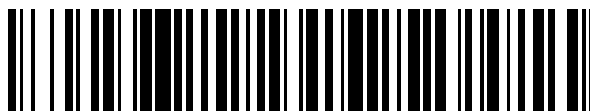


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 154**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4188 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2017 PCT/EP2017/069194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2017 E 17742782 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3319601**

54 Título: **Método para tratar la encefalopatía hepática**

30 Prioridad:

29.07.2016 EP 16305989

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

30.03.2020

73 Titular/es:

**MEDDAY PHARMACEUTICALS (100.0%)
24/26 rue de la Pépinière
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

SEDEL, FRÉDÉRIC.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 751 154 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

Método para tratar la encefalopatía hepática

La invención se refiere al tratamiento de la encefalopatía hepática tipo C.

5 La encefalopatía hepática (HE), también conocida como encefalopatía portosistémica, es una complicación grave de insuficiencia hepática aguda o crónica.

Los pacientes padecen diversas anomalías neurológicas y neuropsiquiátricas (asterixis, confusión, nivel de conciencia alterado, coma como resultado de insuficiencia hepática).

10 Durante la cirrosis, la encefalopatía hepática impacta negativamente en la supervivencia del paciente. Aproximadamente el 30% de los pacientes que mueren de enfermedad hepática en fase terminal experimentan una encefalopatía significativa, acercándose al coma.

Por consiguiente, la carga económica de la encefalopatía hepática es sustancial, ya que es la segunda razón más común para la hospitalización de pacientes cirróticos en los Estados Unidos.

La encefalopatía hepática se puede subdividir en los tipos A, B y C en función de la causa subyacente.

15 El tipo A (= agudo) describe la encefalopatía hepática asociada con insuficiencia hepática aguda, típicamente asociada con edema cerebral. Una insuficiencia hepática aguda es un deterioro rápido (en el espacio de días y semanas) de la función hepática en una persona que no tenía una enfermedad hepática preexistente. La insuficiencia hepática aguda es provocada comúnmente por una sobredosis de paracetamol (acetaminofeno), reacción idiosincrásica a la medicación (p. ej., tetraciclina, troglitazona), causas autoinmunes, hepatitis viral (hepatitis A o B), hígado graso agudo del embarazo, o puede ser idiopática.

20 El tipo B (= baipás) es provocado por derivación sistémica portal sin enfermedad hepática intrínseca asociada. Por lo tanto, la sangre pasa por el hígado, el cual, por lo tanto, no puede metabolizar y eliminar las sustancias de la sangre que pueden ser tóxicas, tales como amonio. El tipo B se produce habitualmente como resultado de anomalías congénitas y/o como resultado de un procedimiento invasivo o trauma.

25 El tipo C (= cirrosis) se produce en pacientes con cirrosis. La cirrosis es una fase tardía de la enfermedad hepática crónica cuando se desarrollan cicatrices (fibrosis). Las principales causas de la cirrosis son:

- alcoholismo crónico
- infecciones virales provocadas por hepatitis viral crónica (tipos B, C y D)
- enfermedades metabólicas tales como NASH (esteatohepatitis no alcohólica)
- deficiencia de alfa-1-antitripsina, galactosemia y trastornos de almacenamiento de glucógeno
- 30 - enfermedades hereditarias, tales como la enfermedad de Wilson y la hemocromatosis
- cirrosis biliar resultante de enfermedades, tales como la colangitis biliar primaria (PBC) y la colangitis esclerosante primaria (PSC)
- hepatitis tóxica provocada por reacciones graves a medicamentos recetados o exposición prolongada a toxinas ambientales
- 35 - episodios repetidos de insuficiencia cardíaca con congestión hepática.

La HE tipo C se puede subdividir en episódica (retorno al estado neural normal entre episodios), persistente (no retorno al estado neural normal) y encefalopatía mínima (Bajaj, Aliment Pharmacol Ther. marzo 2010; 31(5): 537-47).

40 La encefalopatía mínima es una encefalopatía que no conduce a la disfunción cognitiva clínicamente manifiesta, pero puede ser evidenciada utilizando ensayos neuropsicológicos, y se ha demostrado que deteriora la calidad de vida y aumenta el riesgo de estar implicada en accidentes de tráfico.

La HE mínima puede afectar al 30-70% de los pacientes con cirrosis; la HE manifiesta (ya sea episódica o persistente) se observa en el 30-45% de los pacientes con cirrosis durante su vida.

Cabe señalar que la HE, incluso mínima, es un riesgo independiente de mortalidad.

45 La psicopatología de la encefalopatía hepática está siendo objeto de debate, pero se estudian muchas hipótesis. El amoniaco puede tener un papel clave central, junto con la inflamación sistémica y cambios en los portadores

5 específicos en la barrera hematoencefálica. La encefalopatía hepática podría ser una consecuencia de la acumulación en el torrente sanguíneo de sustancias tóxicas, en particular de amoníaco, que normalmente son eliminadas por el hígado. La amonemia no es suficiente para inducir una HE. Se plantea como hipótesis que es necesaria una combinación de aumento de amoníaco en la sangre y la inflamación para que se produzca la HE, en particular mediante una modificación de la barrera hematoencefálica que conduce a la acumulación intracerebral de sustancias tóxicas y a la modulación de la neurotransmisión.

Tratamientos de encefalopatía hepática

La mayoría de las terapias específicas actuales están diseñadas para disminuir la producción de amoníaco intestinal y la hiperamonemia resultante.

10 Durante la encefalopatía hepática aguda, se administra lactulosa (beta-galactosidofruktosa) o lactilol (beta-galactosidosorbitol) a los pacientes para acelerar el tránsito e inhibir la producción de amoníaco intestinal. Estos son disacáridos no absorbibles que son degradados por bacterias intestinales a ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Lactulosa se administra a pacientes a una dosis de 30 mL por vía oral, diariamente o dos veces al día, y la dosis puede aumentarse o reducirse, dependiendo de la tolerancia o el efecto adverso observado en los pacientes.

15 Altas dosis de lactulosa (60 mL cada ocho horas) se pueden administrar a pacientes con encefalopatía hepática grave. La lactulosa se administra después del primer episodio de encefalopatía hepática para prevenir la recurrencia.

También se utilizan diversos antibióticos, con el fin de disminuir la carga bacteriana amoniagénica. Los antibióticos se utilizan generalmente si el tratamiento con lactulosa no es lo suficientemente efectivo y en la prevención secundaria.

20 Se puede utilizar neomicina, metronidazol, rifaximina, vancomicina oral, paromomicina y quinolonas orales. Rifaximina, un derivado no absorbible de rifampina con una actividad antibacteriana de amplio espectro. Se puede reducir la endotoxemia, incluyendo hiperamonemia, mediante la reducción de la translocación intestinal de bacterias. Utilizado en un cierto número de ensayos, el efecto de la rifaximina fue equivalente o superior a los agentes comparados, con buena tolerabilidad. La posología recomendada es de 550 mg dos veces al día.

25 Recientemente, las terapias utilizadas para el tratamiento de errores congénitos del metabolismo de la urea comienzan a utilizarse en pacientes con encefalopatía hepática, pero aún no se recomiendan formalmente. Estos incluyen:

- 30 • Una sal estable de 2 aminoácidos constituyentes, L-ornitina y L-aspartato (LOLA), también se puede utilizar para incrementar el aclaramiento de amoníaco. Se puede combinar con lactulosa y/o rifaximina.
- 35 • Benzoato de sodio, fenilbutirato de sodio, fenilacetato de sodio y fenilbutirato de glicerol también pueden utilizarse para el tratamiento de la encefalopatía hepática. Las dosis orales de benzoato de sodio son de aproximadamente 5 g dos veces al día, aunque dosis más bajas (2,5 g tres veces por semana) también pueden ayudar a los pacientes a recuperarse de los síntomas de la encefalopatía hepática. Fenilbutirato de glicerol se puede utilizar en una dosis oral de 6 ml dos veces al día.

40 La intervención nutricional es necesaria en caso de desnutrición o ingesta dietética insuficiente. Comer proteínas vegetales en lugar de proteínas derivadas de la carne roja, y las proteínas de pollo y pescado pueden ser favorables. También se recomienda complementar la dieta con aminoácidos de cadena ramificada. La administración de zinc también se puede utilizar, con el potencial de mejorar la hiperamonemia, con sulfato de zinc y acetato de zinc que se pueden administrar a una dosis de 600 mg por vía oral todos los días. La L-carnitina también se utiliza para mejorar los síntomas de la encefalopatía hepática, en particular en pacientes con cirrosis.

45 El documento WO 2011/124571 describe el uso de biotina en una dosis alta (en el intervalo de 100 a 600 mg/día) para el tratamiento de discapacidades visuales, en particular relacionadas con la atrofia óptica. Cabe señalar que las deficiencias visuales realmente descritas en esta solicitud son síntomas relacionados con una leucoencefalopatía particular, es decir, una implicación de la sustancia blanca del cerebro. Este documento no describe ni sugiere que la biotina pudiera utilizarse para el tratamiento de la HE.

El documento WO 2014/016003 describe el uso de biotina en una dosis alta (del orden de 100 a 600 mg/día) para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS), apoplejía y adrenoleucodistrofia ligada a X (X-ALD), en particular adrenomiélo neuropatía (AMN).

El documento WO 2014/177286 proporciona evidencia de que la biotina es útil para el tratamiento de AMN.

