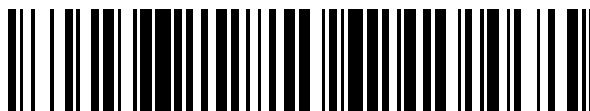


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 563**

51 Int. Cl.:

A61K 31/568 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2015 PCT/GB2015/050060**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114308**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2015 E 15705691 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3099306**

54 Título: **Compuesto esteroideo para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática**

30 Prioridad:

29.01.2014 SE 1450089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

**UMECRINE COGNITION AB (100.0%)
Karolinska Institutet Science Park Fogdevreten 2
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**DOVERSKOG, MAGNUS;
MÖHLER, HANNS;
FELIPO, VICENTE y
BÄCKSTRÖM, TORBJÖRN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 563 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

Compuesto esteroideo para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto esteroideo para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática.

5 Antecedentes de la invención

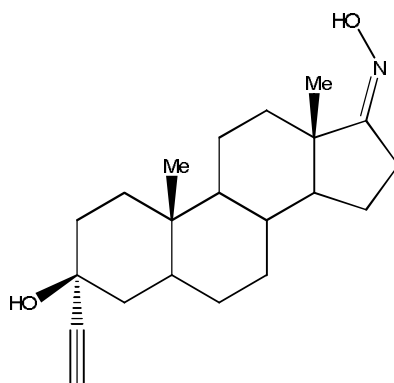
La encefalopatía hepática (EH) es una complicación neuropsiquiátrica y neurocognitiva grave en la hepatopatía crónica y aguda. La EH es un problema sanitario creciente y significativo debido a la enorme y creciente prevalencia de la hepatopatía crónica. La EH se caracteriza por deterioros del ciclo sueño-vigilia, cognición, memoria, aprendizaje, coordinación motora, conciencia, niveles de energía disminuidos y cambio de personalidad, que varían desde la EH mínima (EHM) a la EH sintomática (EHS). La EHM se manifiesta con deterioro cognitivo y tiene efectos perjudiciales sobre la calidad de vida relacionada con la salud y la capacidad de realizar tareas complejas, tales como conducir. Además, la EHS se manifiesta clínicamente con trastornos mentales y motores y los síntomas varían desde desorientación hasta sedación y coma.

Los esteroides de origen natural están sometidos a un intenso metabolismo y típicamente no son adecuados para su administración oral. Los metabolitos de las hormonas esteroideas endógenas pregnenolona, progesterona, desoxicorticosterona, cortisona y cortisol, que se conocen como pregnanonas, así como los metabolitos de testosterona, androstendiona y deshidroepiandrosterona, han sido en su totalidad objeto de diversos estudios, que explican al menos parcialmente su papel en el sistema de señales neurológicas en los mamíferos. Los metabolitos esteroideos inducen síntomas y trastornos en el SNC y los esteroides actúan como moduladores positivos sobre el complejo ionóforo para cloruro-receptor ácido gamma-aminobutírico (GABA_A-R) y, por lo tanto, se denominan esteroides moduladores del receptor GABA_A (GAMS).

Determinados esteroides han demostrado ser potenciadores del receptor GABA_A específicos. Los ejemplos de estos esteroides se pueden encontrar, entre otros, en el documento WO 2008/063128. Algunos de estos esteroides son potentes y, por ejemplo, han demostrado tener una capacidad de inducir amnesia, sedación y anestesia en una dosis farmacológica. Los documentos WO 99/45931 y WO 03/059357 divulgan efectos antagonistas de esteroides. Wang *et al.* 2000 (*Acta Physiol Scand* 169, 333-341) y Wang *et al.* 2002 (*J Neurosci* 22(9):3366-75) divulgan efectos antagonistas de 3β-OH-5α-pregnan-20-ona y otros esteroides 3β-OH-5α/β-pregnano. Los documentos WO2006/056794 y WO2010/144498 divulgan el uso de compuestos para el tratamiento de la descompensación hepática, encefalopatía hepática e hipertensión portal. Existe una necesidad de proporcionar tratamientos terapéuticos nuevos y eficaces para la encefalopatía hepática y trastornos relacionados.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona el compuesto oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática.

35 La oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona pertenece a una clase de compuestos conocidos como antagonistas de esteroides moduladores del receptor GABA_A (GAMSA).

Se ha descubierto que la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona puede inhibir selectivamente la modulación positiva del receptor GABA_A mediante esteroides endógenos, tales como alopregnanolona y tetrahydrodesoxicorticosterona (THDOC). Se sabe que estos esteroides inducen sedación, deterioro cognitivo y trastornos motores, y su concentración en el cerebro está incrementada en pacientes con EH e hiperamonemia inducida por hepatopatía.

Sin embargo, también se ha descubierto que la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona no tiene un efecto

antagonista hacia la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en los receptores GABA_A. Esta sorprendente selectividad es ventajosa desde una perspectiva de seguridad puesto que la inhibición de la unión de GABA en los receptores GABA_A puede dar lugar a efectos secundarios, incluyendo convulsiones.

5 Además, 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona actúa en ambos subtipos del receptor GABA_A α 1 y α 5 y así puede ejercer un efecto positivo sobre tanto el deterioro cognitivo como motor, y los efectos sedantes, que resultan de la sobreactivación de los receptores GABA_A. El efecto positivo de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona sobre el deterioro cognitivo y motor se ha ilustrado en dos modelos animales de EH (hiperamoniemia y anastomosis portocava en ratas, véase más adelante).

10 A diferencia de los tratamientos existentes para la EH, la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afecta a los niveles de amoníaco *in vivo*. Por lo tanto, también existe claramente potencial para su uso complementario en el tratamiento.

Por consiguiente, existe una buena base para creer que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona es particularmente muy adecuada para el tratamiento de la EH y trastornos relacionados.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afecta a los niveles de amonio en sangre. Los valores son la media \pm EEM de 12 ratas por grupo, los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos; ***, $p < 0,001$. CV=ratas de control tratadas con vehículo; HAV=ratas con hiperamoniemia tratadas con vehículo; HA+GAM=ratas con hiperamoniemia tratadas con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

20 La figura 2 muestra que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restablece el aprendizaje espacial de ratas con hiperamoniemia en el laberinto radial. La figura muestra los errores operacionales en la prueba radial. Errores operacionales en el bloque 1. Los valores son la media \pm EEM de 8 ratas por grupo. # $p < 0,05$ frente a HAV. CV=ratas de control tratadas con vehículo; HAV=ratas con hiperamoniemia tratadas con vehículo; HA+GAM=ratas con hiperamoniemia tratadas con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

25 La figura 3 muestra que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, en la prueba del laberinto acuático de Morris, restablece la memoria espacial de ratas con hiperamoniemia. La figura muestra el tiempo en encontrar la plataforma en el primer ensayo del día 3. Los valores son la media \pm EEM de 8 ratas por grupo. HAV frente a CV $p = 0,052$. CV=ratas de control tratadas con vehículo; HAV=ratas con hiperamoniemia tratadas con vehículo; HA+GAM=ratas con hiperamoniemia tratadas con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

30 La figura 4 muestra que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restablece la coordinación motora de ratas con hiperamoniemia. Los valores son la media \pm EEM de 15 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de CV se indican mediante *, $p < 0,05$, los valores significativamente diferentes de HAV se indican mediante ###, $p < 0,001$. CV=ratas de control tratadas con vehículo; HAV=ratas con hiperamoniemia tratadas con vehículo; HA+GAM=ratas con hiperamoniemia tratadas con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

35 La figura 5 muestra las concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona plasmáticas totales. Concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona plasmáticas totales en ratas con hiperamoniemia y de control 4 y 23 horas después de la inyección subcutánea de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el quinto día y durante la última semana de tratamiento con inyecciones diarias. HA=animales con hiperamoniemia.

40 La figura 6 proporciona concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona cerebral no unida* en ratas con hiperamoniemia y de control 1-2 horas después de la inyección s.c. de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona después de siete semanas con inyecciones diarias de 20 mg/kg.

*Concentración cerebral no unida=fracción de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el cerebro que no está unida a proteína transportadora o tejido cerebral.

45 La figura 7 proporciona mediciones electrofisiológicas representativas que muestran la activación potenciada con tetrahidrodesoxicorticosterona (THDOC) de los receptores GABA_A α 1 β 2 γ 2L. Las células HEK-293 que expresaban receptores GABA_A α 1 β 2 γ 2L humanos se expusieron a GABA 30 μ M o GABA 30 μ M más THDOC 100 nM durante 40 ms. Con THDOC hubo una preincubación de 20 s antes de la aplicación de THDOC+GABA.

50 La figura 8 proporciona mediciones electrofisiológicas representativas que muestran antagonismo de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (GAMSA) de la activación potenciada con THDOC de los receptores GABA_A α 1 β 2 γ 2L y α 5 β 3 γ 2L y ninguna inhibición de GABA. A) antagonismo de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona 1 μ M de la activación potenciada con THDOC 100 nM de GABA 30 μ M con el receptor GABA_A α 1 β 2 γ 2L, B) la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona 1 μ M no antagoniza la activación de GABA 30 μ M del receptor GABA_A α 1 β 2 γ 2L C) antagonismo de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona 1 μ M de la activación potenciada con THDOC 200 nM de GABA 0,3 μ M con el receptor GABA_A α 5 β 3 γ 2L, lo que indica el

55

antagonismo del efecto de THDOC, D) la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona 1 μ M no antagoniza la activación de GABA_A 0,3 μ M del receptor GABA_A α 5 β 3 γ 2L.

La figura 9 ilustra la capacidad de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de restablecer la coordinación motora en ratas con PCS y con hiperamonemia. La coordinación motora se evaluó usando la prueba de la barra de equilibrio. (A) muestra los datos para ratas de control (CV) o con hiperamonemia (HAV) tratadas con vehículo y para ratas con hiperamonemia tratadas con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. (B) muestra los datos para controles operados de manera simulada (SM) o ratas con PCS tratadas con vehículo y para ratas con PCS tratadas con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. Los valores son la media \pm EEM del número de ratas indicado debajo de cada barra. Los valores significativamente diferentes de las ratas de control o con simulación se indican con asteriscos. Los valores significativamente diferentes de las ratas con hiperamonemia o con PCS tratadas con vehículo se indican con "a". * p < 0,05; a p < 0,05; aa p < 0,01; aaa p < 0,001.

La figura 10 ilustra la capacidad de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de restablecer la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas con hiperamonemia y con PCS. La memoria de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris se evaluó en ratas de control (CV) o con hiperamonemia (HAV) tratadas con vehículo y para ratas con hiperamonemia tratadas con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (A, B) y en controles operados de manera simulada (SM) o ratas con PCS tratadas con vehículo y para ratas con PCS tratadas con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (C, D). (A, C) Latencias de escape (en segundos) para alcanzar la plataforma durante las diferentes sesiones. (B, D) Tiempo invertido (%) en el cuadrante correcto durante la prueba de memoria. Los valores son la media \pm EEM del número de ratas indicado debajo de cada barra. Los valores significativamente diferentes de las ratas de control o con simulación se indican con asteriscos. Los valores significativamente diferentes de las ratas con hiperamonemia o con PCS tratadas con vehículo se indican con "a". * p < 0,05; a p < 0,05.

