocaría una reducción en la expresión de TLR4, atenuaría NFkB y las citocinas y haría que el riñón fuera menos susceptible a lesión endotoxémica adicional.

Bioquímica: Se evaluó el aspecto funcional de los riñones midiendo la creatinina en plasma. Se evaluó la expresión de proteína de TLR4 y NFkBp65 usando una técnica de transferencia de Western usada habitualmente. La localización de TLR4 y caspasa (proteína efectora que da lugar a muerte celular) se hizo por inmunohistoquímica. Las citocinas se cuantificaron usando la matriz de microesferas de ELISA.

La creatinina representa la función renal que está elevada en el plasma de rata BDL y rata BDL + LPS en comparación con simulado y simulado + LPS ($p=0,03$ y $p=0,04$) respectivamente. La administración de norfloxacina a estos grupos dio lugar a una reducción en la creatinina en las ratas BDL y BDL + LPS ($p=0,02$ y $p=0,03$) respectivamente (figura 8). La endotoxemia asociada a cirrosis ceba el riñón, que da lugar a una regulación por aumento de TLR4 (ligando de LPS) que hace que el riñón sea susceptible a endotoxemia adicional, como es evidente por una regulación por aumento de la expresión de proteína TLR4 usando transferencia de Western en riñón de rata BDL y BDL + LPS en comparación con simulado y simulado + LPS ($p=0,03$ y $p=0,05$) respectivamente. La descontaminación selectiva con norfloxacina a 20 mg/kg por vía oral durante 10 días redujo la expresión de TLR4 tanto en el grupo BDL como en el grupo BDL al que se ha administrado LPS ($p=0,02$ y $p=0,02$) respectivamente (figura 9). NFkBp65, un adaptador importante en la promoción de la cascada inflamatoria se activa en el riñón después de la estimulación con TLR4 tanto en ratas BDL como en ratas BDL a las que se ha administrado LPS en comparación sus grupos simulados de control ($p=0,02$ y $p=0,03$) respectivamente. La descontaminación selectiva con norfloxacina en estos dos grupos atenuó la expresión de la expresión de NFkBp65 en riñón ($p=0,02$ y $p=0,01$) respectivamente (figura 10). La activación de TLR4 en el modelo BDL de cirrosis también dio lugar a una respuesta de inflamación local en el riñón, que da lugar a daño local evidente por un aumento en TNF α tanto en el grupo BDL como en el grupo BDL al que se ha administrado además LPS. La descontaminación selectiva evitó la elevación en TNF α , limitando de ese modo el daño (figura 11). Esto también se asoció con un aumento significativo en el riñón de IL-6 tanto en el grupo BDL como en el grupo BDL al que se ha administrado LPS. El tratamiento con norfloxacina no tuvo efecto sobre la producción de IL-6 local (figura 12). La activación del TLR4 dio lugar a un aumento rápido en las citocinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) sistémicamente en el grupo BDL y BDL + LPS que puede perpetuar la respuesta inflamatoria. El tratamiento con norfloxacina mejoró la respuesta inflamatoria reduciendo la secreción de citocinas (figura 13). La tinción con hematoxilina y eosina del riñón no mostró cambios aparentes en los diferentes grupos como se observa en la figura 14. La administración de LPS (endotoxina) en el grupo simulado de control dio lugar a la regulación por aumento de TLR4 en el borde en cepillo apical de los túbulos renales proximales. Esto fue más pronunciado en el grupo BDL al que se administró LPS con la expresión en el borde en cepillo apical y que se extiende a las células tubulares proximales, esto se asoció con degeneración vacuolar de los túbulos renales proximales (véase la figura 15). La activación de la ruta de TLR4 da lugar a la secreción de TNF α que activa la ruta del receptor de muerte estimulando la proteína efectora caspasa 3 que promueve la muerte celular y función renal reducida evidente en el grupo BDL y el grupo BDL al que se ha administrado LPS. La descontaminación selectiva con norfloxacina dio lugar a una reducción en la muerte celular como se muestra por una reducción en la positividad de caspasa, mejorando de ese modo la función renal (véase la figura 16). Nuestros datos proporcionan fuertes evidencias que indican una función importante de TLR4 en la medición de la susceptibilidad al desarrollo de disfunción renal en un modelo experimental de cirrosis después de inflamación/infección. La descontaminación selectiva del intestino con norfloxacina atenuó este proceso inflamatorio patológico y evita la insuficiencia renal inducida por LPS.

Ejemplo 3: Expresión tubular renal aumentada de TLR4 en cirrosis

Se estudiaron biopsias de riñón de 7 pacientes con cirrosis que presentaban insuficiencia renal. Se registraron diversas mediciones para estos pacientes que se exponen en la tabla 1 a continuación. Se realizaron biopsias renales transyugulares en pacientes que presentaban proteinuria $>0,5$ g/día y/o hematuria microscópica y/o altos niveles de creatinina en suero sin causa aparente. Los datos clínicos sobre la demográfica, etiología y los parámetros bioquímicos se recogieron de forma retrospectiva. Se tiñeron secciones de riñón incrustadas en parafina de forma inmunohistoquímica con anticuerpo primario anti-TLR4 de ratón (1:100, Life span bioscience, n.º cat LS-B2070) después de desparafinado y deshidratación usando el método de recuperación de antígeno con citrato. Los centros de biopsia hepática de pacientes con enfermedad hepática alcohólica descompensada y pacientes con hepatitis alcohólica se tiñeron para el anticuerpo anti-TLR4 de ratón usando el protocolo anterior. Los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación y en las figuras 17 y 18. Una tinción de TLR4 tubular aumentada se correlacionó con un diagnóstico de lesión hepática aguda en lugar de síndrome hepatorenal.

Ejemplo 4: Concentración de TLR4 en orina aumentada en aquellos pacientes con cirrosis que progresan hasta desarrollar insuficiencia renal

Se descubrió que la expresión aumentada de TLR4 en túbulo renal identificada en el ejemplo 3 también puede identificarse midiendo la concentración de TLR4 en orina. También se descubrió que los niveles de TLR4 en orina son mayores en aquellos pacientes con cirrosis que progresan hasta desarrollar insuficiencia renal. Se recogieron muestras de orina de los controles sanos, pacientes con cirrosis descompensada y pacientes con cirrosis descompensada que presentaban en el hospital lesión inflamatoria aguda. La orina de todas las cohortes se concentró usando unidades de filtro centrífugo (Millipore) para 5000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Se cargó una cantidad igual de orina usando el tampón de carga. La proteína se separó usando electroforesis en gel. La membrana se sondeó con un anticuerpo anti-TLR4 de conejo disponible en el mercado durante 16 horas a 4 °C (1:1000, abbtotec) y también usando los anticuerpos antirrátón (C3-31 y 125-2, Innaxon) que están actualmente en desarrollo para el análisis rápido de transferencia de Western. La cuantificación de proteína en ambas membranas se averiguó usando un dominio público, el programa de procesamiento de imágenes basado en Java; Image J. La cuantificación de proteína TLR4 se corrigió para la creatinina en orina. La figura 19A muestra una transferencia de Western de muestras de orina que muestra la detección de TLR4 en la orina. TLR4 se detectó en aquellos pacientes diagnosticados con lesión renal aguda (véase el ejemplo 3), pero no en pacientes sanos o pacientes diagnosticados con síndrome hepatorenal.

Tabla 1 - Biopsias de riñón de pacientes con cirrosis que presentan insuficiencia renal

	paciente 1	paciente 2	paciente 3	paciente 4	paciente 5	paciente 6	paciente 7
Etiología	ALD	ALD	ALD+HCV	ALD	ALD	ALD	ALD
Líquido ascítico	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Bilirrubina (µmol/l)	424	93	12	29	52	14	20
Creatinina (µmol/l)	135	128	104	125	187	112	104
Antibióticos	Sí	No	No	Sí	No	No	No
Resultado	Muerto	LT	Vivo	LT	LT	LT	LT
Diagnóstico	AKI	HRS	HRS	AKI	HRS	HRS	HRS
Tinción de TLR4 tubular	+++	±	-	+++	-	±	±
Evidencia de muerte celular	+++	±	-	+++	-	-	±

ALD: Enfermedad hepática alcohólica; HCV: Virus de hepatitis C; HRS: Síndrome hepatorenal; AKI: Lesión renal aguda; LT: Trasplante de hígado.