El documento WO2016151132 proporciona evidencia de que la biotina es útil para tratar una esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

5 Nagamine et al (J Gastroenterol. Junio de 1995; 30(3):351-5; y Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi. Julio de 1989; 86(7): 1519-24) y en JPH01226814A han inducido una hiperamonemia aguda en ratas al administrar ureasa o acetato de amonio. En otro modelo, se indujo insuficiencia hepática aguda mediante la inyección de una sola dosis alta de CCl₄. Los autores observaron la capacidad de la biotina de disminuir el nivel de amonio sérico en este modelo animal de insuficiencia hepática aguda. La cantidad de biotina cuando se administra no fue controlada cuando se administra por vía oral y era de 0,5 mg/kg BW (peso corporal) cuando una sola dosis se inyectó por vía intraperitoneal (Nagamine, 1989). En Nagamine (1995), la dosis de biotina (proporcionada como un solo brote intraperitoneal) también es muy baja.

15 En el documento JPH01226814A, la biotina se proporciona como un brote intraperitoneal simple de 1 mg de biotina. Los resultados se reseñan para seres humanos, con dosis utilizadas en el intervalo de unos pocos mg (aproximadamente 5-10 mg) por día. Los resultados reseñados para los pacientes, sin embargo, no son concluyentes. De hecho, existe una alta variabilidad natural del estado general y del nivel de amoníaco en el suero de pacientes con HE. Las Tablas 7 y 8 solo informan de datos obtenidos durante 10 días, sin ningún control o información sobre otros tratamientos que recibieron los pacientes. Del paciente 2 se puede ver que hay una gran variabilidad en el nivel de amoníaco (aumento y disminución) durante los primeros 5 días, incluso aunque este paciente no recibía biotina durante este intervalo de tiempo. También es cierto para el paciente 3, en el que el nivel de amoníaco había disminuido bien entre los días 48 y 96, aunque no se había administrado biotina al paciente en este período de tiempo. Por lo tanto, no hay posibilidad de llegar a una conclusión sobre el papel real de la biotina en los niveles de amoníaco y para controlar la HE en estos pacientes.

Cabe señalar, además, que a pesar de los resultados reseñados allí hace más de 20 años, no se desarrolló o propuso en el mercado ningún fármaco basado en biotina para tratar o prevenir la encefalopatía hepática.

25 En particular, una revisión por Bajaj (2010, Aliment Pharmacol Ther 31, 537-547) no menciona biotina como un producto que es o puede ser utilizado para el tratamiento de encefalopatía hepática de tipo C.

En el contexto de la presente invención se propone utilizar biotina, a una dosis mucho más alta (cantidad diaria de al menos 200 mg) , con el fin de mejorar el estado de los pacientes que padecen encefalopatía hepática de tipo C.

30 Es particularmente novedoso y sorprendente el hecho de que la biotina a una dosis alta (una dosis mayor que la presentada en la técnica anterior) puede ser útil para el tratamiento de la encefalopatía hepática tipo C y en última instancia, podría limitar la evolución de la enfermedad, e incluso revertir algunos de los síntomas de la misma.

La invención se refiere, por lo tanto, a biotina para su uso en el tratamiento o la prevención de la encefalopatía hepática de tipo C, en donde la biotina se utiliza a dosis alta, es decir, al menos 200 mg al día.

35 También son objetos de la invención composiciones que contienen biotina para el uso de las mismas en el tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C, y también el uso de biotina para la producción o fabricación de un fármaco destinado al tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C. En particular, el fármaco contendrá más de 20 mg, más preferiblemente más de 40 mg, más preferiblemente más de 50 mg, más preferiblemente más de 70 mg, más preferiblemente aproximada o exactamente 100 mg de biotina, en particular cuando se utiliza por administración oral.

40 Las enseñanzas de la invención hacen que sea posible, por lo tanto, la aplicación de métodos de tratamiento que comprenden la administración de biotina a pacientes que padecen encefalopatía hepática de tipo C. La presente memoria descriptiva describe un método para tratar un paciente que padece encefalopatía hepática de tipo C, que comprende la etapa de administrar biotina a dicho paciente. Más adelante se describen ejemplos de dosificación de biotina y régimen de tratamiento.

45 La biotina se puede utilizar sola o en combinación con otro compuesto usado para el tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C (o síntomas de la misma).

Por lo tanto, la invención abarca una composición que contiene biotina y también otro medicamento , como se enumera anteriormente, contra la encefalopatía hepática de tipo C, para uso simultáneo, separado o secuencial (extendida a lo largo del tiempo) en el tratamiento de una encefalopatía hepática de tipo C.

La memoria descriptiva también describe un método para tratar a un paciente que padece encefalopatía hepática de tipo C, que comprende los pasos de proporcionar biotina a dicho paciente y, opcionalmente (pero preferiblemente) otro fármaco útil para proporcionar alivio a dichos pacientes con respecto a los síntomas de la encefalopatía hepática de tipo C.

- 5 La biotina se puede utilizar, en particular, para mejorar la velocidad de procesamiento cognitivo y psicomotor, el control y la coordinación de la memoria y motriz.

El tratamiento con biotina también puede conducir al aumento del peso del paciente.

- 10 La biotina se utiliza, por lo tanto, para el tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C, ya sea persistente, episódica o mínima. Sin embargo, la solicitud también describe, pero no reivindica el uso de biotina en pacientes con encefalopatía hepática de tipo A o tipo B para disminuir los síntomas antes de que la situación vuelva a la normalidad. La administración de biotina a pacientes de tipo A permitiría a estos pacientes esperar más tiempo antes de recibir un injerto de hígado y/o estar en mejores condiciones al recibirlo.

- 15 La biotina también puede utilizarse para prevenir episodios de encefalopatía hepática de tipo C. En particular, dicha prevención es útil en pacientes con cirrosis diagnosticada, si ya han presentado un episodio de HE (es decir, si tienen una HE episódica o persistente) o si no han sido diagnosticados con HE (que no han presentado ningún episodio de síntomas de HE, o sin signos clínicos de HE) y, por lo tanto, tienen una HE mínima o ninguna HE.

La biotina en una dosis alta es particularmente interesante para prevenir episodios secundarios de HE, en pacientes que ya han presentado un episodio de HE.

- 20 Para el tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C, o la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C, la biotina se puede utilizar de la siguiente manera.

- 25 La biotina se administra preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz, que es generalmente una dosis alta, *es decir*, en una dosis de al menos o aproximadamente 200 mg al día. Incluso si no se prevé realmente una dosis máxima, esta última generalmente no debe exceder de 500 mg, 600 mg o 700 mg al día. Esto permite observar una mejora en el estado del paciente y/o detener o disminuir el empeoramiento de la condición del paciente.

De esa manera, el médico puede determinar la dosis de acuerdo con el peso del paciente. En particular, se administra al paciente una dosis al menos igual a 3 mg/kg/día, preferiblemente de 5 mg/kg/día, o al menos igual a 7,5 mg/kg/día, o incluso alrededor de 10 mg/kg/día.

- 30 Por lo tanto, entre 200 y 700 mg de biotina al día se administran preferiblemente a los pacientes, generalmente entre 200 y 500 mg al día, o entre 200 y 600 mg al día, más preferiblemente entre 200 y 300 mg al día, generalmente alrededor de o exactamente 300 mg al día. De este modo, se puede administrar al menos o aproximadamente 200 mg al día, o al menos o aproximadamente 250 mg al día, o al menos o aproximadamente o exactamente 300 mg al día.

- 35 En una realización particular, que se prefiere (en particular para problemas de facilidad de uso por parte del paciente), la biotina está en una forma adecuada para administración oral. Por lo tanto, esto implica una composición para administración oral, que contendrá al menos o aproximadamente o exactamente 20 mg, preferiblemente al menos o aproximadamente o exactamente 40 mg de biotina, o incluso al menos o aproximadamente o exactamente 50 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 75 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 100 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 150 mg o al menos o aproximadamente o exactamente 250 mg de biotina, o al menos o aproximadamente o exactamente 300 mg de biotina. Esta composición es preferentemente para uso farmacéutico y, por lo tanto, es una medicina. Se entiende que cada dosis unitaria de esta composición contiene al menos o aproximadamente o exactamente 20 mg, preferiblemente al menos o aproximadamente o exactamente 40 mg, o incluso al menos o aproximadamente o exactamente 50 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 100 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 150 mg o al menos o aproximadamente o exactamente 250 mg de biotina o aproximadamente o exactamente 300 mg de biotina, como ingrediente activo.
- 45

La dosis total de biotina se puede administrar una vez al día, o a través de múltiples tomas. En particular, la biotina se puede tomar a través de dos o tres tomas al día. Se prefiere que la biotina se tome en torno a las horas de las comidas, y cuando la cantidad de biotina es sustancialmente la misma para cada toma.