La figura 11 ilustra la capacidad de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de restablecer el aprendizaje espacial en el laberinto radial en ratas con hiperamonemia y con PCS. El aprendizaje espacial en el laberinto radial se evaluó en ratas de control (CV) o con hiperamonemia (HAV) tratadas con vehículo y para ratas con hiperamonemia tratadas con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (A, B) y en controles operados de manera simulada (SM) o ratas con PCS tratadas con vehículo y para ratas con PCS tratadas con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (C, D). (A, C) Errores operacionales durante las diferentes sesiones. (B, D) Errores operacionales durante los días 1-2. Los valores son la media \pm EEM del número de ratas indicado debajo de cada barra. Los valores significativamente diferentes de las ratas de control o con simulación se indican con asteriscos. Los valores significativamente diferentes de las ratas con hiperamonemia o con PCS tratadas con vehículo se indican con "a". * p < 0,05; a p < 0,05; aa p < 0,01.

La figura 12 ilustra la capacidad de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de incrementar la actividad motora espontánea durante la noche y restablecer parcialmente el ciclo circadiano de ratas con PCS. La actividad motora se evaluó en controles operados de manera simulada (SM) o ratas con PCS tratadas con vehículo o con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. La actividad motora durante cada hora se muestra en A; la proporción de actividad durante la noche y durante el día en B y la actividad total durante el día o la noche en C. Las luces se apagan a las 7:00 p. m. Los valores son la media \pm EEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de ratas SM se indican con asteriscos; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Los valores significativamente diferentes de ratas con PCS se indican con a; a p < 0,05.

La figura 13 ilustra la capacidad de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de normalizar la actividad vertical durante el día y de restablecer parcialmente el ritmo circadiano de ratas con PCS. El experimento se llevó a cabo como se describe para la figura 12, pero se muestran los recuentos verticales. Los valores son la media \pm EEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de ratas SM se indican con asteriscos; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Los valores significativamente diferentes de ratas con PCS se indican con a; a p < 0,05; aa p < 0,01.

La figura 14 muestra la exposición de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el plasma y en el cerebro en el momento de las pruebas de comportamiento, en ratas con hiperamonemia y con PCS. En A) ratas con hiperamonemia y B) ratas con PCS, las concentraciones plasmáticas totales de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona se muestran en μ M. En C) ratas con hiperamonemia y D) ratas con PCS, las concentraciones cerebrales no unidas de etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona se muestran en nmol/kg. Adviértanse las exposiciones similares en los diferentes modelos de ratas con las dosis usadas, en ratas con hiperamonemia 3, 10 y 20 mg/kg/día y en ratas con PCS 0,7 y 2,5 mg/kg/día. Los datos son del final del estudio, es decir, después de nueve semanas de tratamientos diarios con la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en aceite de sésamo administrado s.c. una vez al día.

Antes de que se describa en detalle la presente invención, se ha de entender que la terminología empleada en el presente documento se usa únicamente con el propósito de describir modos de realización particulares y no pretende ser limitante.

5 Se advierte que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" también incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

El término "composición farmacéutica" se usa en su sentido más amplio, abarcando todas las composiciones farmacéuticamente aplicables que contienen al menos una sustancia activa y excipientes, adyuvantes, diluyentes, constituyentes, etc., opcionales.

10 Los términos "administración" y "modo de administración", así como "vía de administración", también se usan en su sentido más amplio.

15 El compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona como se usa de acuerdo con la invención se puede administrar en un número de maneras, dependiendo, en gran medida, de si un modo de administración local, tópica o sistémica es más apropiado o no para la afección de encefalopatía hepática que se va a tratar. Por ejemplo, estos diferentes modos de administración son tópica (por ejemplo, sobre la piel), local (incluyendo oftálmica y a varias mucosas, por ejemplo, administración vaginal y rectal), oral, parenteral o pulmonar, incluyendo las vías respiratorias altas y bajas. La preparación de dichas composiciones y formulaciones se conoce generalmente por los expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación y se puede aplicar a la formulación de la composición de la presente invención.

20 Con el término "antagonista" se quiere decir una sustancia que impide que otra sustancia, un agonista, induzca su efecto. En la presente solicitud, los términos antagonista y bloqueante se usan de manera intercambiable.

Con el término "encefalopatía hepática de tipo A" se quiere decir típicamente encefalopatía hepática asociada con insuficiencia hepática aguda, típicamente asociada con edema cerebral.

25 Con el término "encefalopatía hepática de tipo B" se quiere decir típicamente encefalopatía hepática (baipás) provocada por derivación portosistémica sin hepatopatía intrínseca asociada.

Con el término "encefalopatía hepática de tipo C" se quiere decir típicamente encefalopatía hepática que se produce en pacientes con cirrosis, este tipo se subdivide en encefalopatía *episódica*, *persistente* y *mínima*.

Con el término "encefalopatía hepática mínima" se quiere decir típicamente encefalopatía hepática que no da lugar a disfunción cognitiva clínicamente sintomática, pero que se puede demostrar con estudios neuropsicológicos.

30 Con el término "encefalopatía hepática sintomática" se quiere decir típicamente encefalopatía hepática clínicamente evidente manifestada como síndrome neuropsiquiátrico con un gran espectro de trastornos mentales y motores. La encefalopatía hepática sintomática puede surgir episódicamente, durante un periodo de horas o días en pacientes previamente estables o los pacientes pueden presentar anomalías neuropsiquiátricas persistentes.

35 Con el término "hiperamoniemia" se quiere decir típicamente un trastorno metabólico caracterizado por un exceso de amoniaco en la sangre.

40 Con el término "trasplante de hígado" se quiere decir típicamente una intervención quirúrgica para extraer un hígado afectado, por ejemplo, como consecuencia de insuficiencia hepática aguda o cirrosis, y reemplazarlo por un hígado sano de un donante. La mayoría de las operaciones de trasplante de hígado usan hígados de donantes fallecidos, pero un hígado también puede proceder de un donante vivo (una porción de un hígado de una persona sana). Los pacientes con cirrosis, por ejemplo, experimentan comúnmente encefalopatía hepática y la encefalopatía hepática preoperatoria es un factor pronóstico significativo de complicaciones neurológicas postrasplante.

Con el término "insuficiencia hepática crónica agudizada" se quiere decir típicamente descompensación aguda de cirrosis, al menos una insuficiencia orgánica, o pertenece a un subgrupo con una alta tasa de mortalidad a corto plazo.

45 Con el término "cirrosis compensada" se quiere decir típicamente cirrosis hepática sin ninguna prueba clínica, pero puede incluir varices esofágicas o gástricas asintóticas y primeros síntomas, tales como fatiga y pérdida de energía, pérdida de apetito y pérdida de peso, náuseas o dolor abdominal.

50 Con el término "cirrosis descompensada" se quiere decir típicamente cirrosis hepática avanzada con una serie de pruebas clínicas, tales como ictericia, ascitis, edema, encefalopatía hepática, hemorragia digestiva, hipertensión portal, infecciones bacterianas o cualquier combinación.

Con el término "hipertensión portal" se quiere decir típicamente un gradiente de presión venosa hepática después de cirrosis hepática, con o sin derivación portosistémica intrahepática transyugular (TIPS) asociada.

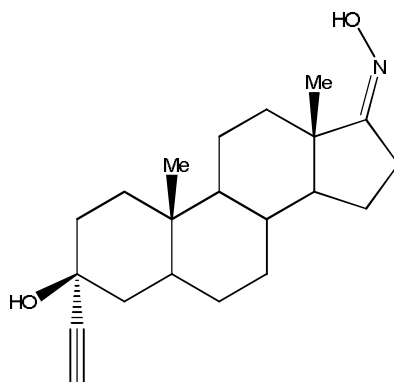
Con el término "prevención" en esta divulgación, se quiere decir típicamente la prevención de que se produzca enfermedad o trastorno de encefalopatía hepática.

Con el término "alivio" en esta divulgación, se quiere decir típicamente la reducción de o liberación de la enfermedad o trastorno de encefalopatía hepática.

- 5 Los pacientes que padecen encefalopatía hepática pueden presentar síntomas, incluyendo, pero no limitados a, deterioros del ciclo de sueño-vigilia, cognición, memoria, aprendizaje, coordinación motora, conciencia, niveles de energía disminuidos y cambio de personalidad, deterioro cognitivo, desorientación y coma.

Los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona puede ser útil para el tratamiento de encefalopatía hepática.

- 10 En un primer aspecto de la invención, se proporciona el compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática.

En un modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo A.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo B.

- 15 En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo C.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática mínima.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática sintomática.

En otro modo de realización de la invención, dicho compuesto para su uso es en el que se trata dicha encefalopatía hepática en un paciente con insuficiencia hepática aguda.

- 20 En otro modo de realización de la invención, dicho compuesto para su uso es en el que se trata dicha encefalopatía hepática en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada.

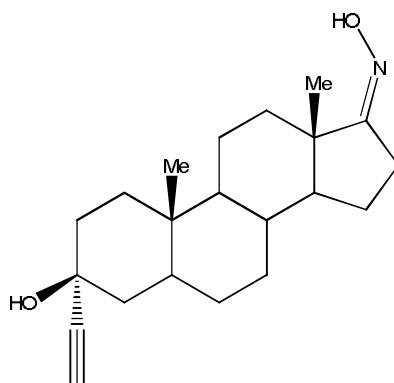
En otro modo de realización de la invención, dicho compuesto para su uso es para la prevención o alivio de encefalopatía hepática, tal como encefalopatía hepática de tipo A, encefalopatía hepática de tipo B, encefalopatía hepática de tipo C, encefalopatía hepática mínima, encefalopatía hepática sintomática, en un paciente con insuficiencia hepática aguda, o en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada.

- 25

En otro modo de realización de la invención, dicho compuesto para su uso se proporciona antes, durante o después de un trasplante de hígado.

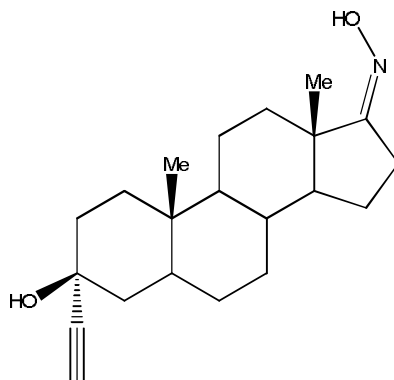
- 30 En otro modo de realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática, junto con uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

También se desvela el compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hipertensión portal. Dicho uso también puede ser la prevención o alivio de la hipertensión portal. El paciente con hipertensión portal padece típicamente una hepatopatía, tal como una hepatopatía crónica, cirrosis o insuficiencia hepática aguda.

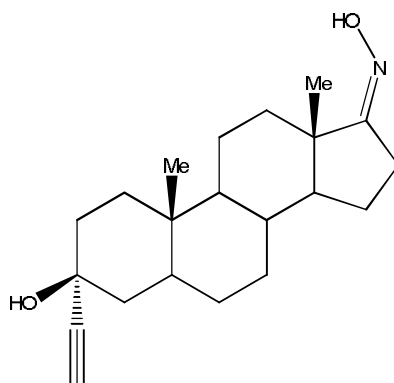
- 5 También se desvela un procedimiento de tratamiento de hipertensión portal, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, a un paciente que la necesita. Dicho procedimiento también puede ser en la prevención o alivio de la hipertensión portal. El paciente con hipertensión portal padece típicamente una hepatopatía, tal como una hepatopatía crónica, cirrosis o insuficiencia hepática aguda.

10

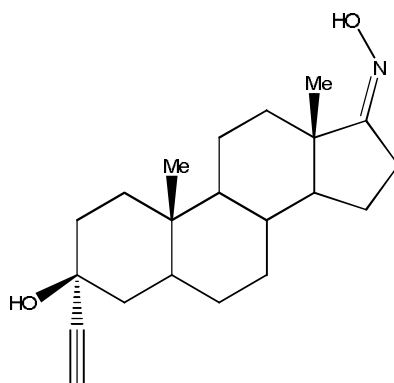
En otro aspecto de la invención, se proporciona el compuesto oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la descompensación hepática. Dicho uso también puede ser la prevención o alivio de la descompensación hepática. El paciente con descompensación hepática padece típicamente una hepatopatía, tal como una hepatopatía crónica, o se puede sospechar que tenga un acontecimiento desencadenante, tal como hemorragia digestiva, infección, trombosis de la vena porta o deshidratación.