La figura 19B muestra la medición de TLR4 en orina en una población de voluntarios sanos y pacientes con cirrosis. Los valores de TLR4 en orina fueron muy bajos en los voluntarios sanos y en los pacientes con cirrosis compensada o descompensada y no diferentes entre sí. Los pacientes con HRS tenían también TLR4 en orina bajo. Sin embargo, los pacientes con cirrosis e inflamación e infección solapadas que estaban en riesgo de desarrollar insuficiencia renal tenían niveles superiores de TLR4 en su orina. En los pacientes que desarrollaron insuficiencia renal, los valores de TLR4 en orina fueron significativamente mayores. Estos datos sugieren que los valores de TLR4 en orina pueden predecir el desarrollo de insuficiencia renal y definir una población de pacientes que debe tratarse con un antagonista de TLR4.

Ejemplo 5: Administración de antagonistas de TLR4 en ratones BDL

Estos experimentos usaron un modelo animal de cirrosis debido a ligamiento del conducto biliar. Se demostró que la administración de STM28, un antagonista de TLR4 inhibe la inflamación y mejora la disfunción renal sin mejorar la función hepática. Este estudio se realizó en ratones con cirrosis con conducto biliar ligado (BDL). Los animales se trataron con STM28 que es un inhibidor de TLR4, o placebo y se midió la función renal. Como se muestra en la figura 20, la inhibición de TLR4 en estos ratones se asoció con reducción significativa en la creatinina, que indica que el antagonismo de TLR4 es un tratamiento para la disfunción renal de cirrosis.

Ejemplo 6: Administración de antagonistas de TLR4 en animales con sobredosis de paracetamol

En animales con sobredosis de paracetamol, que se sabe que causa insuficiencia renal independientemente de la gravedad de la insuficiencia hepática, se descubrió que el antagonista de TLR4 STM28 evita la insuficiencia renal. Se trataron ratones normales con 400 mg de paracetamol por vía intraperitoneal con o sin el antagonista de TLR4 STM28. La figura 21 muestra que los animales tratados con STM28 estaban protegidos de la disfunción renal que se inducía directamente por paracetamol, lo que indica que el antagonismo de TLR4 puede ser protector directamente contra el daño a los túbulos renales inducido por paracetamol.

Ejemplo 7: Expresión de TLR4 aumentada en el cerebro de animales con cirrosis

Se realizaron experimentos usando ratas tratadas de forma simulada y BDL como se describe anteriormente. Los animales se trataron con LPS para imitar los efectos de inflamación solapada y/o norfloxacin. Como se muestra en la figura 22, la expresión de TLR4 en cerebro se aumentó en el modelo de conducto biliar ligado (BDL) de cirrosis en

comparación con las ratas simuladas (normales) que aumentaba adicionalmente cuando era con inflamación solapada (BDL + LPS). Este aumento podía evitarse por descontaminación intestinal con norfloxacin. Como se muestra en la figura 23, la expresión de TLR4 estaba aumentada en ratas BDL (C) en comparación con ratas simuladas (normales) (A) que aumentaba adicionalmente cuando era con inflamación solapada (BDL + LPS) (D).

5 Este aumento podía evitarse tanto en los animales BDL (E) como en aquellos tratados con LPS (F) por descontaminación intestinal con norfloxacin. Como se muestra en la figura 24, la hidrocefalia estaba aumentada en las ratas BDL en comparación con las ratas simuladas (normales) que se aumentaba adicionalmente cuando era con inflamación solapada (BDL + LPS). Este aumento en el edema cerebral medido por la hidrocefalia podía evitarse por

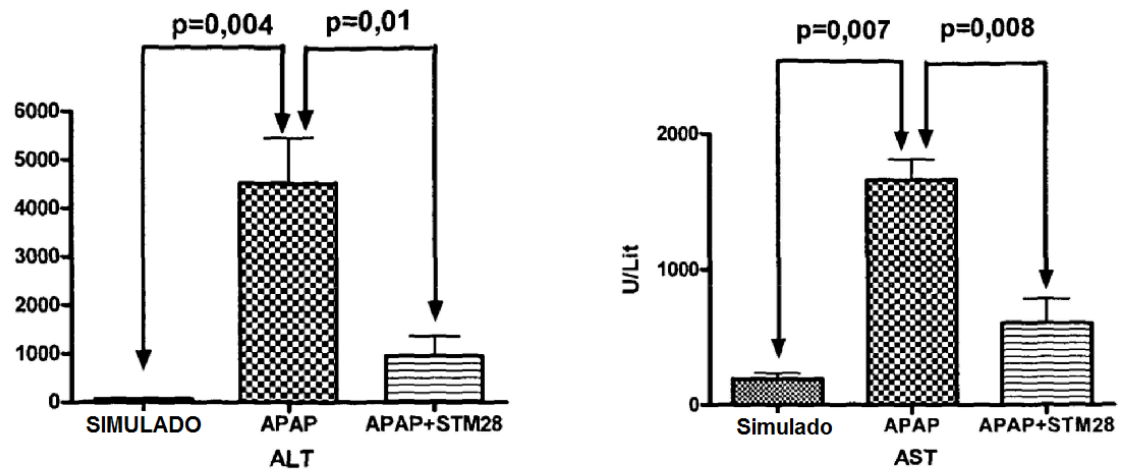
10 descontaminación intestinal con norfloxacin, como se muestra en la figura 25, la reducci3n en la expresi3n de TLR4 inducida por la administraci3n de norfloxacin (Norflox) estaba asociada con una mejora en la supervivencia de las ratas BDL a las que se ha administrado LPS (lipopolisac3rido).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) para su uso en un método de tratamiento o prevención de disfunción renal en un individuo que tiene insuficiencia hepática crónica agudizada (ACLF).
2. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho individuo padece cirrosis.
- 10 3. Un antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho individuo padece sobredosis de paracetamol.
4. Un antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el individuo a tratar tiene un nivel aumentado de TLR4 en orina en comparación con el nivel de TLR4 en la orina de un individuo que no padece ACLF o disfunción renal.
- 15 5. Un antagonista para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho antagonista da lugar a:
- 20 (a) expresión disminuida de TLR4 en el riñón del individuo; y/o
(b) niveles disminuidos de TLR4 en el riñón del individuo; y/o
(c) actividad disminuida de TLR4 en el riñón del individuo; y/o
(d) niveles disminuidos de TLR4 en la orina del individuo.
- 25 6. Un método de diagnóstico de la disfunción renal o insuficiencia renal o de predicción de la insuficiencia renal en un paciente que tiene ACLF, comprendiendo el método:
- 30 (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente, y
(b) comparar el nivel de (a) con un nivel conocido de TLR4 de la orina de un paciente de control que no padece enfermedad hepática o disfunción renal,
- en el que un nivel aumentado en (a) en comparación con el control indica que el paciente tiene disfunción renal o insuficiencia renal o que el paciente está en riesgo aumentado de insuficiencia renal.
- 35 7. Un método de identificación de un paciente que tiene ACLF que es adecuado para el tratamiento de disfunción renal y/o insuficiencia renal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el método:
- (a) medir el nivel de TLR4 en la orina del paciente, y
(b) comparar el nivel de (a) con un nivel conocido de TLR4 de la orina de un paciente de control que no padece enfermedad hepática o disfunción renal,
- 40 en el que un nivel aumentado en (a) en comparación con el control indica que el paciente puede ser adecuado para tratamiento de la disfunción renal y/o insuficiencia renal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