- 50 Cabe señalar que la enfermedad descrita en esta memoria es una enfermedad crónica, que empeora con el tiempo. Por lo tanto, es preferible que el tratamiento con biotina se realice a largo plazo, con el fin de ser más efectivo, para

- prevenir la aparición de nuevos episodios de HE y para estabilizar cualquier mejora que conlleve. Por consiguiente, se prefiere que dicho tratamiento con biotina tenga una duración de al menos 3 meses. Incluso se prefiere que dicho tratamiento con biotina tenga una duración de al menos 6 meses. Como se indica, un tratamiento de este tipo puede ser ampliado el mayor tiempo posible con el fin de evitar la aparición de un nuevos episodios de HE, aumentar la mejora que podría conllevar la biotina, y estabilizar los efectos terapéuticos. En particular, dicho tratamiento con biotina tiene una duración de al menos un año. No existe un final previsto para el tratamiento y se espera que el paciente tome biotina todo el tiempo que sea necesario y estabilizará o mejorará la condición del paciente.
- 5
- En una realización particular, esta composición para la administración oral contiene biotina como único ingrediente activo, y también excipientes, sin ningún otro ingrediente activo.
- 10
- Un excipiente debe entenderse que significa cualquier compuesto que es parte de la formulación que está destinada a actuar como un soporte simple, es *decir*, que no pretende tener una actividad biológica.
- Esta composición puede ser de cualquier forma conocida en la técnica. En particular, está en forma de cápsulas de gel, comprimidos (opcionalmente recubiertos con película), píldoras o pastillas. En otra realización, está en forma de un jarabe. Dicho jarabe contiene una cantidad tal que contiene al menos o aproximadamente o exactamente 20 mg, preferiblemente al menos o aproximadamente o exactamente 40 mg, o incluso al menos o aproximadamente o exactamente 50 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 75 mg o al menos o aproximadamente o exactamente 100 mg de biotina por dosis unitaria. La concentración de biotina en este jarabe depende de la dosis unitaria que se desea administrar al paciente.
- 15
- Los excipientes que pueden utilizar los expertos en la técnica son bien conocidos en la técnica. De este modo, se puede elegir talco (E553b), celulosa microcristalina, lactosa, manosa, almidón (en particular almidón de maíz), estearato de magnesio (E572) y ácido esteárico (E570). Esta lista no es exhaustiva.
- 20
- Cuando esta composición se prepara en forma de cápsulas de gel, un excipiente preferido es celulosa microcristalina.
- Cuando la composición está en forma de un comprimido recubierto con película, dicho recubrimiento de película puede formarse a partir de cualquier sustancia conocida en la técnica, tal como hipromelosa (E464), etilcelulosa, macrogol, talco (E553b), dióxido de titanio (E171) u óxido de hierro (E172).
- 25
- El ingrediente activo también puede ser coloreado (por cualquier colorante aceptable, tal como la cochinilla), lo que permite verificar que la biotina esté bien dispersa en el excipiente.
- El ingrediente activo también puede ser coloreado (por cualquier colorante aceptable, tal como la cochinilla), lo que permite verificar que la biotina esté bien dispersa en el excipiente.
- 30
- También se puede prever una forma de liberación lenta (o lenta sostenida), dado el hecho de que la semivida en el plasma de la biotina es corta (aproximadamente 2 horas).
- Dichas composiciones de liberación lenta son conocidas en la técnica y se describen, en particular, en el documento WO 2011/077239. En particular, dichas composiciones de liberación lenta pueden comprender una matriz de liberación lenta que comprende biotina sola o con uno o más ingredientes activos.
- 35
- En una realización específica, la composición de liberación lenta comprende una matriz que permite la liberación inmediata, en donde dicha matriz comprende biotina sola o con uno o más ingredientes activos y la liberación lenta se consigue mediante una matriz o un recubrimiento modificador de la liberación.
- Por lo tanto, la composición de liberación lenta puede proporcionar una liberación inmediata y una liberación diferida (lenta) de biotina.
- 40
- En una realización específica, la liberación lenta se puede lograr a través de un sistema de liberación impulsado osmóticamente.
- En otra realización, la composición de liberación lenta comprende un núcleo que comprende biotina, opcionalmente uno o más ingredientes activos y, opcionalmente, excipiente o excipientes farmacéuticos y una o más capas externas, en donde las capas externas comprenden uno o más agentes de liberación lenta.
- 45
- En otro aspecto, la biotina puede estar en una forma que permita la administración por inyección: esto implica una composición inyectable que contiene al menos o aproximadamente o exactamente 20 mg, preferiblemente al menos o aproximadamente o exactamente 40 mg, o incluso al menos o aproximadamente o exactamente 50 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 75 mg, al menos o aproximadamente o exactamente 100 mg, al menos o

aproximadamente o exactamente 150 mg o al menos o aproximadamente o exactamente 250 mg de biotina por dosis unitaria.

5 Esta composición inyectable puede estar en forma de un vial que contiene la biotina, y también excipientes aceptables. La concentración de biotina se ajusta de acuerdo con el volumen previsto del vial. Se pueden utilizar determinados excipientes que mejoran la solubilidad de la biotina.

10 Los excipientes que pueden utilizarse para la producción de composiciones inyectables son bien conocidos en la técnica. Se pueden mencionar, en particular, dihidrógeno-fosfato de sodio, bicarbonato de sodio (E550i), para-hidroxibenzoato de metilo (E218) y para-hidroxibenzoato de propilo (E216), que se pueden utilizar juntos en proporciones que los expertos en la materia son capaces de determinar. El agua utilizada es agua para inyección. La inyección se lleva a cabo preferiblemente por vía intramuscular. También se puede llevar a cabo por vía intravenosa.

Descripción de las Figuras

Figura 1: niveles de ASAT (A), ALAT (B), bilirrubina (C) y albúmina (D) en el suero de ratas control (simulado) o ratas ligadas a los conductos biliares (BDL).

15 Figura 2: análisis del comportamiento de 6 minutos de ratas control y BDL sin o con agua enriquecida en NH₃. A. Distancia total; B. velocidad media; C. duración de la actividad (tiempo durante el cual el animal está activo en lugar de pasivo); D. número de cambios de zona; E. número de cría; F. duración total de la cría.

Figura 3: amoniemia de la sangre en ratas control (simulado) o BDL (A) o en ratas a las que se inyectó aceite (ratas control) o CCl₄ (B).

20 Figura 4: niveles de ASAT (A), ALAT (B), bilirrubina (C) y albúmina (D) en el suero de ratas control (aceite) o a las que se inyectó CCl₄.

Figura 5: análisis del comportamiento de 6 minutos de ratas control (aceite) o a las que se inyectó CCl₄. A. Distancia total; B. velocidad media; C. duración de la actividad (tiempo durante el cual el animal está activo en lugar de pasivo); D. número de cambios de zona; E. número de cría; F. duración total de la cría.

25 Figura 6: amoniemia de la sangre en ratas control o BDL alimentadas con placebo o con biotina (300 mg/kg en los alimentos, que corresponde a una dosis diaria de 30 mg/kg BW/día en ratas o 300 mg/día en seres humanos).

Figura 7: análisis del comportamiento de 6 minutos de ratas control (simulado) o BDL, con una dieta sin o con biotina (dosis correspondiente a 300 mg en seres humanos). A. Distancia total; B. velocidad media; C. duración de la actividad (tiempo durante el cual el animal está activo en lugar de pasivo); D. número de cambios de zona; E. número de cría.

30 Figura 8: análisis del comportamiento de 6 minutos de ratas control o BDL, sin o con una dieta enriquecida con biotina (2 dosis correspondientes a una dosis diaria de 50 mg o 300 mg en seres humanos). A. Distancia total; B. velocidad media; C. duración de la actividad (tiempo durante el cual el animal está activo en lugar de pasivo); D. número de cambios de zona; E. número de cría.

35 Figura 9: permeabilidad de la barrera hematoencefálica observada por la penetración en el SNC de dextrano acoplado a rojo Texas. A. ratas control y BDL sin o con agua enriquecida en NH₃. B. control (aceite) y ratas a las que se inyectó CCl₄ sin o con una dieta enriquecida en NH₃.

Figura 10: permeabilidad de la barrera hematoencefálica observada por la penetración en el SNC de dextrano acoplado a rojo Texas. A. ratas control y BDL sin o con una dieta enriquecida en biotina (300 mg/kg de alimento). B. control (aceite) y ratas a las que se inyectó CCl₄ sin o con una dieta enriquecida en biotina (50 mg/kg de alimento).

40 Figura 11: Medida de suero IFN gamma (A) o TNF alfa (B) en animales control, animales BDL y animales CCl₄ con o sin agua enriquecida con NH₃. HE+: animales que muestran signos de comportamiento de encefalopatía hepática; HE-: animales que no muestran signos de encefalopatía hepática.

Figura 12: Medida de suero IFN gamma (A), TNF alfa (B) o IL 6 (C) en animales control, animales BDL con o sin agua enriquecida con NH₃ y/o dieta enriquecida con biotina (300 mg/kg de alimento).

45

Ejemplos

Ejemplo 1 – Estudio en el modelo de ligadura del conducto biliar de rata más agua hiperamonémica (enriquecida con NH3)

- 5
- Las ratas con ligadura del conducto biliar (BDL) es un modelo de lesión hepática colestática con estrés oxidativo asociado y fibrogénesis.
 - Estas ratas desarrollan lesión hepática progresiva con la aparición de fibrosis en el espacio de 2 semanas y el desarrollo de cirrosis biliar en el espacio de 4 a 6 semanas.
 - Cuando se administran complementos de hiperamonemia, más ratas ligadas al conducto biliar desarrollan encefalopatía.

10 El efecto de la biotina se evalúa en ratas con ligadura del conducto biliar tratadas con agua hiperamonémica con respecto a la eficacia clínica en términos de orientación en campo abierto y aumento de peso corporal.

“Evaluación clínica”:

- 15
- 4 grupos de 5 ratas: ratas operadas simuladamente, tratadas con 1) dieta de control y agua de control; 2) dieta de control y agua hiperamonémica (enriquecida con NH3); 3) dieta complementada con biotina y agua de control; y 4) dieta complementada con biotina y agua hiperamonémica.
 - 4 grupos de 10 ratas: ratas con ligadura del conducto biliar tratadas con 1) dieta de control y agua; 2) dieta de control y agua hiperamonémica; 3) dieta complementada con biotina y agua de control; y 4) dieta complementada con biotina y agua hiperamonémica.
 - La dosis de biotina utilizada es de 30 mg/kg de BW/día, lo que equivale a una dosis humana de 300 mg/día.
 - La biotina se suministra mezclada en alimentos secos.
 - Examen "clínico":
 - o Peso
 - o Campo abierto (orientación)
- 20
- 25
- Inicio del tratamiento: el día 3 post-cirugía.
 - El tratamiento continúa durante 6 semanas, cuando las ratas son cirróticas.
 - La permeabilidad de la barrera hematoencefálica se evalúa al final del estudio.