15

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del compuesto oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar la encefalopatía hepática.

En un modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo A.

5 En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo B.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo C.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática mínima.

En otro modo de realización de la invención, dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática sintomática.

10 En otro modo de realización de la invención, dicho uso es en el que se trata dicha encefalopatía hepática en un paciente con insuficiencia hepática aguda.

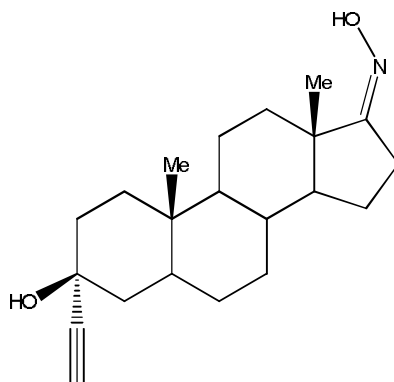
En otro modo de realización de la invención, dicho uso es en el que se trata dicha encefalopatía hepática en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada.

En otro modo de realización de la invención, dicho uso se proporciona antes, durante o después de un trasplante de hígado.

15 En otro modo de realización de la invención, dicho uso del compuesto oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento, pueden ser para la prevención o alivio de encefalopatía hepática, tal como encefalopatía hepática de tipo A, encefalopatía hepática de tipo B, encefalopatía hepática de tipo C, hepática encefalopatía mínima, encefalopatía hepática sintomática, en un paciente con insuficiencia hepática aguda, o en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada.

20 En otro modo de realización de este aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática, junto con vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dicho uso también puede ser en la prevención o alivio de encefalopatía hepática.

25 También se desvela el compuesto oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inhibición o tratamiento de los síntomas provocados por hiperamonemia.

- Un modo de realización adicional de la invención es el compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona para su uso en el tratamiento o prevención de encefalopatía hepática, tal como encefalopatía hepática de tipo A, encefalopatía hepática de tipo B, encefalopatía hepática de tipo C, encefalopatía hepática mínima, encefalopatía hepática sintomática, en un paciente con insuficiencia hepática aguda o en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada; en el que dicho tratamiento o prevención comprende la coadministración de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un compuesto que reduce el nivel de amoniaco, tal como rifaximina, lactulosa, fenilacetato de ornitina y fenilbutirato de glicerol, preferentemente el compuesto que reduce el nivel de amoniaco es rifaximina o lactulosa, y lo más preferentemente el compuesto que reduce el nivel de amoniaco es rifaximina.
- Un modo de realización adicional de la invención es el uso del compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de encefalopatía hepática, tal como encefalopatía hepática de tipo A, encefalopatía hepática de tipo B, encefalopatía hepática de tipo C, encefalopatía hepática mínima, encefalopatía hepática sintomática, en un paciente con insuficiencia hepática aguda o en un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática crónica agudizada; en el que dicho tratamiento o prevención comprende la coadministración de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un compuesto que reduce el nivel de amoniaco, tal como rifaximina, lactulosa, fenilacetato de ornitina y fenilbutirato de glicerol, preferentemente el compuesto que reduce el nivel de amoniaco es rifaximina o lactulosa, y lo más preferentemente el compuesto que reduce el nivel de amoniaco es rifaximina.
- Un aspecto adicional de la invención es el compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, en el que uno o más átomos de hidrógeno en cada posición de sustituyente posible se puede sustituir con deuterio o tritio, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática, tal como encefalopatía hepática mínima o encefalopatía hepática sintomática.
- Un aspecto adicional de la invención es el compuesto oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, en el que uno o más átomos de hidrógeno en cada posición de sustituyente posible se puede sustituir con deuterio o tritio, para su uso en ensayos de uso que implican determinar la concentración del compuesto en tejido o fluidos.
- De acuerdo con la presente invención, se puede administrar la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a través de una de las siguientes vías de administración: por vía intravenosa, nasal, rectal, bucal, intravaginal, percutánea, intramuscular y oral. De acuerdo con un modo de realización, la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona se administra por vía intravenosa. De acuerdo con otro modo de realización, la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona se administra por vía nasal. La administración percutánea, usando oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona formulada como una crema, un gel y una pomada o en forma de parches adhesivos de medicamento de liberación lenta, es otra posible forma de administración, similarmente adecuada para la automedicación.
- La composición farmacéutica se puede adaptar o ajustar de acuerdo con procedimientos farmacológicos normales, que comprenden la sustancia farmacéutica eficaz en una forma química, adecuada para la vía elegida, junto con adyuvantes, excipientes, diluyentes y vehículos adecuados, usados convencionalmente y bien conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, los adyuvantes y vehículos usados convencionalmente para la administración oral son cargas o agentes en suspensión como dióxido de titanio, lactosa anhidra, sílice, sílice coloidal, metilcelulosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y similares. Por ejemplo, los adyuvantes y vehículos usados convencionalmente para la administración intravenosa son agua para inyecciones (API) estéril, tampones estériles (por ejemplo, tamponar la solución a pH 7,4) solución de albúmina, soluciones de lípidos, ciclodextrinas y similares. Por ejemplo, los adyuvantes y vehículos usados convencionalmente para la administración transdérmica son vaselina, vaselina líquida, glicerol, agua, aceite de TCM, aceite de sésamo, aceites vegetales y similares. Por supuesto, la dosis varía dependiendo del modo de administración, la afección particular que se va a tratar o el efecto deseado, sexo, edad, peso y salud del paciente, así como posiblemente otros factores, evaluados por el médico responsable.

La invención se describe ahora mediante una serie de ejemplos ilustrativos no limitantes.

Ejemplo 1.

50 Síntesis de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona

Etapa 1: Síntesis de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-97-ona

- Se disolvió 3,17-androstandiona (5,0 mmol) en 50 ml de THF seco a temperatura ambiente (ta) en nitrógeno. Se añadió gota a gota bromuro de etnil magnesio (1,1 equiv.) a ta con agitación y la solución se dejó agitar durante la noche a ta en flujo de nitrógeno. A continuación, se desactivó la solución con NH₄Cl_(aq) saturado y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3 x 30 ml). Se evaporaron a presión reducida las fases orgánicas recogidas, se disolvió el aceite amarillo resultante en diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. Se redujo a vacío la solución y se purificó el residuo por cromatografía en columna ultrarrápida de sílice (1:4 éter dietílico:diclorometano), rendimientos típicos de un 65 %. Se pueden eliminar trazas finales de subproductos mediante recristalización

adicional a partir de éter dietílico.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3-d_6): δ 2,43 (s, 1H); 2,42 (m, 1H); 2,10-2,04 (m, 2H); 1,02 (m, 1H); 0,86 (s, 3H); 0,83 (s, 3H).

Etapa 2: Síntesis de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona

5 Se disolvió 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (10 mmol) en 5 ml de diclorometano y 50 ml de etanol a temperatura ambiente y atmósfera de aire, en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Se disolvieron 4 equiv. de clorhidrato de NH_2OH y 4 equiv. de acetato de sodio en 5 ml de H_2O y, a continuación, se añadió a la solución esteroidea. Se añadieron 20 ml de etanol y la mezcla se puso a reflujo durante la noche. A continuación, se enfrió la mezcla y se retiró el disolvente a presión reducida. Se trató el residuo blanco con 50 ml de H_2O y 50 ml de diclorometano, se extrajo la fase acuosa con 3 x 30 ml de diclorometano. A continuación, se secaron las fases orgánicas recogidas sobre MgSO_4 , se filtraron y se retiró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo final mediante cromatografía en columna ultrarrápida de sílice: diclorometano:éter dietílico 4:1, rendimientos típicos de un 95-100 % (cuantitativo).

10 RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3-d_6): δ 2,51-2,47 (m, 2H); 2,43 (s, 1H); 1,00 (m, 1H); 0,80 (m, 1H); 0,90 (s, 3H); 0,83 (s, 3H).

Ejemplo 2.

Efecto terapéutico de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en modelo animal de encefalopatía hepática

Programa de tratamiento y pruebas

20 En este estudio se usó un modelo animal de hiperamonemia crónica que reproduce muchas de las alteraciones cognitivas y motoras presentes en la encefalopatía hepática. Se alimentó a las ratas con amoníaco en su alimento y, después de dos semanas con alimento enriquecido en amoníaco, desarrollaron síntomas de encefalopatía hepática. Se hizo la prueba de la barra de equilibrio durante la 3.^a y 4.^a semana de tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, mientras que se hizo la prueba del laberinto acuático de Morris durante la 4.^a-5.^a semana de tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona y se hizo la prueba del laberinto radial durante la 6.^a-7.^a semana de tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

30 El estudio se dividió en dos series con animales (ratas Wistar macho), cada serie incluyó los siguientes grupos; controles tratados con vehículo (CV, n=8 por serie), controles tratados con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (C+GAM, n=8 por serie), ratas con hiperamonemia tratadas con vehículo (HAV, n=8 por serie), ratas con hiperamonemia tratadas con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (HA+GAM, n=8 por serie). El tratamiento una vez al día con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 20 mg/kg o con vehículo se realizó con inyecciones subcutáneas de 1 ml/kg alrededor de las 9 a. m. El tratamiento comenzó una semana después de comenzar con la dieta que contenía amonio y continuó durante todo el periodo experimental.

35 Se preparó el artículo de prueba de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona como una suspensión en aceite de sésamo a 20 mg/kg.

Aprendizaje espacial en el laberinto radial

40 Se diseñó el laberinto radial como un procedimiento para evaluar el aprendizaje espacial. El aparato está compuesto de un área central que da acceso a ocho brazos de igual tamaño. Los brazos fueron de 70 cm de largo y 10 cm de ancho y el área central fue de 30 cm de diámetro. El laberinto se hizo de plexiglás negro y se elevó 80 cm por encima de suelo. Cada brazo tenía paredes laterales con una altura mayor en el lado proximal con respecto al área central (30 cm) que en el lado distal (5 cm). En el extremo distal de cada brazo, se instaló un recipiente ranurado para posicionar las recompensas de alimento (Hernandez-Rabaza V. *et al* 2010).

45 Para habituar a las ratas al laberinto, se dejó que las ratas exploraran el laberinto durante 10 minutos en dos días consecutivos en presencia de indicaciones distales (carteles y objetos de diferentes tamaños), que permanecieron en el lugar durante todo el entrenamiento.

50 El entrenamiento en el laberinto radial estuvo compuesto de cinco bloques de tres ensayos cada uno, realizados en diez días consecutivos. La tarea implicaba localizar cuatro bolas, cada una colocada en el extremo de un brazo diferente de acuerdo con una configuración aleatoria. Las configuraciones fueron específicas para cada rata y se mantuvieron invariables durante todo el entrenamiento. Se calcularon el número de errores de referencia espaciales y la memoria operacional y se expresaron como número de referencia y errores operacionales por bloque. Además, se usó un índice de aprendizaje para evaluar el aprendizaje de la tarea y se definió como número de errores de referencia de elecciones acertadas (Hernandez-Rabaza *et al.* 2010).

Resultados

Oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restableció el aprendizaje espacial de ratas con hiperamonemia en el

laberinto radial. Las ratas con hiperamonemia muestran aprendizaje espacial reducido y cometen más errores operacionales en la tarea del laberinto radial. La memoria espacial se restableció completamente por oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona (figura 2).

Ejemplo 3.