A

Enzimas hepáticas



B

Bioquímica

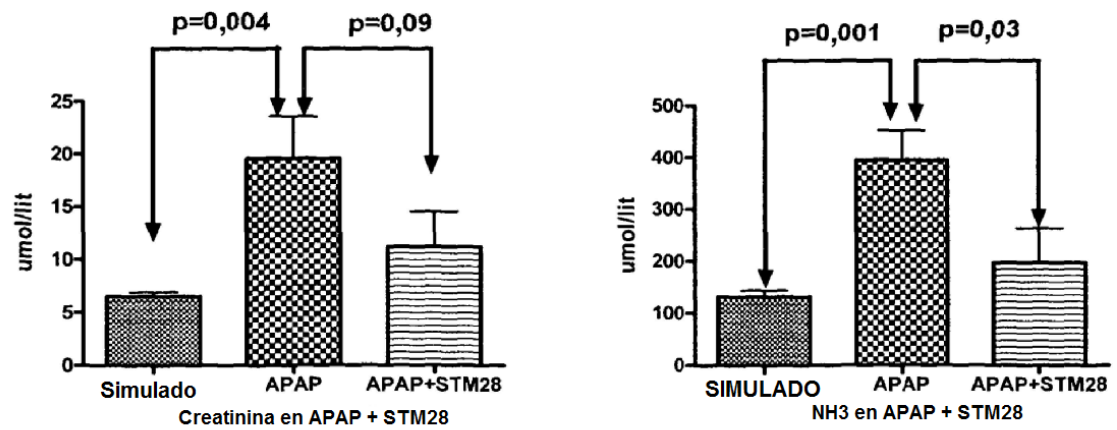
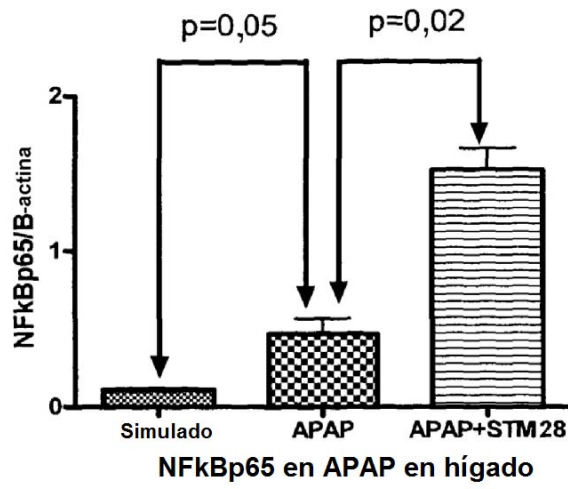