Este experimento hace posible evaluar el efecto del tratamiento con biotina de dosis alta en términos de mejora clínica, reducción de la barrera hematoencefálica y normalización metabólica, en un modelo de HE crónica.

30 Ejemplo 2 - Otro modelo de encefalopatía hepática en ratas es el modelo de CCl₄ inducida por fibrosis hepática más agua hiperamonémica

- 35
- Ratas a las que se administra CCl₄ tienen hepatotoxicidad mediada por la producción de radicales libres.
 - Estas ratas desarrollan lesión hepática progresiva con desarrollo de cirrosis en el espacio de 8 semanas.
 - Cuando se les administran complementos de hiperamonemia, más ratas tratadas con CCl₄ desarrollan encefalopatía.

El mismo protocolo clínico que se describe en el Ejemplo 1 se aplica a estos animales.

Ejemplo 3 - Material detallado y métodos

Animales

40 Se obtuvieron ratas Wistar machos adultos (peso 175-200 g al inicio del procedimiento quirúrgico) de los laboratorios Janvier (Le Gesnest-Saint-Isle) y se utilizaron para todo el experimento.

Ligadura del conducto biliar

45 La ligadura del conducto biliar (BDL) se utilizó como modelo de cirrosis biliar. Todas las ratas de este grupo fueron operadas. Se separaron al azar en dos grupos: BDL o laparotomía simple (SIMULADO, grupo control). El procedimiento BDL se realizó como se describió previamente (Kountouras J, Prolonged bile duct obstruction : a new experimental model for cirrhosis in the rat; Br J Exp Pathol 1984) y como se controló en nuestro laboratorio.

La cirugía se realizó bajo anestesia total con isoflurano inhalado (Aerrane, Baxter Maurepas) 3% mezclado con aire. La analgesia se realizó mediante inyección subcutánea de buprenorfina al 2% (Buprécare 0,3 mg/ml, Axience) inmediatamente antes y después de la cirugía.

5 Los animales se examinaron dos veces por semana y se pesaron semanalmente. Todos los animales se mantuvieron durante 6 semanas después de la cirugía.

CCl₄

10 Con el fin de obtener un control de los resultados, se utilizó otro modelo de cirrosis, que consiste en una intoxicación crónica por tetracloruro de carbono (CCl₄); ratas Wistar recibieron CCl₄ 1 ml/kg de peso corporal dos veces por semana durante 8 semanas en aceite mineral. Los controles recibieron aceite mineral sin CCl₄. Los tratamientos se administraron por vía intragástrica mediante sonda utilizando un catéter de polietileno, sin sedación.

La dosis de CCl₄ utilizada en este experimento está por debajo de la dosis utilizada en Nagamine, que es más un modelo de lesión hepática aguda (HE tipo A).

En el presente modelo, el uso de una dosis más baja durante un tiempo más largo permite imitar mejor la lesión hepática progresiva y, por lo tanto, la HE de tipo C.

15 Encefalopatía hepática

20 Se utilizó una intervención (Wright et al, Hepatology junio de 2007; 45(6):1517-1526) con el objetivo de aumentar la incidencia de la encefalopatía hepática y consistía en la adición de complementos alimenticios alto contenido en proteínas/amoniagénico (complementos enriquecidos con NH₃) durante 6 u 8 semanas (dependiendo del modelo de cirrosis). El tratamiento con NH₃ comenzó 3 días después de la cirugía o el procedimiento con CCl₄. Consistió en una mezcla hecha a medida que imitaba la composición de aminoácidos de la molécula de hemoglobina (4 g/kg/g; mezcla de rata EF con hiperamonemia AA proteína bruta 88,9%, SSNIFF) mezclada con agua. Las ratas recibieron 2 botellas, una con agua solamente y una con el tratamiento.

El objetivo de este régimen era producir hiperamonemia crónica.

Cuatro grupos de ratas recibieron este tratamiento enriquecido con NH₃ entre BDL, SIMULADO, CCl₄ y aceite.

25 Tratamiento contra la encefalopatía hepática

La rifaximina es un antibiótico oral no absorbible validado en seres humanos para prevenir la recurrencia de la HE en asociación con la lactulosa. El mecanismo exacto de acción no es bien conocido, pero se supone que disminuirá la hiperamonemia y la translocación bacteriana debido a su papel en la microbiota intestinal.

30 De esta manera, podría desempeñar un papel en los dos actores principales de la HE, la hiperamonemia y la inflamación sistémica.

Rifaximina (Sigma Aldrich) se mezcló con agua a la dosis de 50 mg/kg/d y comenzó 3 días después de la cirugía.

Cuatro grupos de ratas recibieron rifaximina (RFX): BDL, SIMULADO, BDL + RFX, SIMULADO + RFX.

El benzoato de sodio, validado en el trastorno genético del ciclo de urea, también se mezcló con agua a la dosis de 200 mg/kg/día y comenzó 3 días después de la cirugía.

35 La biotina se administró mezclada en alimentos para animales a una dosis de 50 mg/kg o 300 mg/kg de alimentos, correspondiente a una dosis ingerida de 5 mg/kg de animal/día o 30 mg/kg de animal/día y una dosis diaria de 50 mg o 300 mg en seres humanos.

40 Cabe señalar que se proporciona biotina a los animales antes de la inducción de la HE, ya que los animales solo experimentan un episodio de HE y mueren rápidamente después del desarrollo de la HE después de la ligadura del conducto biliar. Por lo tanto, en este modelo animal, la biotina no se puede proporcionar después de la cirugía para estudiar la capacidad de la biotina para prevenir un segundo episodio de HE. La supervivencia de los animales no se estudió, ya que los animales fueron sacrificados para estudiar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Ensayo del comportamiento

5 Para evaluar la encefalopatía hepática, se utilizó el ensayo de campo abierto (BioSeb), un ensayo de comportamiento validada en ratas BDL para explorar alteraciones neurológicas (Leke, Plos One 2012;7(5)). El ensayo se realizó el día del sacrificio, en condiciones experimentales estandarizadas (hora, lugar, luz, ruido). Cada una de las ratas se colocó en una caja cuadrada de 1 m² y eran libres para explorar la arena durante 6 minutos. Se definieron dos áreas en el cuadrado, el centro y la periferia. Los parámetros de movilidad fueron registrados por una cámara tridimensional. Los datos analizados después de 6 minutos de experimentos fueron: distancia total recorrida (cm), tiempo de movilidad(es), velocidad (cm/s), número de cambios de zona, distancia recorrida en el centro y zona periférica, tiempo pasado en el centro y la zona periférica, número de crías, duración total de la cría.

Determinación de la permeabilidad BBB con el uso de dextrano rojo Texas

10 La integridad de BBB se investigó midiendo la extravasación del compartimiento intravascular del conjugado dextrano-rojo de Texas (Life Technologies).

15 Seis semanas después de la cirugía, todas las ratas fueron anestesiadas con isoflurano inhalado al 3%. Se inyectaron 0,75 ml de fluorocromo en la vena femoral (rojo Texas 10 kDa 10 mg/ml) y se hizo circular durante 6 minutos. Luego, los autores de la invención tomaron una muestra de sangre (2 ml) en la vena cava inferior mediante una laparotomía mediana. Para eliminar el colorante localizado intravascular, realizaron una toracotomía grande para perfundir 300 ml de PBS frío (40 ml/min con una bomba peristáltica) a través del ventrículo cardíaco izquierdo.

Después de la decapitación, el cerebro fue rápidamente eliminado y los bulbos olfatorios y el tallo cerebral se eliminaron con el cerebelo.

20 Después de moler el hemisferio derecho mediante agitación vigorosa y centrifugación, la cantidad de dextrano fluorescente (µg/g) en los sobrenadantes se midió por fluorimetría (Tecan Infinite M200) a 620 nm tras la excitación a 588 nm. El contenido de colorante se valoró por interpolación en la curva estándar.

Análisis bioquímico e histológico.

25 La muestra de sangre tomada durante el sacrificio se centrifugó y el plasma se utilizó para determinar los niveles de transaminasas hepáticas, bilirrubina total y conjugada y amoníaco. Las citoquinas plasmáticas (IL6, TNFa, IFNg) se determinaron mediante un kit comercial multiplex.

Después del sacrificio, se extrajeron y pesaron los hígados; luego, los autores de la invención hicieron una biopsia del órgano para determinar el estado de la fibrosis, confirmar la cirrosis con un colorante rojo Sirius después de fijarlo en formalina al 10%.

Si la puntuación METAVIR no era F4 para las ratas BDL, estos animales quedaron excluidos del análisis.

30 Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como media +/- derivación estándar y se analizaron con Prism (Graphpad, v5.0c). Las diferencias entre los grupos se compararon mediante el uso de un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA identificó diferencias significativas entre los grupos, se utilizó el ensayo de Dunnett para las comparaciones entre grupos.

35 La diferencia se consideró estadísticamente significativa si p era inferior a 0,05.

Ejemplo 4 - Resultados

40 - Los modelos de rata BDL y CCl₄ tienen ambos cirrosis. Se puede observar una fibrosis extensiva y una arquitectura destruida del parénquima del hígado, clasificar F4 con la puntuación METAVIR. Consistentemente, los marcadores hepáticos plasmáticos se cambian en los dos modelos y las diferencias entre los dos modelos reflejan el origen de la enfermedad hepática. En BDL, la alteración preponderante es la hiperbilirrubinemia, mientras que en CCl₄ es la elevación de la transaminasa (ASAT y ALAT) (Figuras 1 y 4). Ambos modelos de ratas BDL y CCl₄ desarrollan hiperamonemia (Figura 3).