5 Efecto terapéutico de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en modelo animal de encefalopatía hepática

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como se expone en el ejemplo 2.

Memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

10 Se diseñó el laberinto como un procedimiento para evaluar el aprendizaje espacial (Morris R. 1984). Se llevó a cabo la prueba usando una piscina circular de color negro (160 cm de diámetro, 40 cm de altura) dividida de manera arbitraria en cuatro cuadrantes. Se obtuvo la opacidad del agua añadiendo pintura de color negro. Se sumergió una plataforma de plexiglás transparente, de 10 cm de diámetro, 2 cm por debajo de la superficie del agua en el centro de un cuadrante durante las sesiones de entrenamiento (Monfort *et al.*, *European Journal of Neuroscience*, 2007, 25, 2103-211).

15 La prueba se llevó a cabo como sigue; el primer día fue el día de preentrenamiento, las ratas se introdujeron dos veces en el agua durante 30 s únicamente para adaptarse al agua. A continuación, las ratas se entrenaron para que aprendieran la localización fija de la plataforma invisible durante 3 días. Cada ensayo de entrenamiento implicó colocar a la rata en la piscina orientada hacia la pared en uno de los tres cuadrantes sin plataforma. Se usó aleatoriamente un punto de partida diferente en cada ensayo. El entrenamiento consistió en cinco baños por día. Se dejó a cada animal un máximo de 120 s para que encontrara la plataforma y se dejó durante 15 s en la plataforma, si una rata no logró localizar la plataforma en 120 s se guió manualmente hacia la plataforma por el experimentador. El objetivo de esta prueba es que las ratas aprendan dónde está colocada la plataforma invisible y la alcancen en el menor tiempo posible. Se registró el tiempo, la velocidad y la trayectoria necesarios para encontrar la plataforma oculta mediante un sistema de seguimiento de vídeo proporcionado por Viewpoint Company (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D` Or, Francia) y se usó como una medida del aprendizaje de la tarea. Después del 15.º ensayo de entrenamiento, se retiró la plataforma de la piscina, se dejó que las ratas nadaran durante 90 s en la piscina y se registró el tiempo invertido en el cuadrante donde estaba posicionada la plataforma durante el entrenamiento.

30 **Resultados**

Oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restableció completamente la memoria espacial de ratas con hiperamonemia en el laberinto acuático de Morris. Las ratas con hiperamonemia mostraron memoria reducida y necesitaron más tiempo que los controles para encontrar la plataforma (figura 3).

Ejemplo 4.

35 Efecto terapéutico de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en modelo animal de encefalopatía hepática

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como se expone en el ejemplo 2.

Coordinación motora en la barra de equilibrio

40 En la prueba de la barra de equilibrio, se entrena a las ratas para que atraviesen una barra estrecha elevada para alcanzar una plataforma de escape cerrada. La barra está hecha de madera lisa redondeada (20 mm de diámetro). La barra está elevada 1 m del suelo. Los parámetros de coordinación motora medidos son: resbalones del pie (o fallos del pie) y latencia para atravesar la barra. (Jover *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2010). Para habituar a la rata, el experimentador coloca a la rata en el principio de la barra y ayuda a la rata a cruzar tres veces la barra. Después de eso, la prueba consiste en tres ensayos consecutivos. Se registró el número de veces que la pata trasera izquierda o derecha resbala de la barra para cada ensayo.

Resultados

50 Oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona invirtió completamente la descoordinación motora de ratas con hiperamonemia en la prueba de la barra de equilibrio. Las ratas con hiperamonemia mostraron descoordinación motora (número incrementado de resbalones=fallos del pie) (figura 4).

Ejemplo 5.

Concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en plasma y tejido cerebral después de administración exógena

Obtención de plasma

5 Se obtuvo sangre de la cola de las ratas (del ejemplo 2) al final de la segunda semana de tratamiento con amoniaco y la primera semana de tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona y también del cuello durante el sacrificio de los animales. Para obtener el plasma se añadió EDTA 7,5 nM y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.

Determinación de amoniaco

10 Se midió la concentración de amoniaco en muestras de sangre usando el Pocket chem BA (Woodley Equipment Company Ltd, Reino Unido), un analizador de amoniaco. El dispositivo posibilita pruebas inmediatas y ofrece resultados en 3 minutos y 20 s. También elimina la necesidad de procedimientos previos, tales como separación centrífuga.

Sacrificio

15 Las ratas se sacrificaron por decapitación. Se recogió una mitad del cerebro incluyendo el cerebelo y se conservó a -80 °C para la determinación de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. Se disecaron diferentes áreas cerebrales (cerebelo, corteza, hipocampo y cuerpo estriado) y se conservaron a -80 °C para la posible determinación de GAMS.

Análisis de la concentración de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona

20 Se analizaron las muestras de cerebro y plasma recogidas para determinar las concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. Se descongelaron las muestras de plasma y cerebro a temperatura ambiente. El plasma se sometió a precipitado de proteínas con un volumen de 3 veces con acetonitrilo y se homogeneizó el tejido cerebral con una proporción 1:4 de tejido:PBS (pH 7,4) y, a continuación, se extrajo con un volumen de 2 veces de metanol:acetonitrilo (1:1) durante 20 min durante la sonicación. Luego se agitaron las muestras y se centrifugaron durante 10 min a 10 000 x g (centrifugadora Heraeus Pico 17). A continuación, se diluyó el sobrenadante con un volumen equivalente de PBS y se analizó. Algunas muestras se volvieron a analizar como diluciones de 10 veces debido a la concentración demasiado alta de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. Las diluciones se hicieron con una solución de acetonitrilo al 37,5 % en tampón de PBS.

Los patrones se prepararon agregando homogeneizado de cerebro/plasma blanco en las concentraciones 0,5-5 000 ng/ml y se trataron de otro modo que las muestras. La determinación se realizó con CL-EM.

30 *Resultados*

Determinación de amoniaco: La oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afectó a los niveles de amoniaco en sangre. Los niveles de amoniaco en sangre se incrementan en ratas alimentadas con la dieta de amonio (167 \pm 17 μ M) en comparación con ratas de control (47 \pm 3 μ M). La oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afectó a los niveles de amoniaco en sangre en ratas de control (55 \pm 7 μ M) o en ratas con hiperamonemia (139 \pm 15 μ M) (figura 1). Estos resultados son sorprendentes, puesto que todos los estudios anteriores que mostraron un efecto sobre los síntomas de encefalopatía hepática tienen niveles de amoniaco disminuidos.

Determinación de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona después de la exposición

40 En el presente estudio, se analizó la concentración total de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en plasma en el día de tratamiento cinco y en la última semana de tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, cuatro horas y 23 horas después de la inyección, respectivamente. Las concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en plasma se muestran en la figura 5 y las concentraciones cerebrales en la figura 6. En el día de tratamiento cinco, las concentraciones de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona fueron más bajas 23 horas después de la inyección que 4 horas después de la inyección, mientras que en la última semana de tratamiento se encontraron concentraciones similares de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona tanto 4 horas como 23 horas en ambos grupos, respectivamente. En el cerebro, se encontraron concentraciones similares de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el control (91 \pm 4,1 nmol/kg de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no unida*) y en ratas con HA (106 \pm 15,4 nmol/kg de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no unida*), 1-2 h después del último tratamiento (Fig. 6). Las concentraciones mostraron sorprendentes altos niveles y concentraciones estables durante las 24 horas.

50 *Concentración cerebral no unida=fracción de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el cerebro que no está unida a proteína transportadora o tejido cerebral.

Ejemplo 6.

Capacidad de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona de antagonizar el efecto de THDOC, pero no

GABA en el receptor GABA_A.*Electrofisiología de fijación de voltaje de células enteras con receptores GABA_A α1β2γ2L y α5β3γ2L.*

Para las mediciones de electrofisiología se usó el sistema Dynaflo® con el Resolve chip (Celletricon, Göteborg, Suecia). Se transfectaron de manera permanente células HEK-293 con vectores incluyendo el promotor de CMV humano para la expresión constitutiva de las subunidades del receptor GABA_A α5, β3 y γ2L humano (α5β3γ2L) o las subunidades del receptor GABA_A α1, β2 y γ2L humano (α1β2γ2L). Las líneas celulares usadas se seleccionaron por su buena reactividad con respecto a GABA y con respecto a THDOC. Antes de las mediciones, se incubaron las células durante 15 min a 37 °C en un 95 % de aire + un 5 % de CO₂ en solución extracelular (EC) que contenía lo siguiente: NaCl 137 mM, KCl 5,0 mM, CaCl₂, 1,0 mM, MgCl₂, 1,2 mM, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM, DMSO al 0,1 %, pH 7,4. Luego se añadieron células desprendidas a la solución EC en el baño de chip de Dynaflo.

Se hicieron registros de fijación de voltaje de células enteras a temperatura ambiente (21-23 °C, -17 mV con una compensación del potencial de unión líquida como en Haage et al., 2002; Neher, 1992). Se generaron impulsos de comando y se recogieron los datos mediante el software PClamp 9.0, convertidor DigiData 1322A y AxonPatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA). Se llenaron los electrodos de membrana (2-6 MΩ) con solución intracelular (IC) que incluía: Cs-gluconato 140 mM, NaCl 3,0 mM, MgCl₂ 1,2 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1,0 mM, Mg-ATP 2 mM, DMSO al 0,1 %, pH 7,2.

Se disolvieron THDOC y oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se diluyeron con solución EC para incluir DMSO al 0,1 %.

Se usaron diferentes protocolos para diferentes mediciones de electrofisiología. Como los receptores GABA_A α1β2γ2L *in vivo* están presentes en la sinapsis, se usó una condición que se parecía a esta situación, una aplicación corta (40 ms) de una concentración de GABA alta (30 μM). Por el contrario, los receptores GABA_A α5β3γ2L están presentes extrasinápticamente, de esta manera, las condiciones usadas fueron exposiciones largas (6 s) con respecto a una concentración de GABA baja (0,3 μM). Se usó la concentración de EC₇₅ de THDOC, es decir, 100 nM con estudios de α1β2γ2L y 200 nM cuando se evaluaron las células que expresaban α5β3γ2L. Con ambos tipos de células, se usó una preexposición con THDOC o THDOC más 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona antes de la aplicación de GABA.

Se normalizaron los efectos de los esteroides en presencia de GABA a los controles a fin de evitar los efectos de la variación inter e intracelular en los parámetros medidos, se usó cada célula como su propio control y se analizó el área bajo la curva (ABC).

Resultados

Se estudiaron los efectos de la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona en el receptor GABA_A con mediciones electrofisiológicas en células HEK293 recombinantes que expresaban variantes humanas del receptor. La activación potenciada con THDOC 100 nM del receptor GABA_A α1β2γ2L en presencia de GABA se muestra en la Fig. 7.

La oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona (1 μM) antagoniza parcialmente el efecto de THDOC en ambas de las variantes de subunidades α1β2γ2L como α5β3γ2L del receptor GABA_A (figura 8 A y C). Con los receptores α1β2γ2L, la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona inhibe un 29±4,7 % de la potenciación con THDOC de GABA ($P < 0,001$), y con el receptor α5β3γ2L, la inhibición es de un 49±4,7 % ($P < 0,001$, tabla 1).

Por el contrario, la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona (1 μM) no antagoniza la activación de GABA del receptor GABA_A (Fig 8 B y D). No hay efecto significativo de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona ni en el receptor GABA_A α1β2γ2L (-3,1±1,7 %, NS) ni tampoco el receptor GABA_A α5β3γ2L (-3,8±1,5 %, NS) cuando GABA es el único activador del receptor (tabla 1).

Tabla 1. Capacidad de la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona (GAMSA) de antagonizar THDOC, pero no GABA en el receptor GABA_A.