Figura 1

A



B

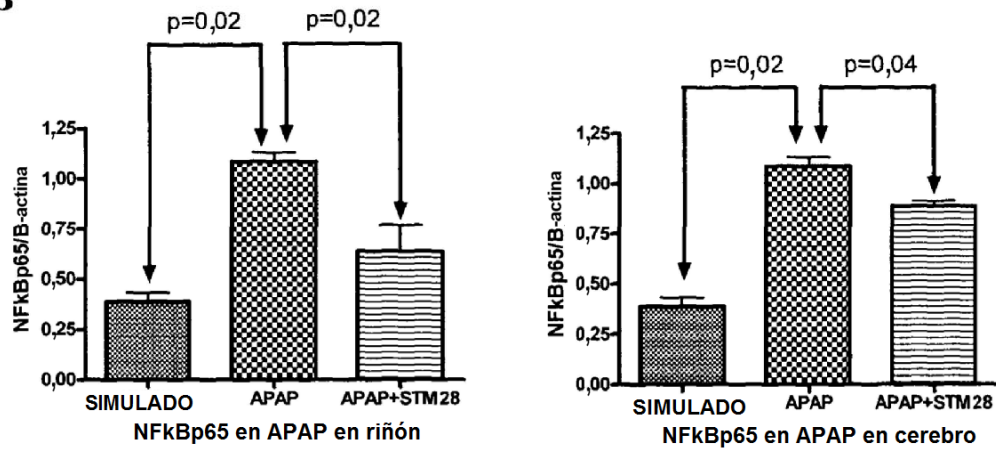


Figura 2

Citocina tisular en APAP

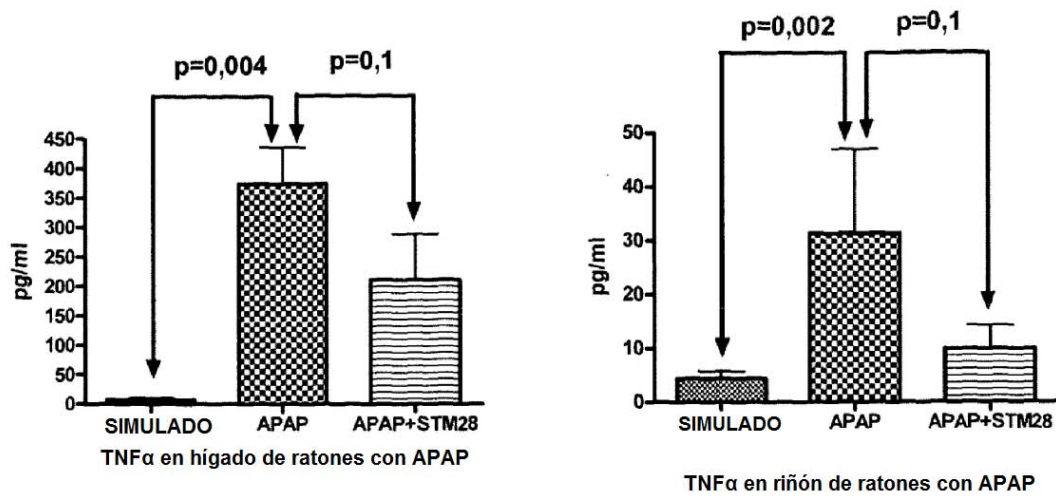


Figura 3

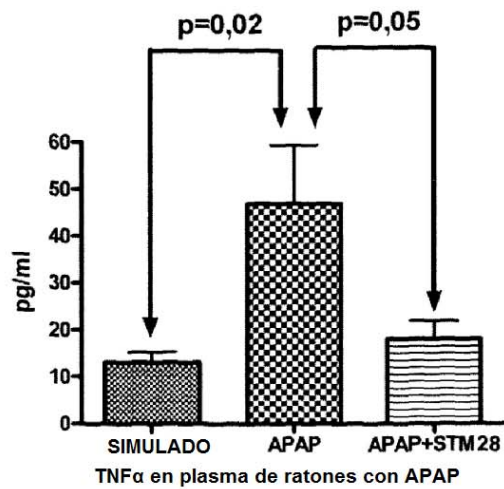


Figura 4

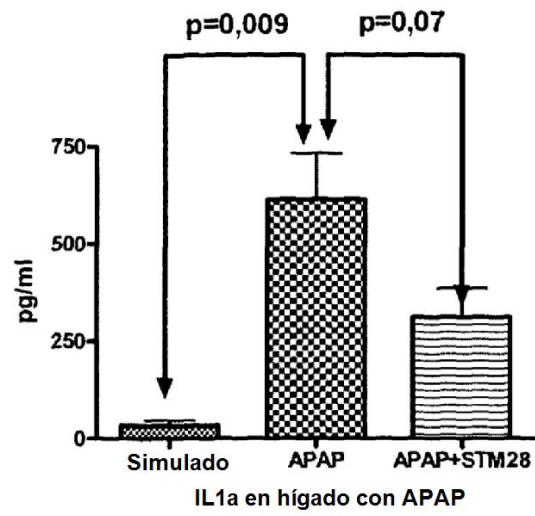


Figura 5

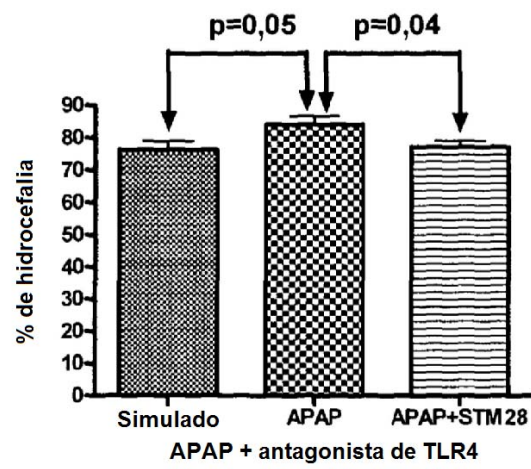