45 - El ensayo de Campo Abierto demuestra que las ratas BDL desarrollan discapacidades neurológicas: se observó una distancia total significativamente más corta recorrida, una duración de la actividad más corta, una velocidad más lenta y menos crías y más cortas en comparación con ratas Simulado. Estas anomalías no se encontraron en ratas CCl₄. Esto sugiere que las ratas BDL mostraron una HE en el ensayo de Campo Abierto, pero no las ratas CCl₄ (Figuras 2 y 5).

- El tratamiento con biotina (300 mg/kg de alimento) fue capaz de reducir la hiperamonemia en ratas BDL (Figura 6 ; ANOVA, p = 0,01).
 - Cuando se administra biotina en dosis altas (300 mg/kg de alimento) a ratas BDL, las deficiencias neurológicas observadas en el ensayo de Campo Abierto se reducen en comparación con las ratas BDL sin biotina.
 - 5 Algunos de los parámetros analizados (distancia total recorrida, velocidad media y duración de la actividad) están casi normalizados en ratas BDL tratadas con biotina en comparación con las ratas Simulado. Por lo tanto, la biotina podría prevenir la aparición de HE si se les da a ratas BDL a una dosis elevada (Figuras 7 y 8 que muestran que una dosis de 50 mg/kg de alimento no es alta suficiente para tener un efecto). Los resultados son similares a los observados con rifaximina o benzoato de sodio (no mostrado).
 - 10 - Las ratas BDL tienen un aumento significativo en la cantidad intracerebral de dextrano-rojo Texas en comparación con Simulado, incluso cuando no se alimentan con agua enriquecida con NH₃; este resultado no se confirmó en las ratas CCl₄ en comparación con las que recibieron solo aceite mineral (Figuras 9 y 10). Esto sugiere que las ratas BDL tendrían una permeabilidad incrementada de la barrera hematoencefálica a los solutos.
 - El tratamiento con biotina (300 mg/kg de alimento) fue capaz de normalizar la cantidad intracerebral de dextrano en comparación con las ratas BDL tratadas con dieta de control (Figura 11), mientras que la dosis de 50 mg/kg de alimento no alcanzó la normalización. Esto sugiere que las altas dosis de biotina son capaces de prevenir alteraciones de la permeabilidad de la BBB durante la HE en cirrosis.
 - 15 - Los resultados de los autores de la invención demuestran que tanto las ratas BDL como CCl₄ desarrollan cirrosis, y ambas desarrollan hiperamonemia. Sin embargo, las ratas BDL mostraron una HE y tuvieron una mayor permeabilidad de BBB a los solutos, mientras que las ratas CCl₄ no. Las diferencias observadas entre los grupos BDL y CCl₄ podrían deberse a las citoquinas inflamatorias (Figuras 12 y 13). Se observó una mayor tasa de IFN γ y TNF α en ratas BDL con HE en comparación con todos los otros grupos de ratas (BDL sin HE, Simulado, CCl₄ y Aceite). En ratas BDL tratadas con biotina, disminuyeron los niveles de IFN γ en plasma. Estos resultados parecen confirmar que la hiperamonemia por sí sola no es suficiente para desarrollar HE durante la cirrosis y que la inflamación junto con la hiperamonemia sería necesaria para desencadenar la HE. Biotina prevendría la HE tanto mediante la reducción de la hiperamonemia como mediante la reducción directa o indirecta de la producción de citoquinas inflamatorias.
 - 20 Resumiendo, en ratas BDL se puede observar un pequeño aumento de las transaminasas (ALAT y ASAT), un gran aumento de bilirrubina y una baja disminución de la albúmina (Figura 1).
 - 30 El modelo CCl₄ descrito en esta memoria es diferente del modelo CCl₄ descrito en Nagamine et al o el documento JPH01226814A, que es un modelo de hiperamonemia aguda con un solo brote de dosis alta. En el presente modelo, pequeñas dosis de CCl₄ se administran a los animales a lo largo de unos pocos días para imitar más estrechamente una enfermedad crónica. Se puede observar un aumento muy alto de transaminasas, un bajo aumento de bilirrubina y ninguna modificación de la albúmina (Figura 4).
 - 35 Ambos animales en los modelos tienen una amoniemia incrementada, pero sólo los animales BDL mostraron una HE, a la vista de las alteraciones del comportamiento, mientras que tales alteraciones no se observaron en animales CCl₄.
- Se puede observar además que las ratas BDL han aumentado la permeabilidad de BBB, pero no las ratas CCl₄.
- 40 La biotina, proporcionado a razón de 30 mg/kg de animal/día (correspondiente a una dosis diaria de 300 mg en seres humanos), pero no biotina proporcionada a razón de 5 mg/kg de animal/día (correspondiente a una dosis diaria de 50 mg en seres humanos) mejora el estado del animal en términos de mejora del comportamiento y la normalización de la permeabilidad de la BBB y, por tanto, impediría el desarrollo de HE.
- A partir de la fecha reseñada en esta memoria y las figuras, se postula que biotina actúa disminuyendo la amoniemia y modulando el perfil inflamatorio.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Biotina para uso en el tratamiento o la prevención de la encefalopatía hepática, en donde la cantidad diaria de biotina administrada al paciente es de al menos 200 mg, y en donde la encefalopatía hepática es una encefalopatía hepática de tipo C.
- 5 2. Biotina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la encefalopatía hepática es una encefalopatía hepática de tipo C persistente.
3. Biotina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la encefalopatía hepática es una encefalopatía hepática de tipo C episódica.
- 10 4. Biotina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la encefalopatía hepática es una encefalopatía hepática de tipo C mínima.
5. Biotina para el uso de la misma para la prevención de la encefalopatía hepática en un paciente con cirrosis, en donde la cantidad diaria de biotina administrada al paciente es de al menos 200 mg, en donde la encefalopatía hepática es una es una encefalopatía hepática de tipo C.
- 15 6. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 , en que la cantidad diaria de biotina administrada al paciente es de al menos 250 mg.
7. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que la cantidad diaria de biotina administrada al paciente es de al menos 300 mg.
8. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que se trata de una forma adecuada para la administración oral.
- 20 9. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que está en forma de cápsulas de gel, comprimidos (opcionalmente recubiertos con película), pastillas o píldoras.
10. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que está en forma de una composición que contiene biotina y excipientes, sin ningún otro ingrediente activo.
- 25 11. Biotina para uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por que los excipientes se eligen del grupo que consiste en talco, celulosa microcristalina, lactosa y manosa.
12. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que se trata de una forma adecuada para la administración inyectable.
13. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que está en forma de una composición de liberación lenta.
- 30 14. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 , en donde dicho tratamiento con biotina tiene una duración de al menos 3 meses.
15. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho tratamiento con biotina tiene una duración de al menos 6 meses.
- 35 16. Biotina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho tratamiento con biotina tiene una duración de al menos un año.
17. Composición de biotina y al menos otro fármaco contra la encefalopatía hepática para uso simultáneo, separado o secuencial (extendido a lo largo del tiempo) en el tratamiento de la encefalopatía hepática de tipo C, en donde la cantidad diaria de biotina administrada al paciente es de al menos 200 mg.
- 40 18. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho otro fármaco se elige del grupo que consiste en lactulosa, lactitol, neomicina, metronidazol, rifaximina y una combinación de L-ornitina y L-aspartato (LOLA).