Receptor GABA _A	[GAMSA] μM	[GABA] μM	[THDOC] nM	Efecto de GAMSA	Valor de <i>p</i>
α1β2γ2L	1	30	100	-29 ± 4,7 %	< 0,001
	1	30	-	-3,1 ± 1,7 %	> 0,05, NS
α5β3γ2L	1	0,3	200	-49 ± 4,7 %	< 0,001
	1	0,3	-	-3,8 ± 1,5 %	> 0,05, NS

Ejemplo 7.**Selectividad de la oxima de 3α-etinil-3β-hidroxiandrostan-17-ona sobre otras dianas y receptores.**

Se determinó la unión de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona para los receptores, canales de iones y enzimas, incluyendo todas las clases principales de receptores de neurotransmisores. En total, se sometieron a prueba por duplicado 113 dianas de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 10 μ M (Perkin Elmer, pantalla personalizada). La actividad de unión se definió como mayor que o igual a un 50 % de inhibición de unión a ligando.

5 *Resultados*

A 10 μ M, la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no mostró actividad de unión en ninguno de los receptores relacionados con neurotransmisores, receptores de esteroides o receptores de péptidos estudiados.

Ejemplo 8.

10 **Efecto terapéutico de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en la coordinación motora de ratas con EH y anastomosis porto-cava.**

Programa de tratamiento y pruebas

Hiperamonemia crónica en ratas. Se hizo que las ratas Wistar macho (140-160 g) tuvieran hiperamonemia alimentándolas con una dieta que contenía acetato de amonio (30 % en peso) (Felipo *et al*, *European Journal of Biochemistry*, 1988, 176, 567-571).

15 *Anastomosis porto-cava.* Se anestesiaron ratas Wistar macho (220-240 g) con isoflurano, y se realizó una anastomosis porto-cava terminolateral como se describe por Lee y Fisher (*Surgery*, 1961, 50, 668-672). Las ratas de control se operaron de manera simulada; se les fijó la vena porta y la vena cava inferior durante 10 min.

En el presente documento se hace referencia a las ratas que se sometieron al procedimiento de anastomosis porto-cava como ratas con "PCS".

20 Se tomaron medidas adecuadas para minimizar el dolor y el malestar en los animales. Los experimentos se aprobaron por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) del centro y se realizaron de acuerdo con las directrices de la Directiva de la Comisión Europea (2010/63/EU) y la legislación española (RD 1201/2005 para el cuidado y manejo de animales de experimentación).

25 *Tratamiento con oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.* Se administró la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en aceite de sésamo mediante inyecciones subcutáneas en el lomo de las ratas, una vez al día. Se realizaron dos conjuntos diferentes de experimentos en ratas con hiperamonemia. En el primera conjunto, se usaron cuatro grupos de ratas: 1) ratas de control a las que se inyectó vehículo; 2) ratas con hiperamonemia a las que se inyectó vehículo; 3) ratas de control a las que se inyectó 20 mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona y 4) ratas con hiperamonemia a las que se inyectó 20 mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

30 Las ratas de control a las que se inyectó la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no se incluyeron luego porque se no encontró ningún efecto pertinente en estas ratas.

35 En el segundo conjunto de experimentos, se usaron cinco grupos de ratas: 1) ratas de control a las que se inyectó vehículo; 2) ratas con hiperamonemia a las que se inyectó vehículo y 3-5) ratas con hiperamonemia a las que se inyectó 3, 10 o 20 mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. En cada experimento, se usaron 6-8 ratas por grupo.

40 Para los experimentos que usaban ratas con PCS, se usaron los siguientes grupos de ratas: 1) ratas con simulación a las que se inyectó vehículo; 2) ratas con PCS a las que se inyectó vehículo; 3-4) ratas con PCS a las que se inyectó 0,7 o 2,5 mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona. El número de ratas usadas en cada experimento se muestra en la figura correspondiente o bien se da en la descripción de la figura correspondiente.

Análisis estadístico.

45 Los datos mostrados son la media \pm EEM del número de ratas indicadas en cada figura. Se estimó la significación estadística con ANOVA bidireccional y prueba posterior de Bonferroni y con la prueba de la t de Student cuando se comparó un único parámetro. Los análisis se realizaron usando el software GraphPad PRISM para Windows (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).

Coordinación motora. Prueba de la barra de equilibrio.

50 Se sometió a prueba la coordinación motora como se describe por Gonzalez-Usano *et al* (ACS Chemical Neuroscience, 2014, 19, 5(2), 100-105) usando una barra de madera (20 mm de diámetro). Se hizo que las ratas atravesaran una barra de madera un metro de largo localizada aproximadamente un metro por encima del suelo, y se registró el número de fallos del pie (resbalones) por dos observadores. Se entrenó a las ratas para la prueba al hacer que atravesaran la barra hasta cinco veces antes de que se registraran las mediciones. El número de fallos del pie (resbalones) es una medida de la descoordinación motora.

Resultados

La oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona demostró restablecer la coordinación motora, tanto para las ratas con hiperamonemia como con PCS.

5 Las ratas con hiperamonemia muestran descoordinación motora en la prueba de la barra de equilibrio, con un número más alto ($p<0,05$) de resbalones ($1,4\pm 0,1$) que las ratas de control ($1,0\pm 0,1$). El tratamiento con la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restablece la coordinación motora en ratas con hiperamonemia (Fig. 9A). Los efectos fueron estadísticamente significativas para las dosis de 3 mg/kg ($0,8\pm 0,1$ resbalones, $p<0,05$) y 20 mg/kg ($0,78\pm 0,07$ resbalones, $p<0,05$).

10 Las ratas con PCS también muestran descoordinación motora en la prueba de la barra de equilibrio, con un número más alto ($p<0,01$) de resbalones ($1,2\pm 0,1$) que las ratas de control operadas de manera simulada ($0,71\pm 0,07$). El tratamiento con la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona también restablece la coordinación motora en ratas con PCS (Fig. 9B). El número de resbalones para la dosis de 0,7 mg/kg fue de $0,75\pm 0,10$ ($p<0,05$ frente a ratas con PCS). A 2,5 mg/kg, la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona también mejoró la coordinación motora, regresando a valores similares a los de ratas con simulación ($0,8\pm 0,1$ resbalones; p frente a ratas con PCS=0,058) (Fig. 9B).

Ejemplo 9.**Efecto terapéutico de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en la memoria espacial y aprendizaje espacial de ratas con EH y anastomosis porto-cava.***Programa de tratamiento y pruebas*

20 El programa de tratamiento y pruebas fue como expone en el ejemplo 8.

Memoria y aprendizaje espaciales en la prueba del laberinto acuático de Morris.

25 La prueba se llevó a cabo como se describe por Monfort *et al.* (*European Journal of Neuroscience*, 2007, 25, 2103-2111) usando una piscina circular (160 cm de diámetro, 40 cm de altura) dividida de manera arbitraria en cuatro cuadrantes. Después del preentrenamiento, las ratas se entrenaron para que aprendieran la localización fija de la plataforma invisible durante 3 días. El entrenamiento implicó colocar a la rata en la piscina orientada hacia la pared en uno de los tres cuadrantes sin plataforma. Se usó aleatoriamente un punto de partida diferente en cada ensayo. El entrenamiento consistió en tres baños por día. Se dejó a cada animal un máximo de 120 segundos para que encontrara la plataforma y se dejó durante 20 segundos en la plataforma. Si una rata no logró localizar la plataforma en 120 segundos se guió manualmente hacia la plataforma por el experimentador. Se registró manualmente el tiempo necesario para encontrar la plataforma oculta y se usó como una medida del aprendizaje de la tarea.

30 Se evaluó la memoria espacial 24 horas más tarde retirando la plataforma y midiendo el tiempo invertido por la rata en el cuadrante donde estaba la plataforma.

Resultados.

35 Se demostró que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restableció la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris en ratas con hiperamonemia y con PCS.

Las ratas con hiperamonemia mostraron memoria espacial reducida en el laberinto acuático de Morris. Todos los grupos de ratas aprendieron a encontrar la plataforma y la latencia para alcanzarla se redujo a lo largo de los tres días de entrenamiento (Fig. 10A). La capacidad de aprendizaje se redujo ligeramente en ratas con hiperamonemia, que necesitaban más tiempo que el control para alcanzar la plataforma.

40 La memoria espacial se redujo significativamente ($p<0,05$) en ratas con hiperamonemia. En la prueba de memoria, las ratas con hiperamonemia permanecieron menos tiempo (30 ± 2 % del tiempo) en el cuadrante acertado que las ratas de control (39 ± 2 % del tiempo). El tratamiento con 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restableció la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas con hiperamonemia. Los porcentajes de tiempo invertido en el cuadrante correcto fueron 41 ± 4 , 42 ± 5 y 38 ± 3 , para dosis de 3, 10 y 20 mg/kg, respectivamente (Fig. 10B).

45 Las ratas con PCS también mostraron memoria espacial reducida en el laberinto acuático de Morris. Todos los grupos de ratas aprendieron a encontrar la plataforma y la latencia para alcanzarla se redujo a lo largo de los tres días de entrenamiento (Fig. 10C). La memoria espacial se redujo significativamente ($p<0,05$) en ratas con PCS. En la prueba de memoria, las ratas con PCS permanecieron menos tiempo (31 ± 3 % del tiempo) en el cuadrante acertado que las ratas de control (41 ± 2 % del tiempo). El tratamiento con 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restableció la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas con PCS. Los porcentajes de tiempo invertido en el cuadrante correcto fueron de 34 ± 4 y 39 ± 3 , para dosis de 0,7 y 2,5 mg/kg, respectivamente (Fig. 10D).

50

Ejemplo 10.

Efecto terapéutico de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en el aprendizaje espacial de ratas con EH y anastomosis porto-cava.

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como expone en el ejemplo 8.

5 *Aprendizaje espacial en la prueba del laberinto radial.*

El aparato estaba compuesto de un área central que daba acceso a ocho brazos de igual tamaño. Los brazos fueron de 70 cm de largo y 10 cm de ancho y el área central fue de 30 cm de diámetro. El extremo distal de cada brazo tenía un recipiente que contenía recompensas de alimento. Se dejó que las ratas exploraran el laberinto durante 10 minutos en dos días consecutivos en presencia de indicaciones distales para adaptarse al laberinto. El entrenamiento en el laberinto radial estaba compuesto de tres ensayos por día en seis días consecutivos. La tarea implicaba localizar cuatro bolas, cada una colocada en el extremo de un brazo diferente de acuerdo con una configuración aleatoria, como se describe por Hernandez-Rabaza *et al.* (*Addiction Biology*, 2010, 15, 413-423). Se registró el número de errores de memoria operacional (visitas a brazos ya visitados en el mismo ensayo) y se expresaron como errores operacionales.

15 *Resultados*

Se descubrió que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona restablecía el aprendizaje espacial en la prueba del laberinto radial.

Las ratas con hiperamonemia muestran aprendizaje espacial reducido en el laberinto radial. Como se muestra en la Fig. 11A, el número de errores operacionales fue más alto en las ratas con hiperamonemia que en las de control en los días 1-3. Todos los grupos de ratas aprendieron a lo largo de los días de entrenamiento y la diferencia entre las ratas con hiperamonemia y de control no fue significativa después del día 3. (Fig. 11A). El número de errores operacionales en los días 1-2 fue más alto ($p < 0,05$) en las ratas con hiperamonemia (18 ± 3 errores) que en las de control ($11 \pm 1,5$ errores). Las ratas con hiperamonemia tratadas con la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona se comportaron como los controles. El número de errores (no significativamente diferentes de los controles) fue $6,5 \pm 2,8$, $8,8 \pm 1,9$ y 12 ± 2 , para las dosis de 3, 10 y 20 mg/kg, respectivamente (Fig. 11B-C).