Figura 6



Figura 7

Creatinina en plasma

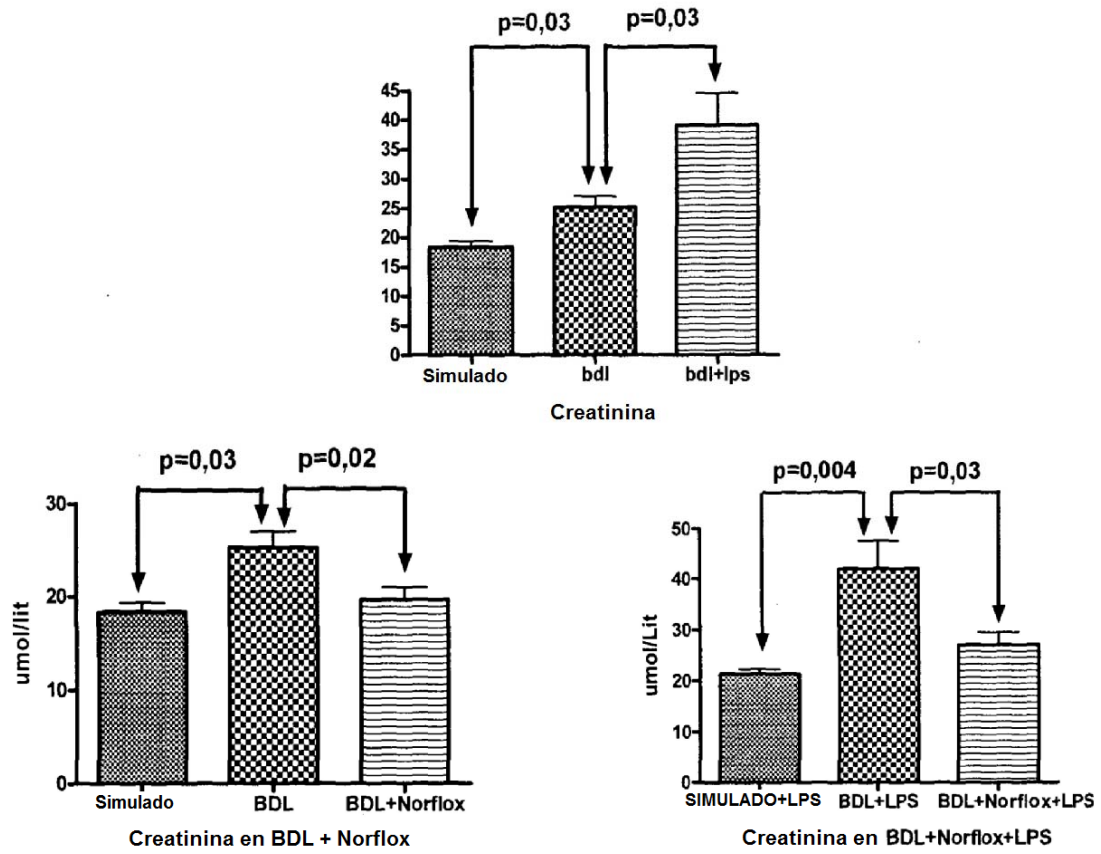


Figura 8

Densitometría de TLR4 en riñón

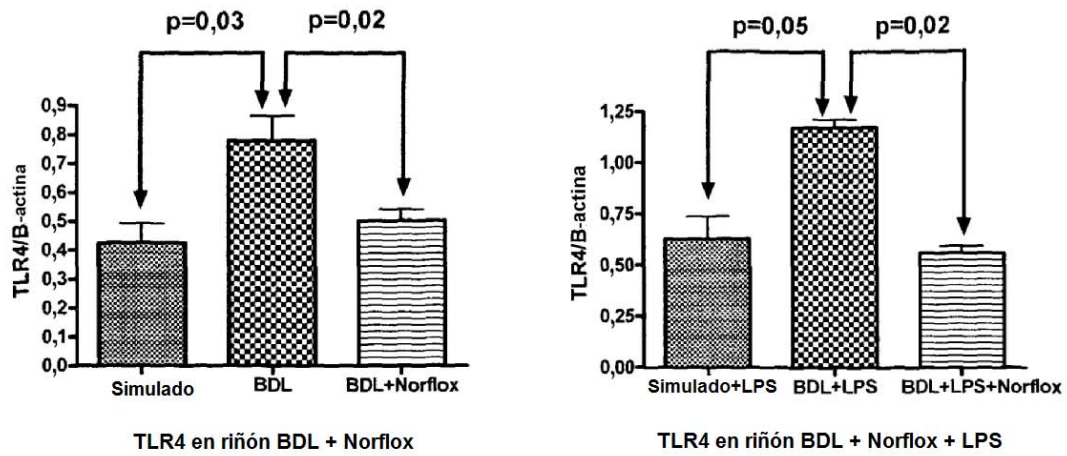


Figura 9

NFkBp65 en riñón

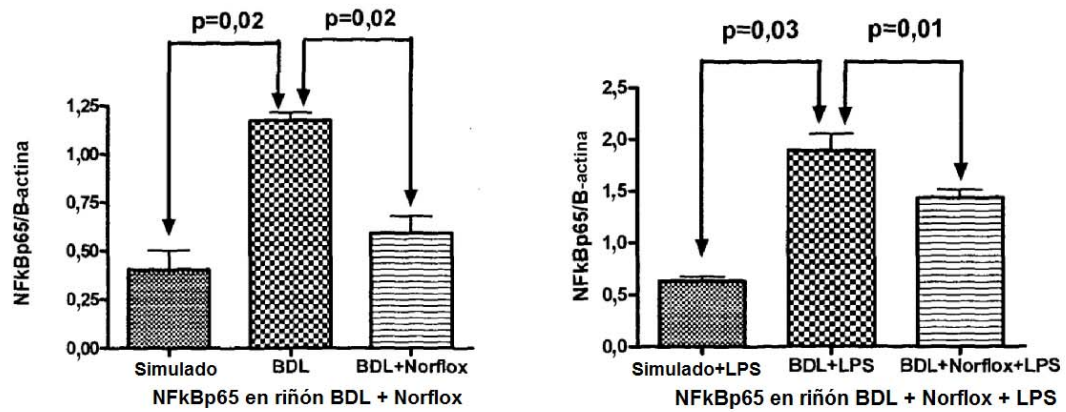


Figura 10

TNF α en riñón