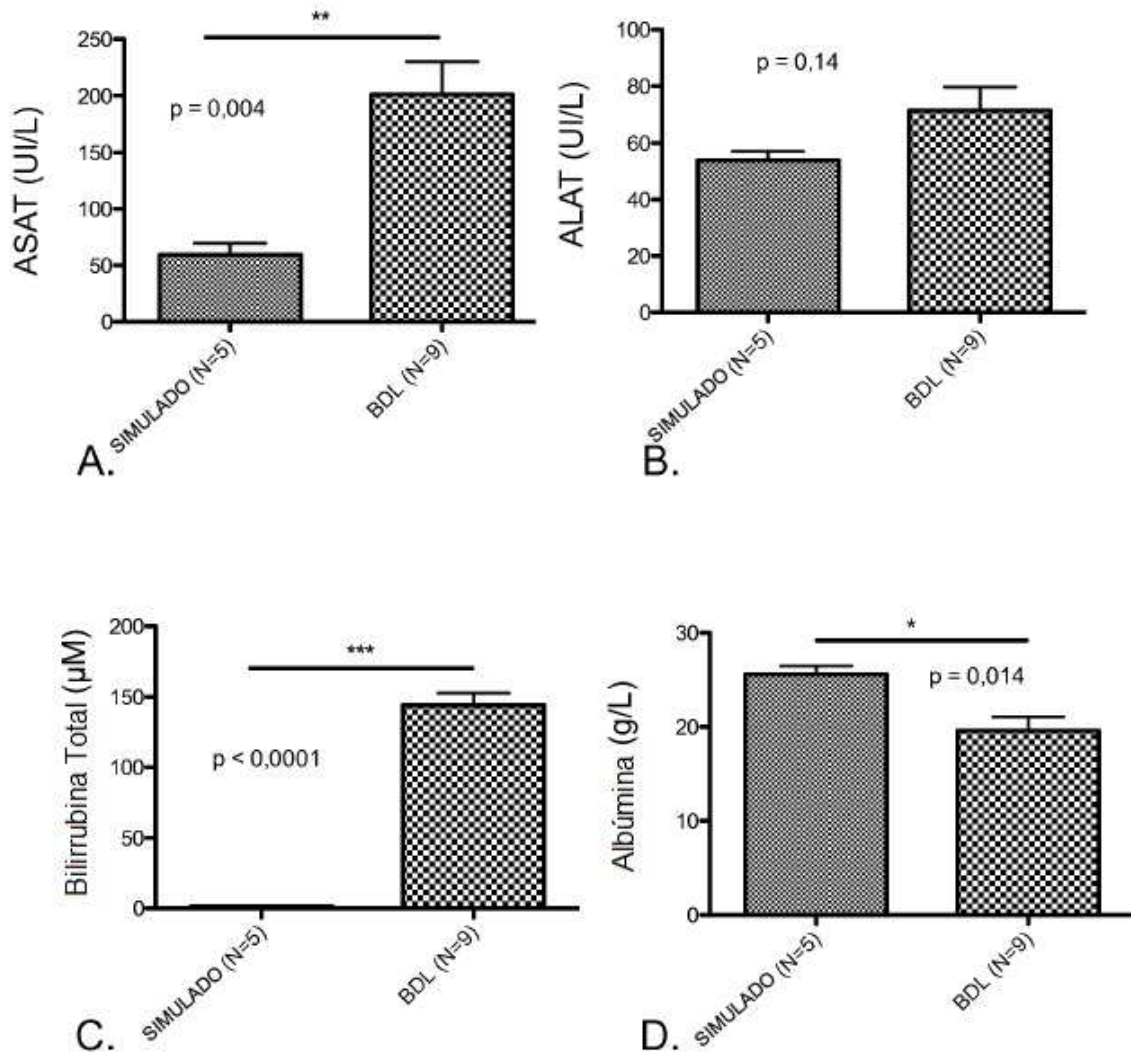


Figura 1

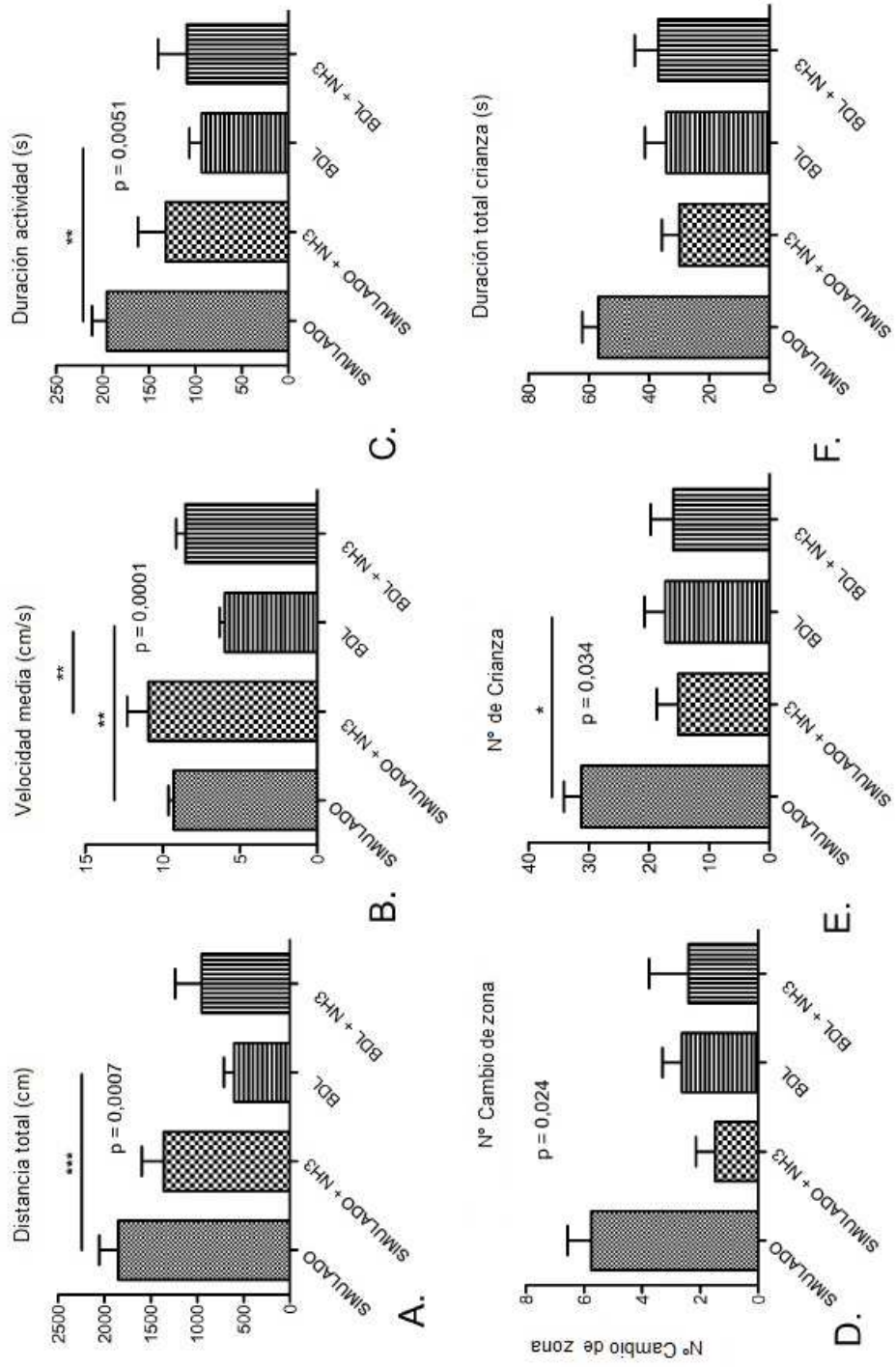


Figura 2

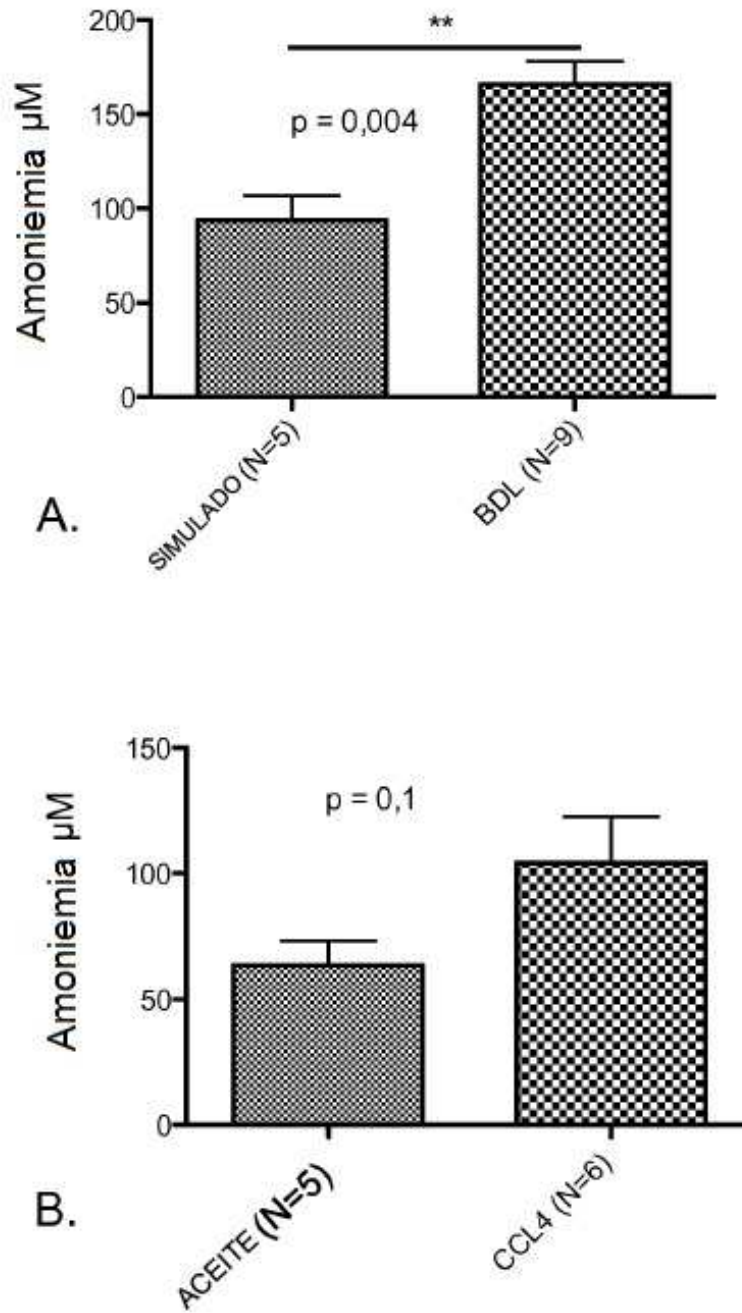


Figura 3