Las ratas con PCS muestran aprendizaje espacial reducido en el laberinto radial. Como se muestra en la Fig. 11C, el número de errores operacionales fue más alto en las ratas con PCS que en las ratas con simulación en los días 1 y 2. Todos los grupos de ratas aprendieron a lo largo de los días de entrenamiento y la diferencia entre las ratas con simulación y con PCS no fue significativa después del día 3. (Fig. 11C). El número de errores operacionales en los días 1-2 (Fig. 11D) fue más alto ($p < 0,01$) en las ratas con PCS (22 ± 2 errores) que en las ratas con simulación (10 ± 2 errores). El tratamiento del ratas con PCS con 0,7 mg/kg de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no fue suficiente para mejorar el la ejecución en el laberinto radial (23 ± 2 errores). El tratamiento con 2,5 mg/kg normalizó completamente la ejecución de las ratas con PCS en el laberinto radial (11 ± 1 errores, $p < 0,05$ frente a PCS).

35 **Ejemplo 11.**

Efecto terapéutico de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en los ritmos circadianos y actividad motora nocturna en ratas con PCS.

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como expone en el ejemplo 8.

40 *Los ritmos circadianos de actividad locomotora espontánea.*

Se midió la actividad motora usando un actímetro (Med Associates, S t. Albans, VT). Las ratas se colocaron individualmente en una cámara de actividad de campo abierto (43 x 43 x 31 cm) y se registró continuamente la actividad motora durante 14 días en condiciones de luz-oscuridad (L:O), 12 h:12 h. Los datos se registraron en intervalos de 5 minutos. Se detectó la actividad motora mediante matrices de detectores de movimiento por infrarrojos, colocadas en tres direcciones, x, y y z. Se registra un recuento de deambulación mediante el aparato cuando la rata interrumpe tres detectores de infrarrojos consecutivos, en la posición x o y. Se registra un recuento vertical cuando la rata interrumpe detectores de infrarrojos en la posición z. El software permite medir diferentes parámetros de actividad motora, tales como recuentos de deambulación o recuentos verticales (Ahbrach *et al.* *Journal of Neuroscience Research*, 2010, 88, 1605-14).

50 *Resultados.*

Se descubrió que la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona incrementaba la actividad motora espontánea durante la noche y restablecía parcialmente el ritmo circadiano de ratas con PCS.

Las ratas con PCS muestran actividad motora reducida (recuentos de deambulaci3n) durante la noche (la fase activa de las ratas) mostrando 1849±176 recuentos, lo que es significativamente ($p<0,05$) m1s bajo que en las ratas de control (4546±584 recuentos). La oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 0,7 mg/kg increment3 ligeramente ($p<0,05$) la actividad en ratas con PCS a 2.652±275 recuentos. La oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 2,5 mg/kg no afect3 a los recuentos de deambulaci3n (2235±170 recuentos, oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona) (Fig. 12A y 12C).

La proporci3n de actividad de deambulaci3n durante la noche frente a la actividad durante el d1a se reduce en ratas con PCS, lo que indica un ritmo circadiano alterado (Fig. 12B). Para las ratas de control, esta proporci3n fue de 3,3±0,4 y se redujo ($p<0,001$) en ratas con PCS a 0,8±0,16. Las ratas con PCS tratadas con oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona mostraron una mejora parcial, pero significativa, ($p<0,05$) en la proporci3n noche/d1a de actividad, alcanzando 1,7±0,2 y 1,6±0,3 para 0,7 y 2,5 mg/kg, respectivamente (Fig. 12B). Esto indica un restablecimiento parcial del ritmo circadiano de la actividad.

Tambi3n se descubri3 que la oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona normalizaba la actividad vertical durante el d1a y restablec1a parcialmente el ritmo circadiano de ratas con PCS.

Las ratas con PCS mostraron actividad vertical reducida durante la noche (la fase activa de las ratas) mostrando 561±108 recuentos, lo que es significativamente ($p<0,05$) m1s bajo que en las ratas de control (1228±138 recuentos). La oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 0,7 mg/kg o 2,5 mg/kg no afect3 a la actividad vertical durante la noche (664±121 y 695±185 recuentos, respectivamente) (Fig. 12A y 12C).

En cambio, ratas con PCS mostraron actividad vertical incrementada durante el d1a mostrando 682±114 recuentos, lo que es significativamente ($p<0,05$) m1s alto que en las ratas de control (391±64 recuentos). La oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 0,7 mg/kg o 2,5 mg/kg normaliz3 completamente la actividad vertical durante el d1a, alcanzando 339±47 y 424±44 recuentos, respectivamente. (Fig. 12A y 12C).

La proporci3n de actividad vertical durante la noche frente a la actividad durante el d1a tambi3n se redujo en ratas con PCS, lo que indica un ritmo circadiano alterado (Fig. 12B). Para los controles, esta proporci3n es de 3,7±0,6 y se reduce ($p<0,001$) en ratas con PCS a 0,8±0,01. Las ratas con PCS tratadas con la oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona mostraron una mejora parcial, pero significativa, ($p<0,01$) en la proporci3n noche/d1a de actividad, alcanzando 2,1±0,4 y 1,9±0,6 para 0,7 y 2,5 mg/kg, respectivamente (Fig. 12B). Esto indica un restablecimiento parcial del ritmo circadiano de la actividad vertical.

Ejemplo 12.

Efecto del tratamiento con oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona sobre la concentraci3n de amoniaco en sangre en ratas con hiperamonemia y con PCS.

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como expone en el ejemplo 8.

Determinaci3n de amoniaco.

Se midi3 el amoniaco en sangre usando el kit II Ammonia Arkray test (PocketChem BA, Arkray) usando 20 μ l de sangre roja siguiendo las especificaciones del fabricante.

Resultados

Se descubri3 que la oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afectaba a los niveles de amoniaco en ratas con hiperamonemia y con PCS.

Se incrementaron los niveles de amoniaco en sangre ($p<0,001$) en ratas con hiperamonemia 167±16 μ M en comparaci3n con los controles (47±3 μ M). El tratamiento con 20 mg/kg de oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afect3 a los niveles de amoniaco en ratas con hiperamonemia (139±14 μ M).

Se obtuvieron resultados similares en ratas con PCS. Se incrementaron los niveles de amoniaco en sangre ($p<0,001$) en ratas con PCS (348±27 μ M) en comparaci3n con las ratas con simulaci3n (125±31 μ M). El tratamiento con 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona no afect3 al amoniaco en sangre, que permaneci3 a 302±30 y 294±37 μ M en ratas con PCS tratadas con 0,7 y 2,5 mg/kg de la oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, respectivamente.

Ejemplo 13.

Concentraci3n de oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en plasma y tejido cerebral en ratas con hiperamonemia y con PCS despu3s del periodo de tratamiento.

Programa de tratamiento y pruebas

El programa de tratamiento y pruebas fue como expone en el ejemplo 8.

Análisis de exposición de oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona.

5 Al final del periodo de tratamiento, se recogió plasma de la vena de la cola y, después del sacrificio mediante decapitación, se recogieron los cerebros y se congelaron inmediatamente en hielo seco. Para el análisis de exposición de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona, se homogeneizó el tejido cerebral con una proporción 1:4 de
10 tejido: PBS (pH 7,4) y, a continuación, se extrajo con un volumen de 2 veces de metanol:acetonitrilo (1:1), mientras que el plasma se sometió a precipitado de proteínas con un volumen de 3 veces con acetonitrilo. Los análisis se realizaron mediante el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Waters ACQUITY UPLC + Waters XEVO-TQS (Admescope Oy, Oulu, Finlandia). Para los cálculos de la cantidad de exposición de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona libre en el cerebro, se determinó la fracción no unida (F_{nu}) en homogeneizados de cerebro mediante diálisis, F_{nu} en HA=0,70 y F_{ub} en PCS=1,43 % (Admescope Oy, Oulu, Finlandia).

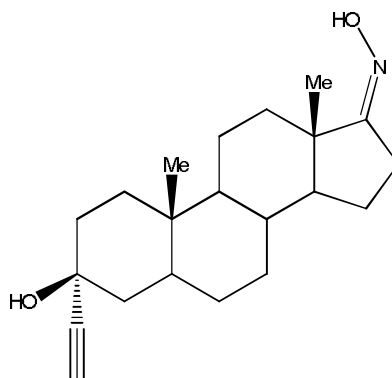
Resultados

15 En ratas con hiperamonemia la administración una vez al día de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona a 3, 10 y 20 mg/kg dio como resultado una exposición dependiente de la dosis tanto en el plasma como y en el tejido cerebral. En el momento de las pruebas de comportamiento, las concentraciones totales de la oxima de 3 α -etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona en plasma fueron 0,34 \pm 0,03, 1,08 \pm 0,11, 1,95 \pm 0,61 μ M, respectivamente, y en el tejido cerebral, las concentraciones no unidas de la oxima de 3 α etnil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona fueron 6,1 \pm 1,4, 11,6 \pm 1,4, 23 \pm 5 nmol/kg, respectivamente, (Fig 14A).

20 En ratas con PCS las exposiciones también fueron dependientes de la dosis y con las dosis más bajas usadas en estas ratas, 0,7 y 2,5 mg/kg, las exposiciones fueron muy similares a aquellas en ratas con hiperamonemia. Las concentraciones totales en plasma fueron 0,48 \pm 0,09 y 1,64 \pm 0,30 μ M, a 0,7 y 2,5 mg/kg/día, respectivamente, y las concentraciones no unidas en el cerebro fueron 6,18 \pm 0,97 y 17 \pm 2 nmol/kg, respectivamente, en el momento para las pruebas de comportamiento.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hepática.

- 5 2. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende la prevención de encefalopatía hepática.
3. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática mínima.
- 10 4. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática sintomática.
5. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo A.
6. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo B.
- 15 7. El compuesto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha encefalopatía hepática es encefalopatía hepática de tipo C.
8. El compuesto para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho compuesto se administra a un paciente con insuficiencia hepática aguda.
- 20 9. El compuesto para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho compuesto se administra a un paciente con hepatopatía crónica con o sin insuficiencia hepática aguda crónica.
10. El compuesto para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho compuesto se proporciona antes, durante o después de un trasplante de hígado.
- 25 11. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el tratamiento comprende la coadministración de oxima de 3 α -etinil-3 β -hidroxiandrostan-17-ona con un compuesto que reduce el nivel de amoniaco.
12. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto que reduce el nivel de amoniaco se selecciona del grupo que consiste en rifaximina, lactulosa, fenilacetato de ornitina y fenilbutirato de glicerol.
- 30 13. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el compuesto que reduce el nivel de amoniaco se selecciona del grupo que consiste en rifaximina y lactulosa.
14. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el compuesto que reduce el nivel de amoniaco es rifaximina.
- 35 15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en la reivindicación 1, to con vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

Figura 1.

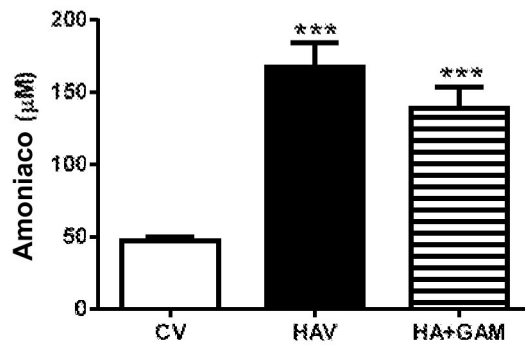


Figura 2.