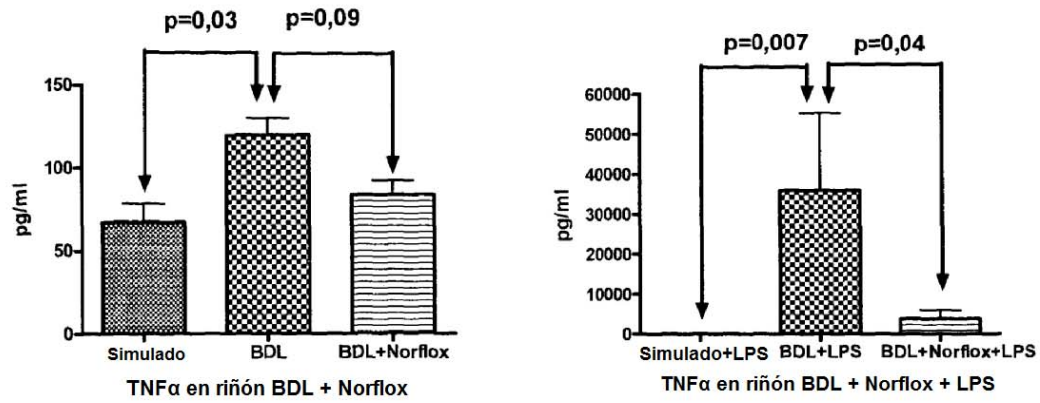


Figura 11

IL6 en riñón

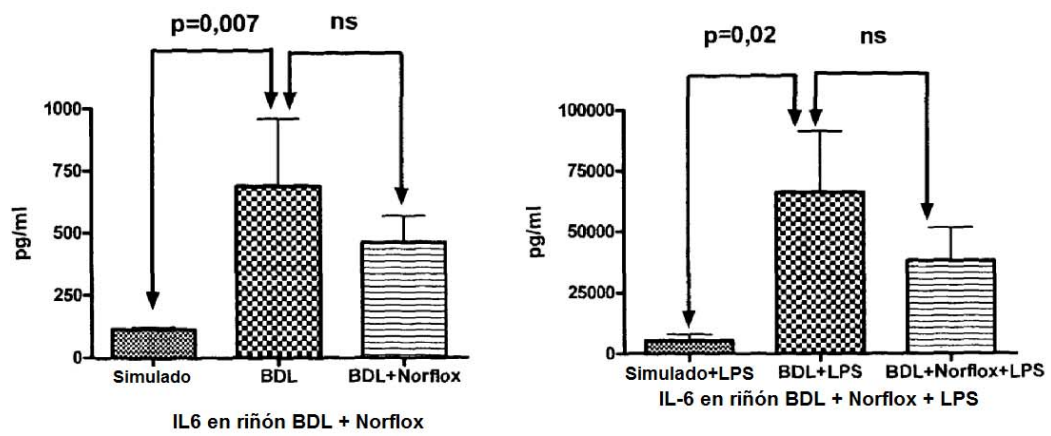


Figura 12

Citocinas en plasma

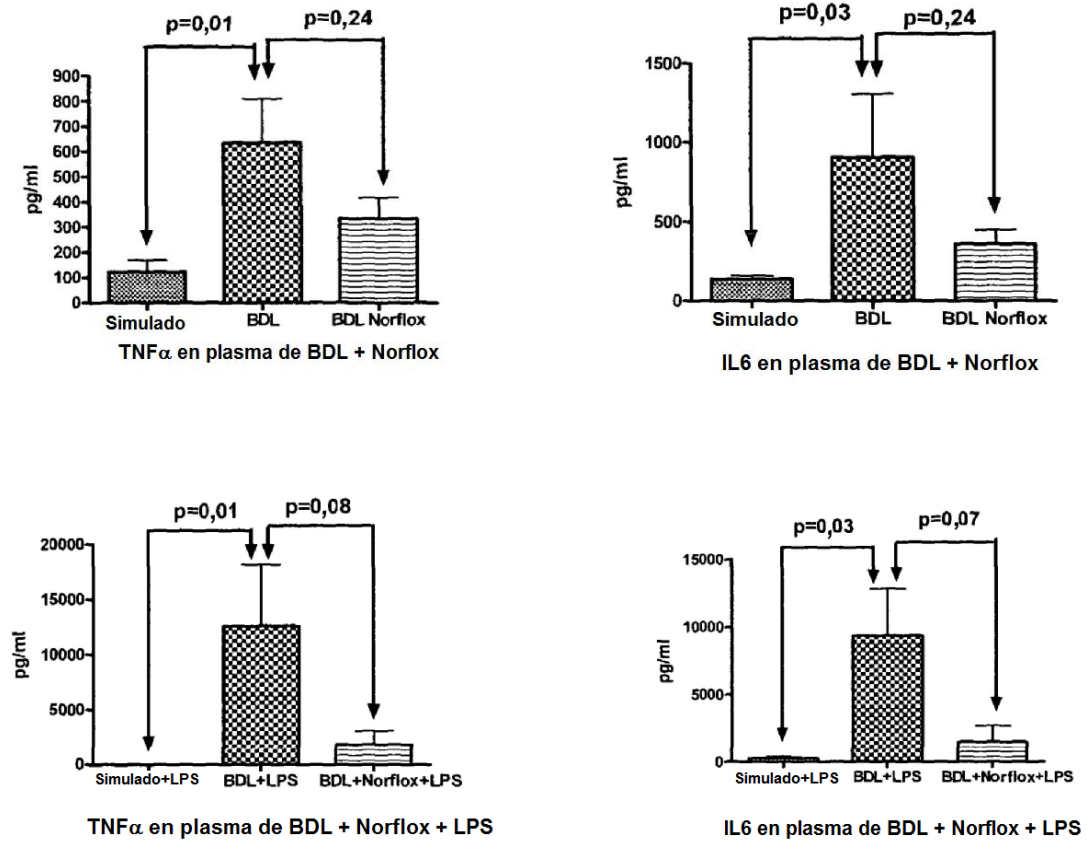


Figura 13

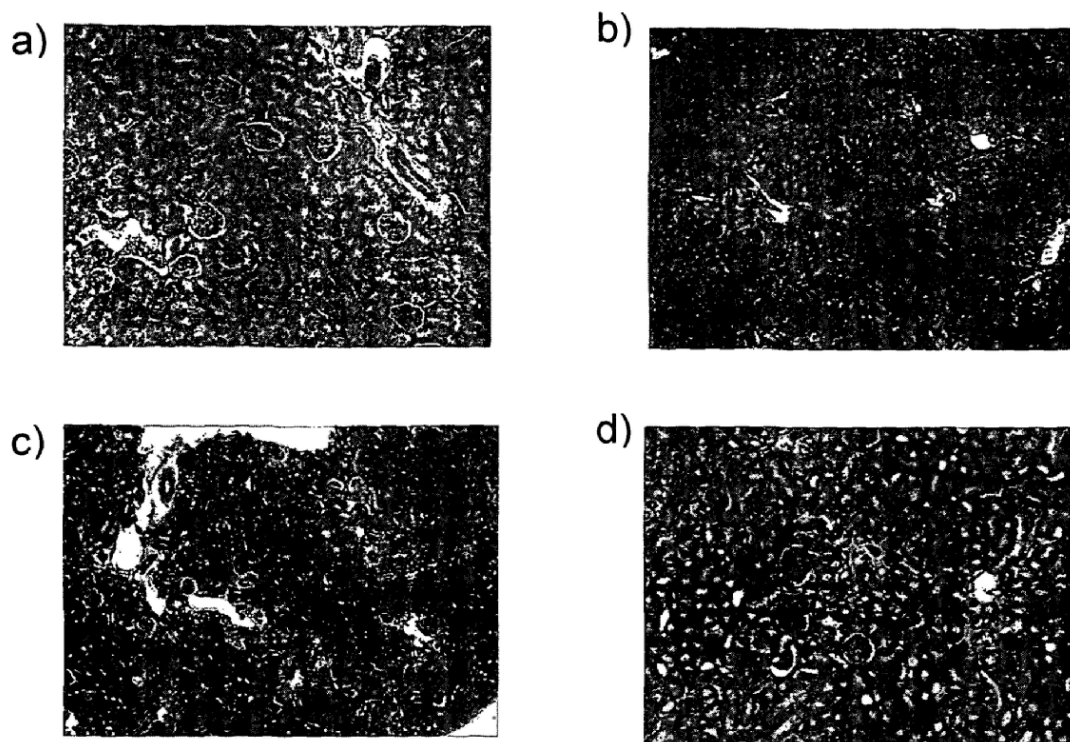


Figura 14

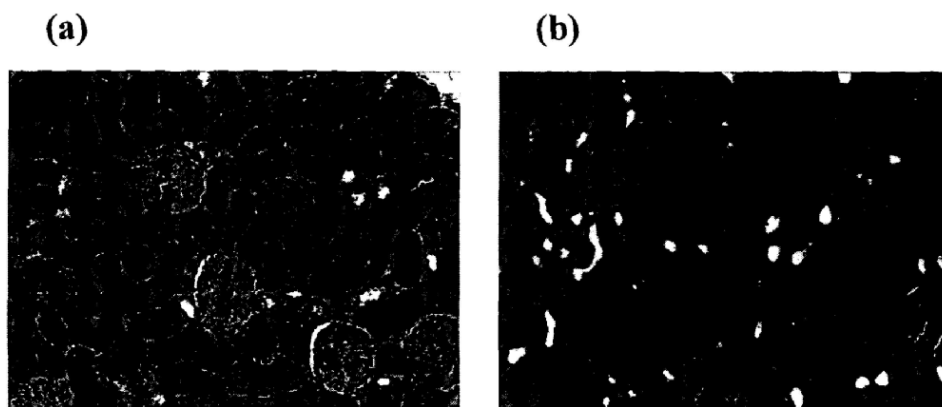