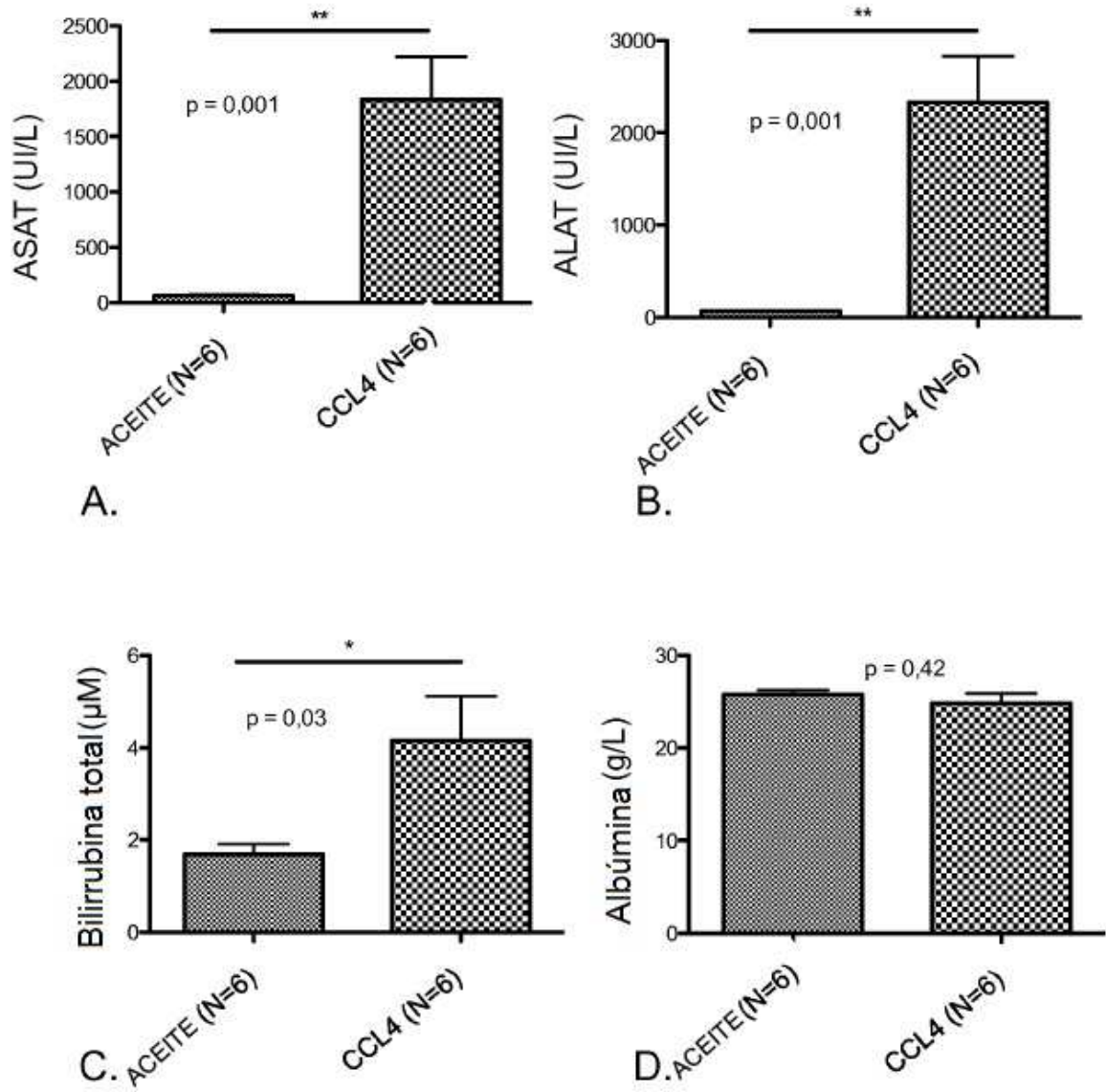


Figura 4

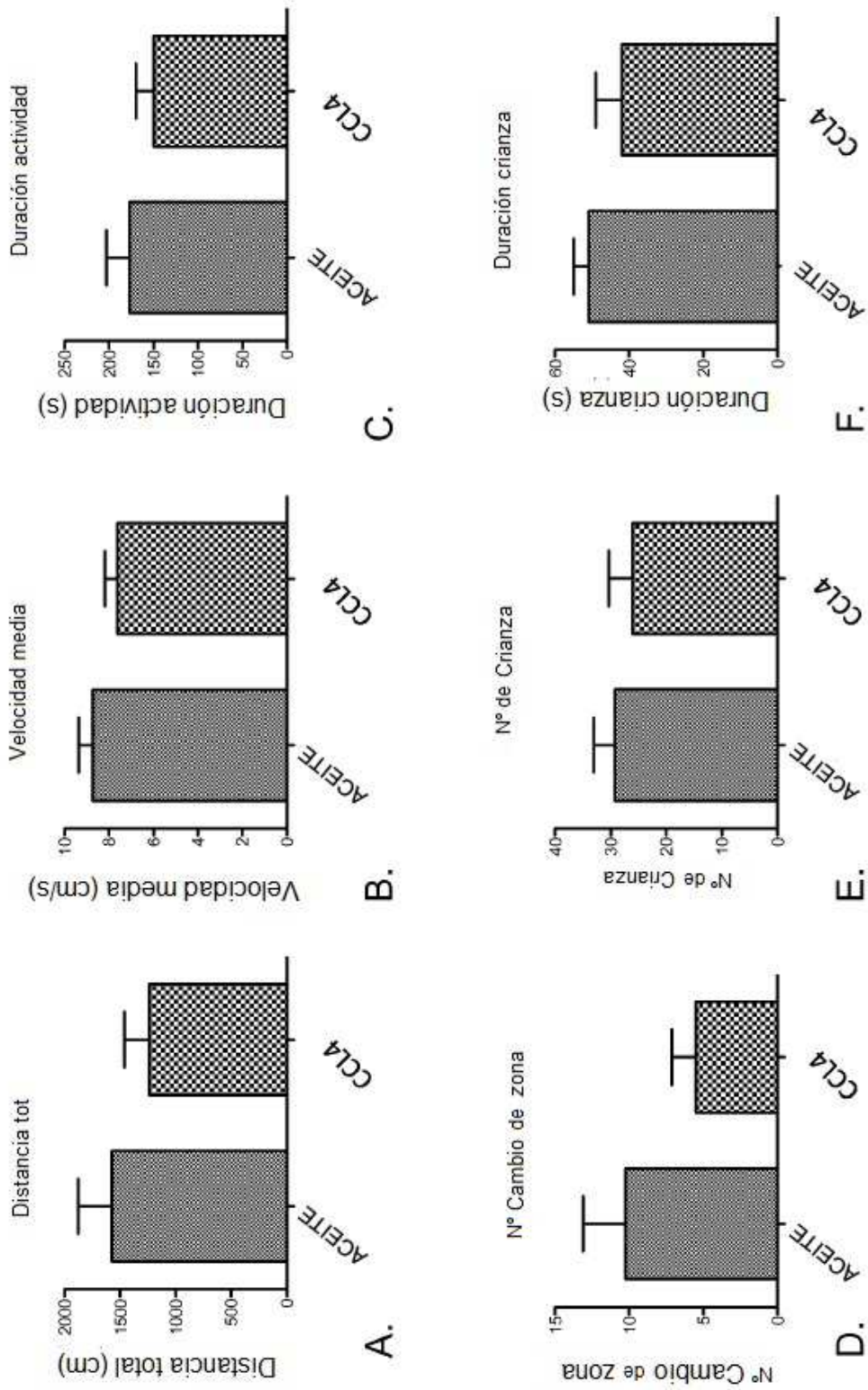


Figura 5

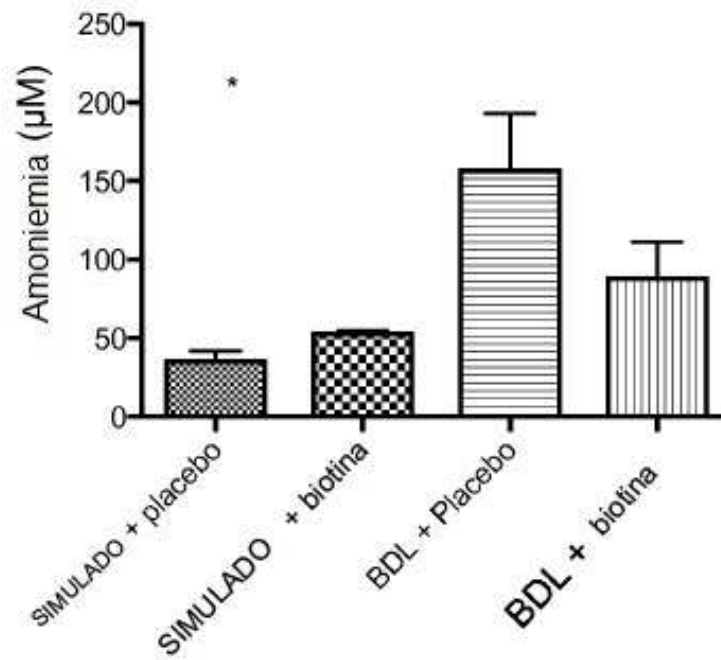


Figura 6

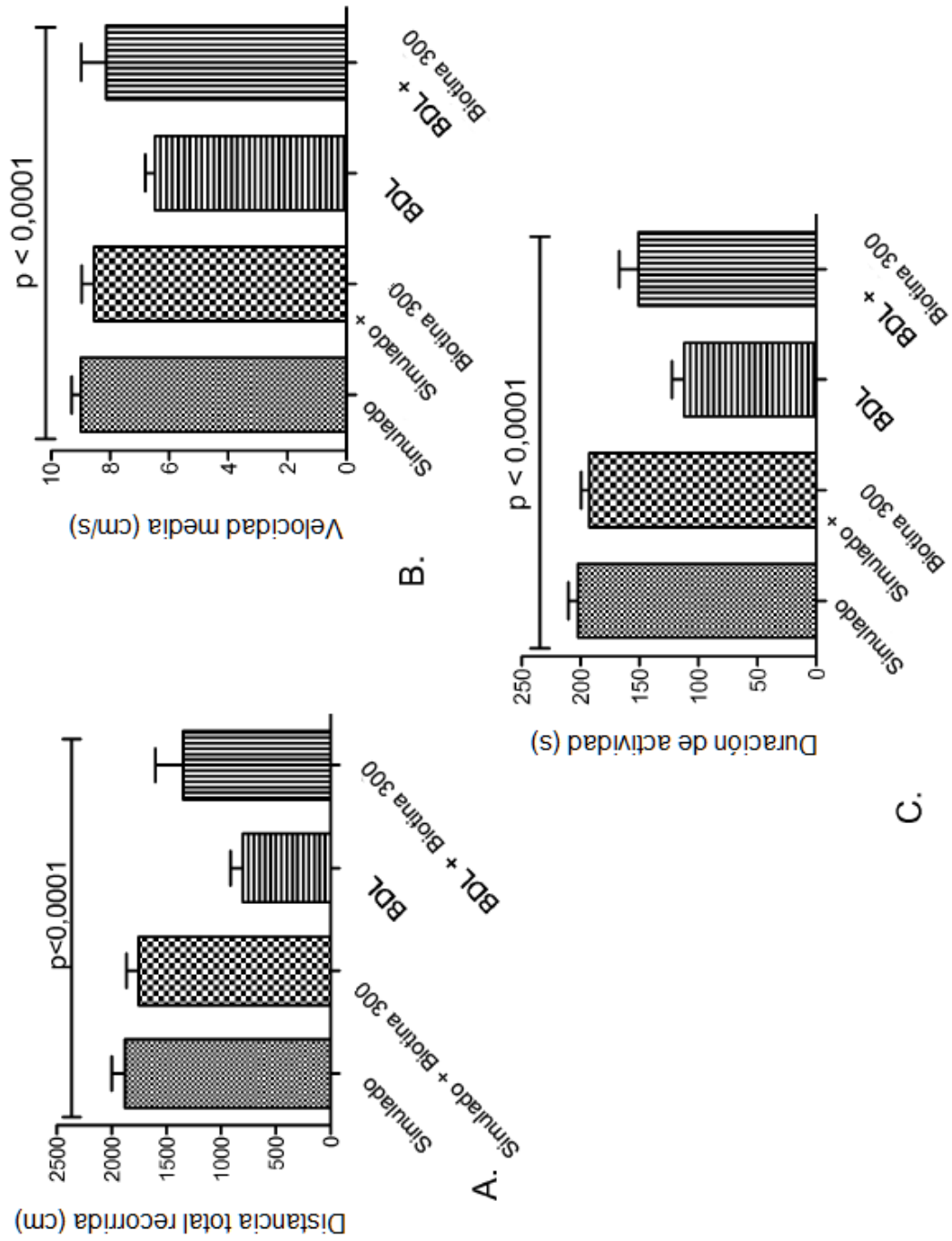