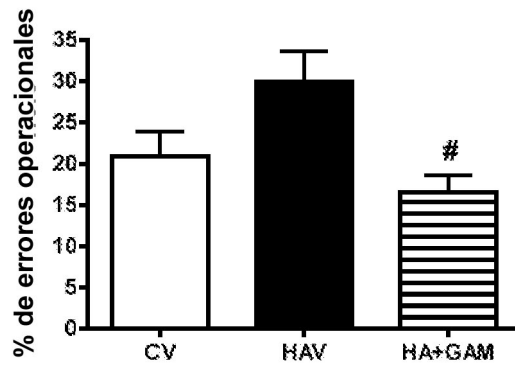


Figura 3.

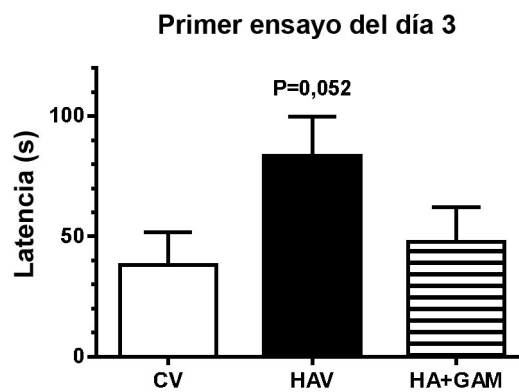


Figura 4.

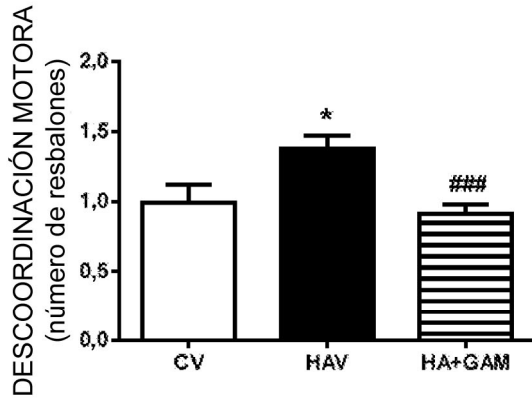


Figura 5.

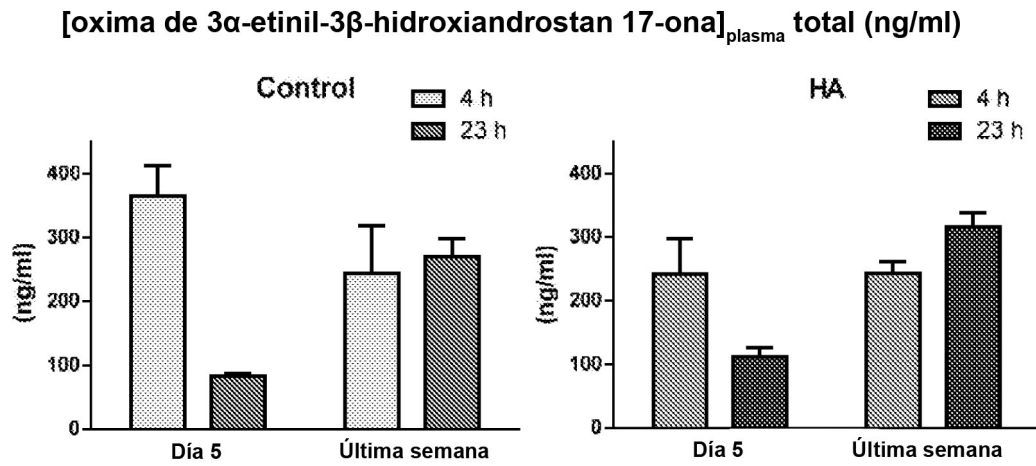


Figura 6.

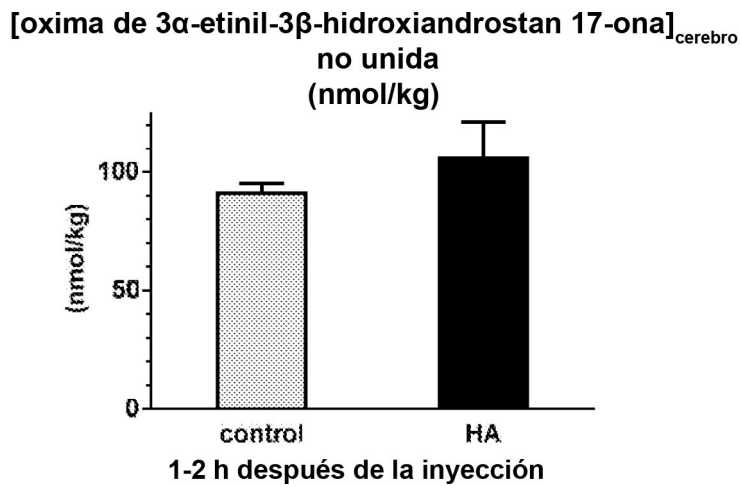


Figura 7.

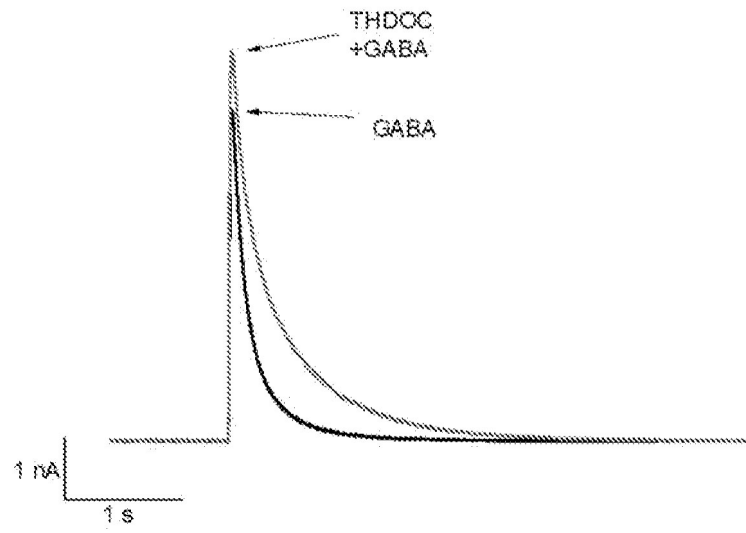


Figura 8.

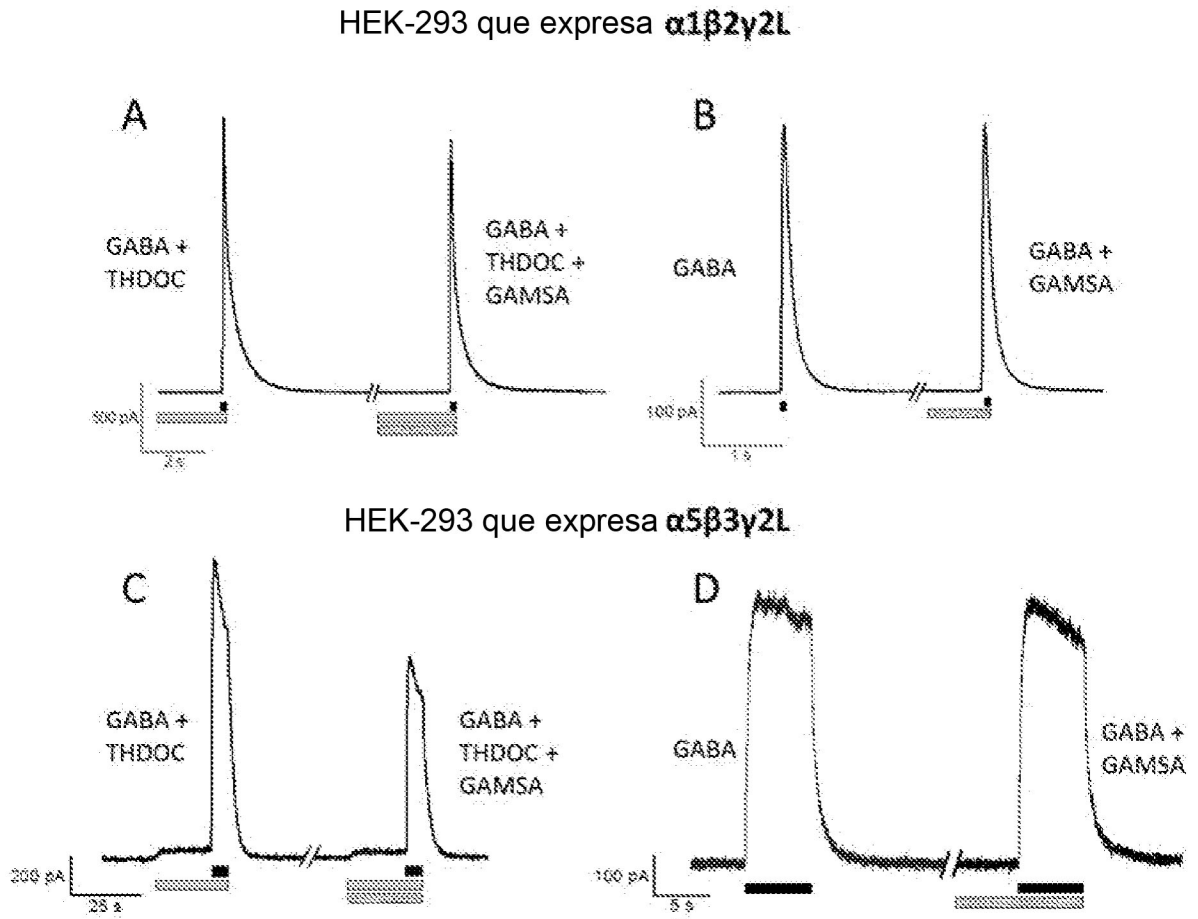


Figura 9.

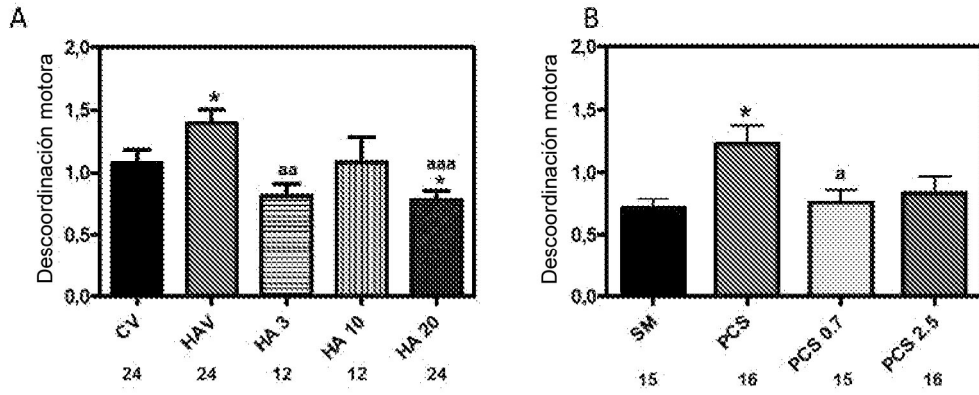


Figura 10.