Figura 15

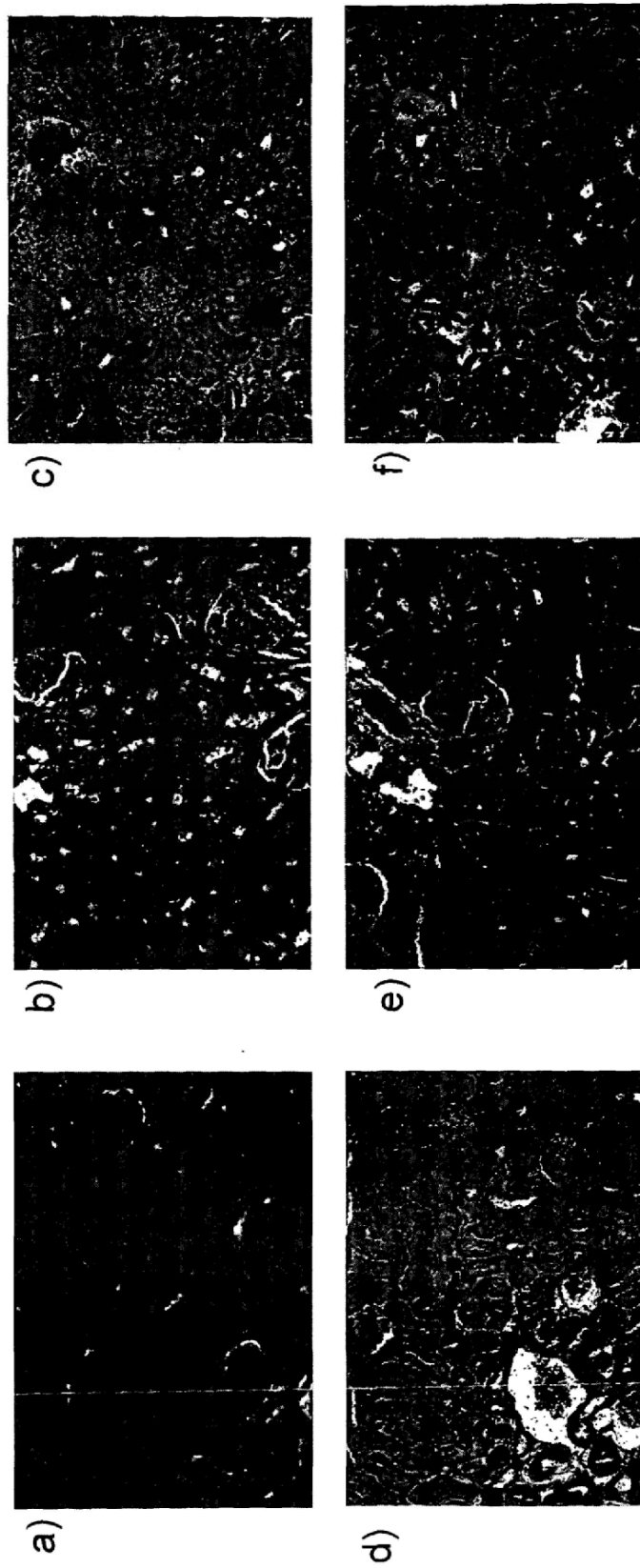


Figure 16

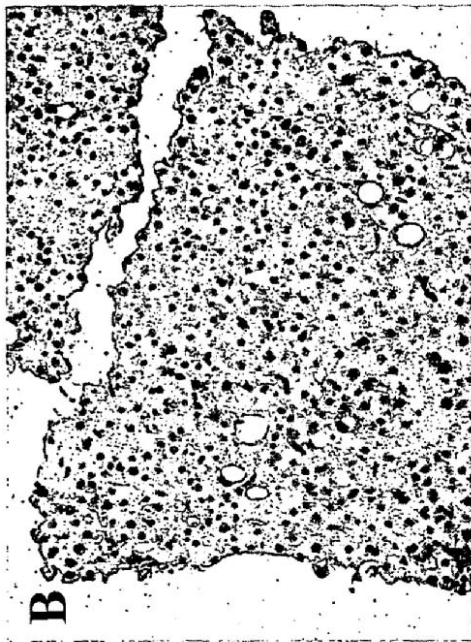


Figure 17



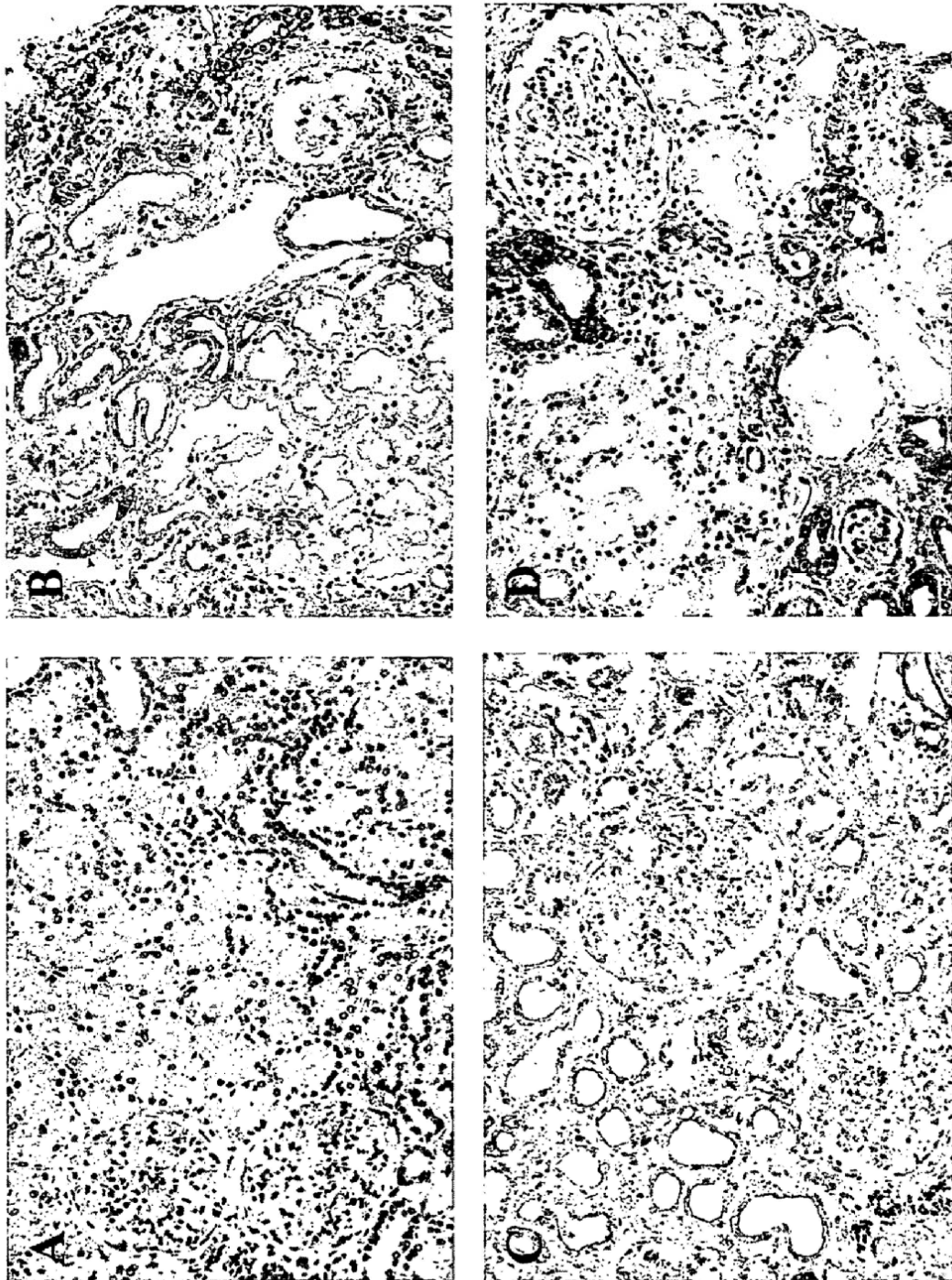


Figura 18

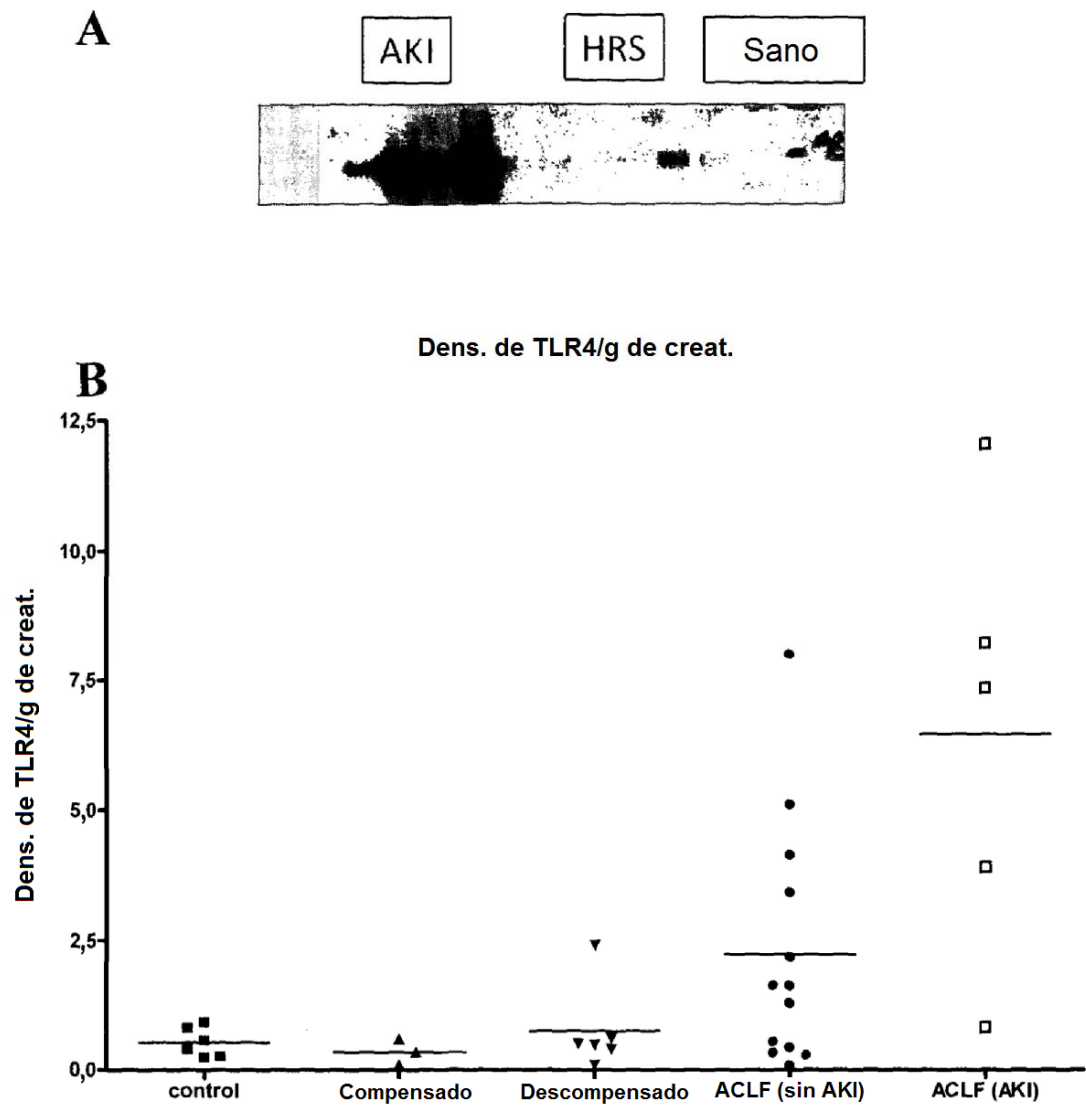


Figura 19

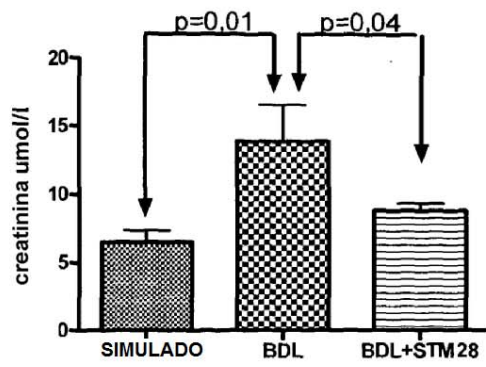


Figura 20