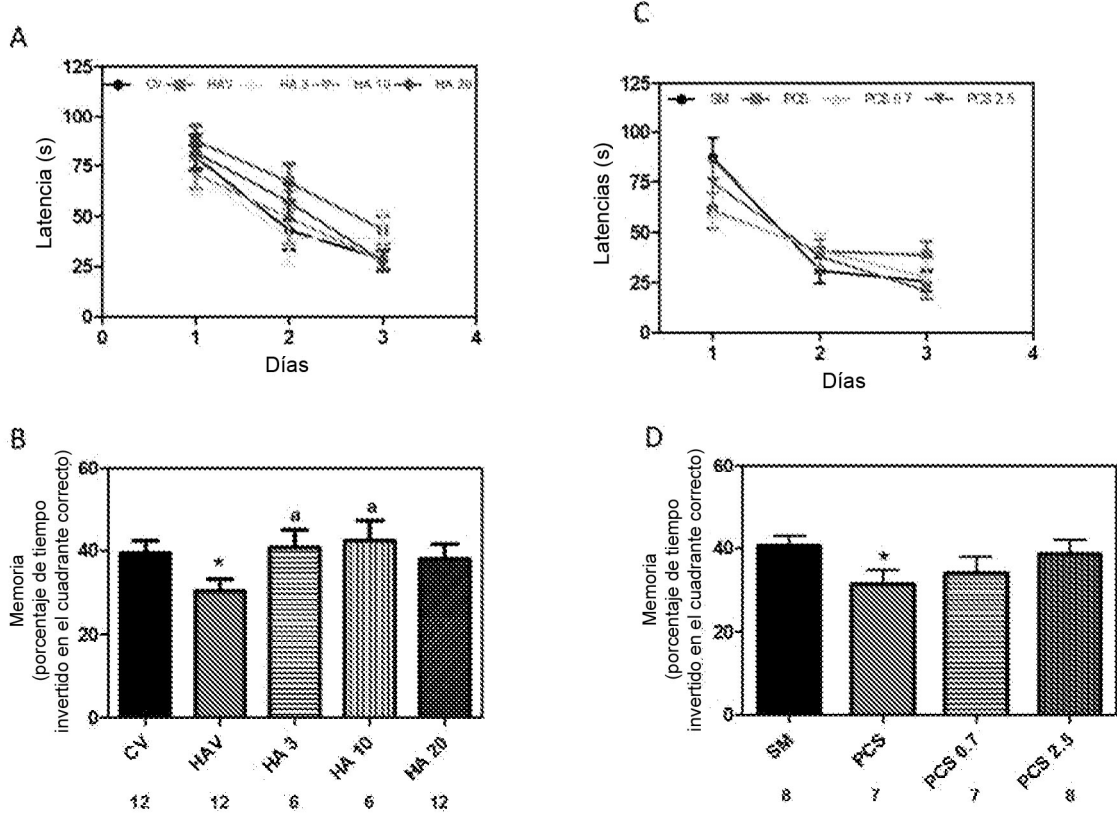


Figura 11.

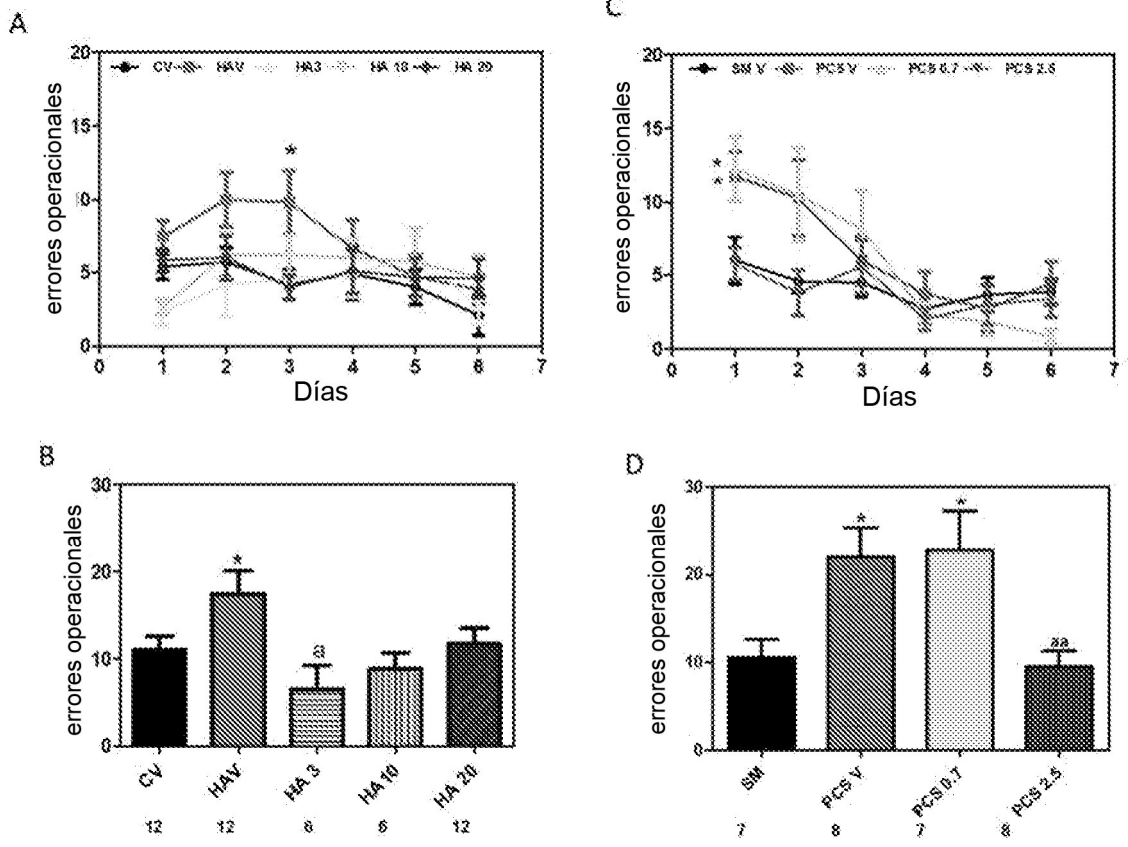


Figura 12.

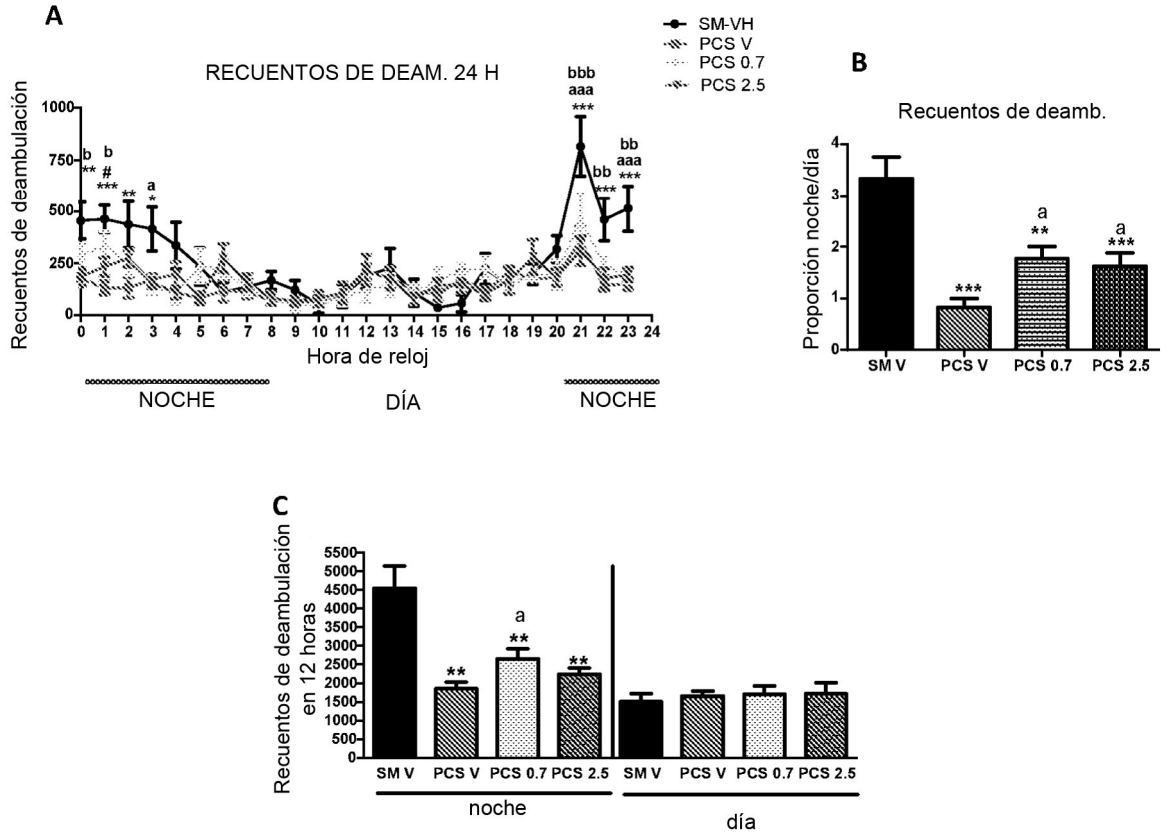


Figura 13.

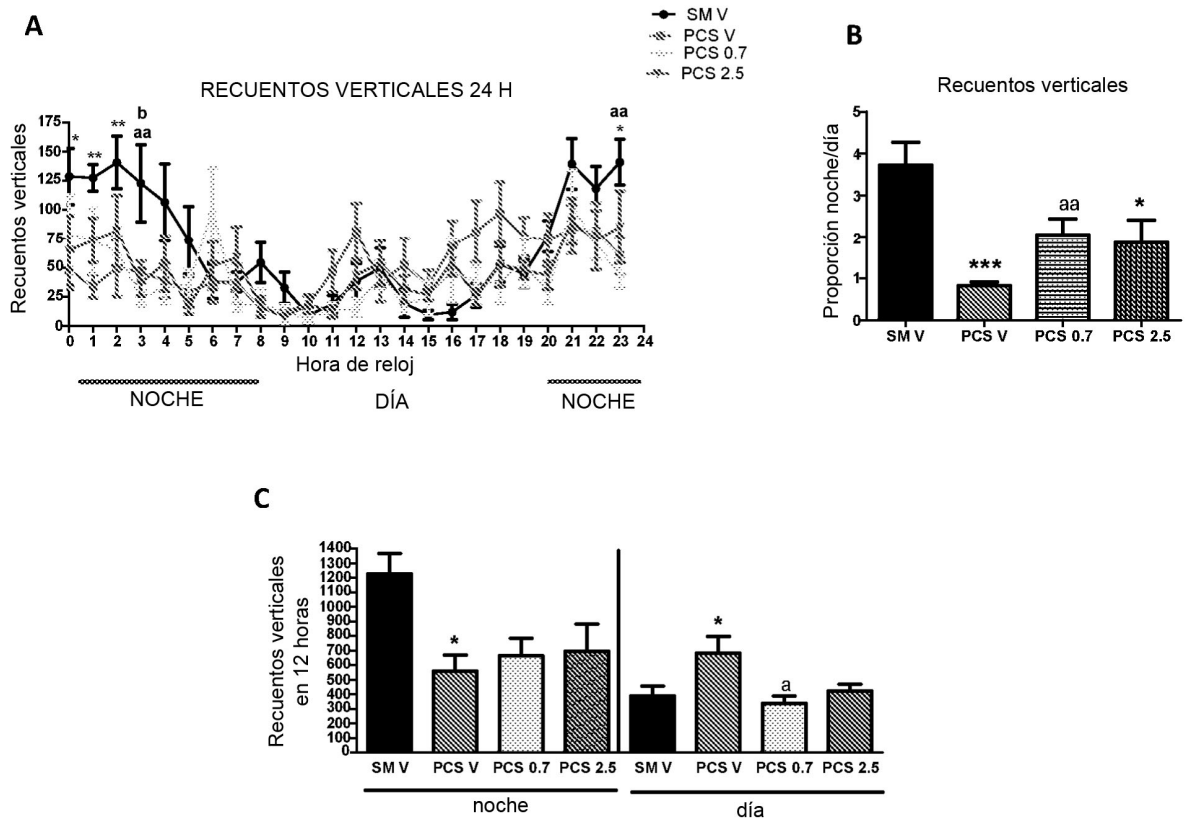


Figura 14.