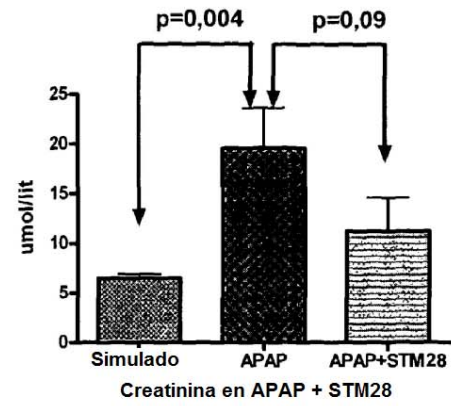


Figura 21

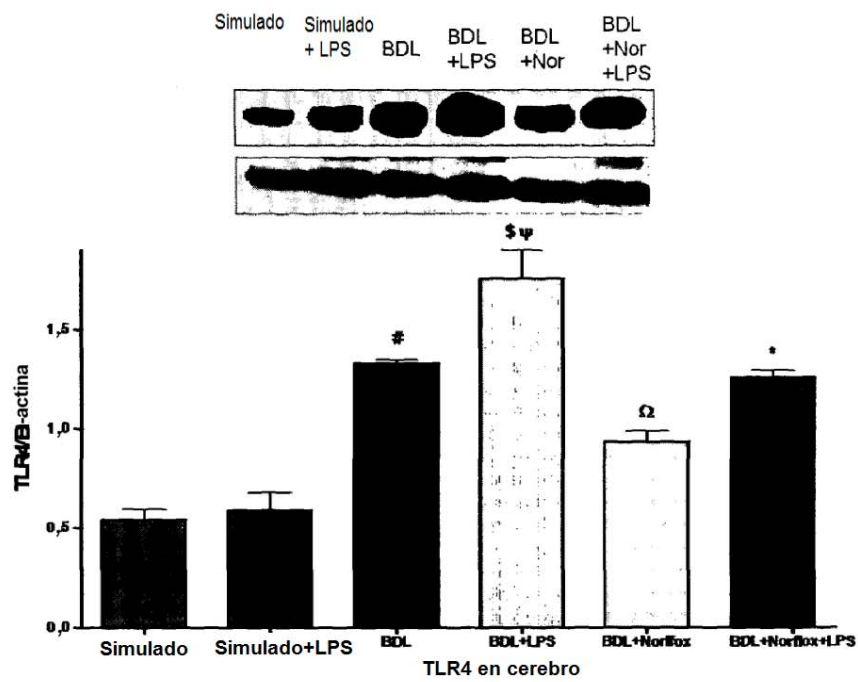


Figura 22

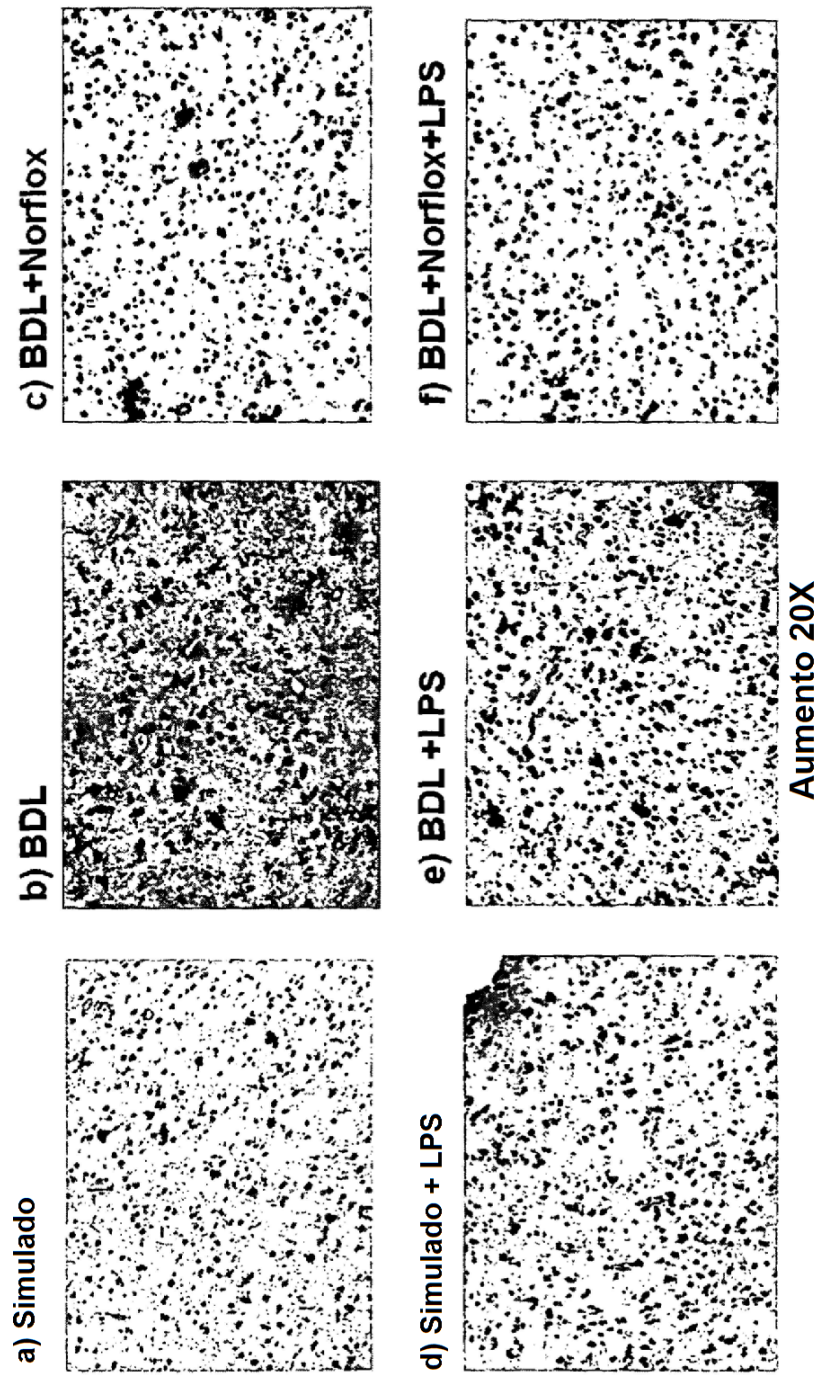


Figura 23

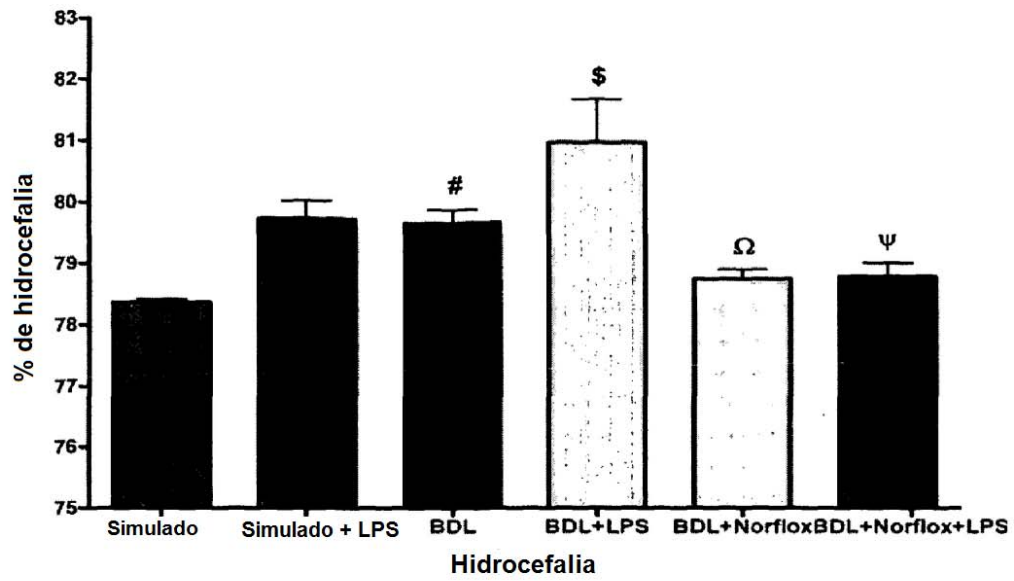


Figura 24

Tiempo hasta el coma

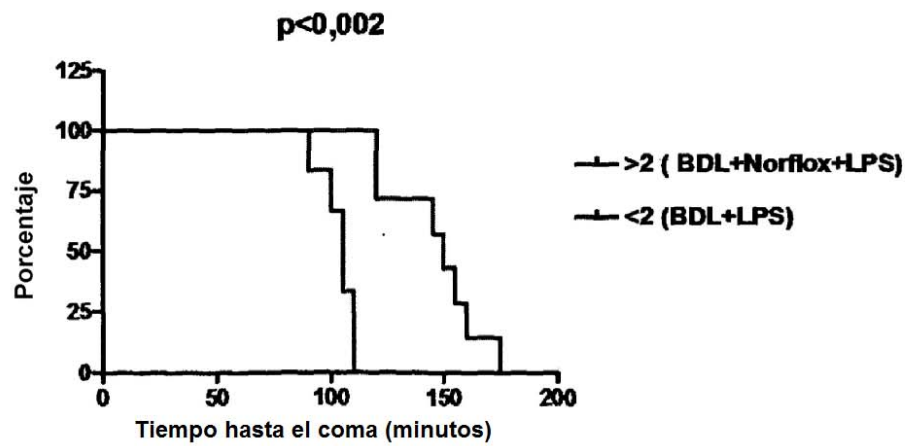


Figura 25