Figura 7

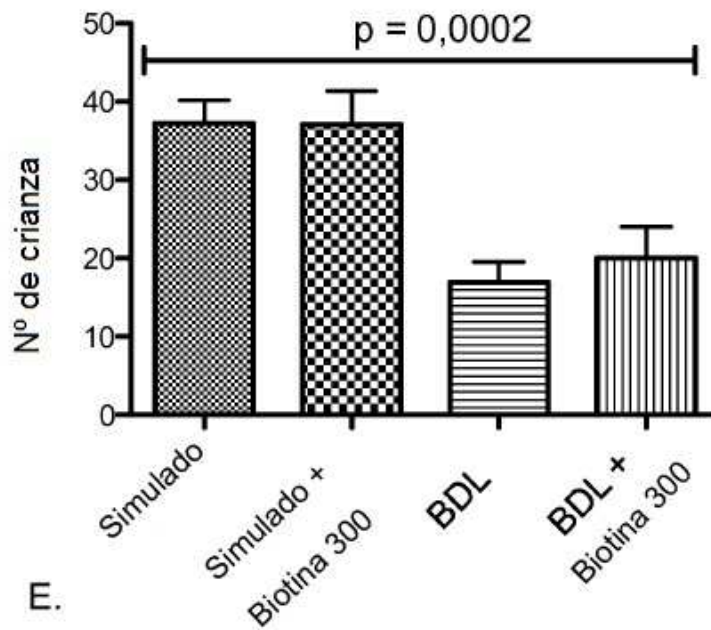
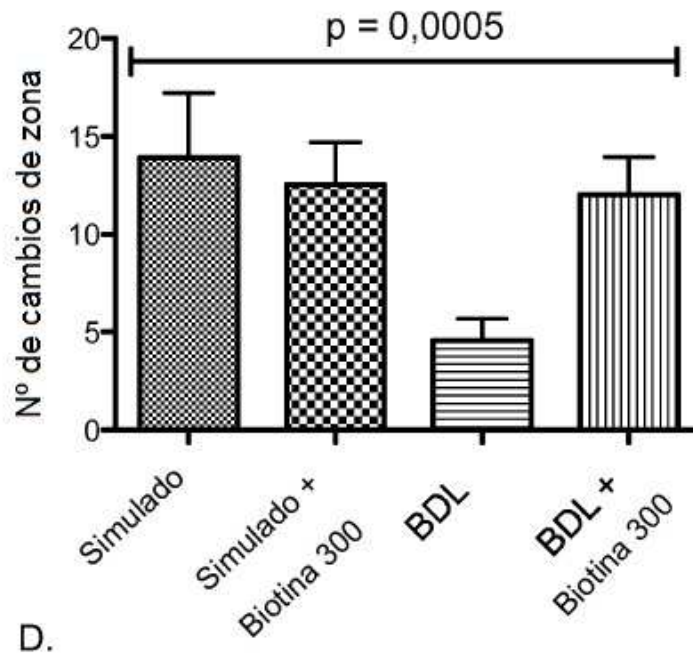


Figura 7 (continúa)

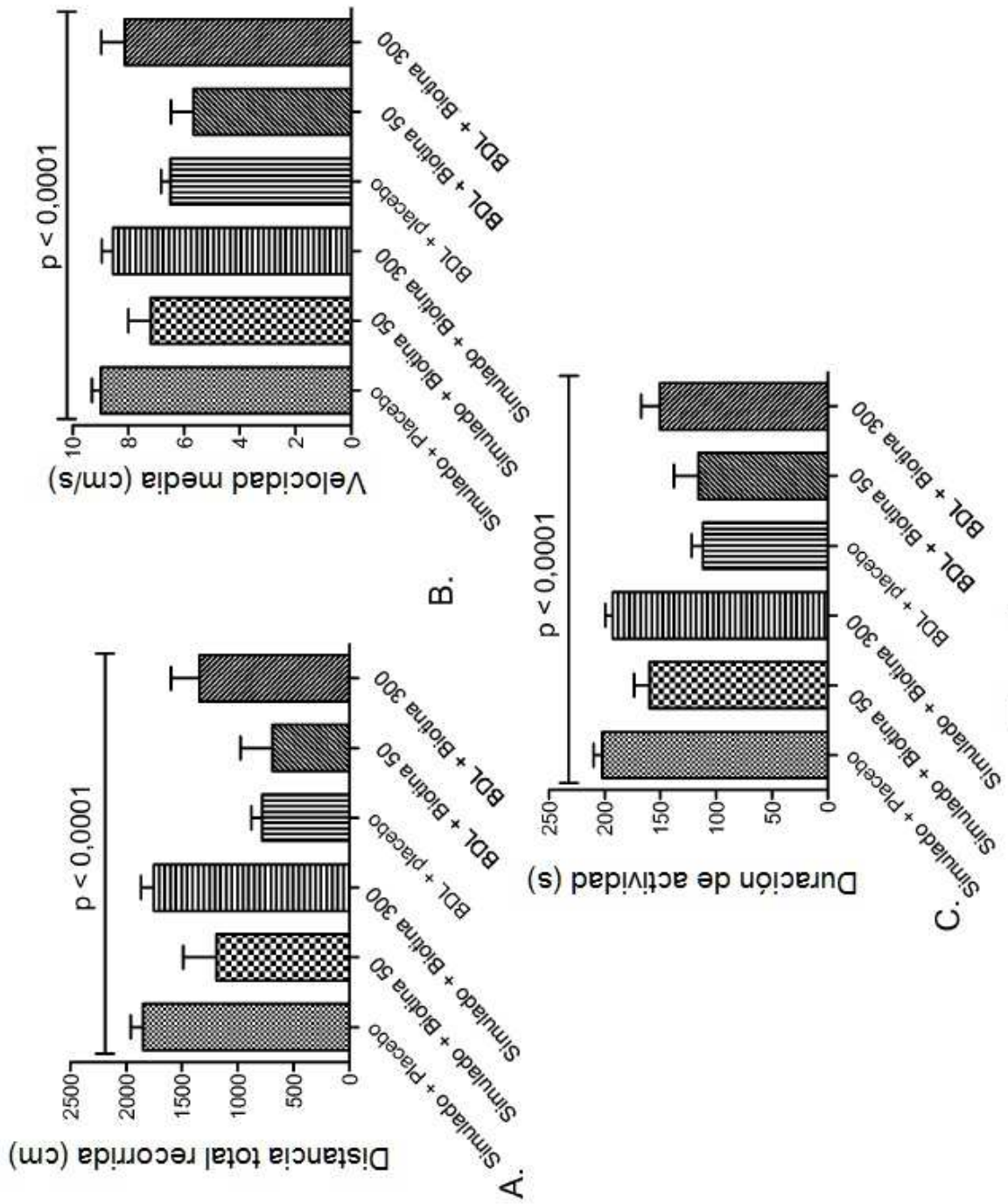


Figura 8

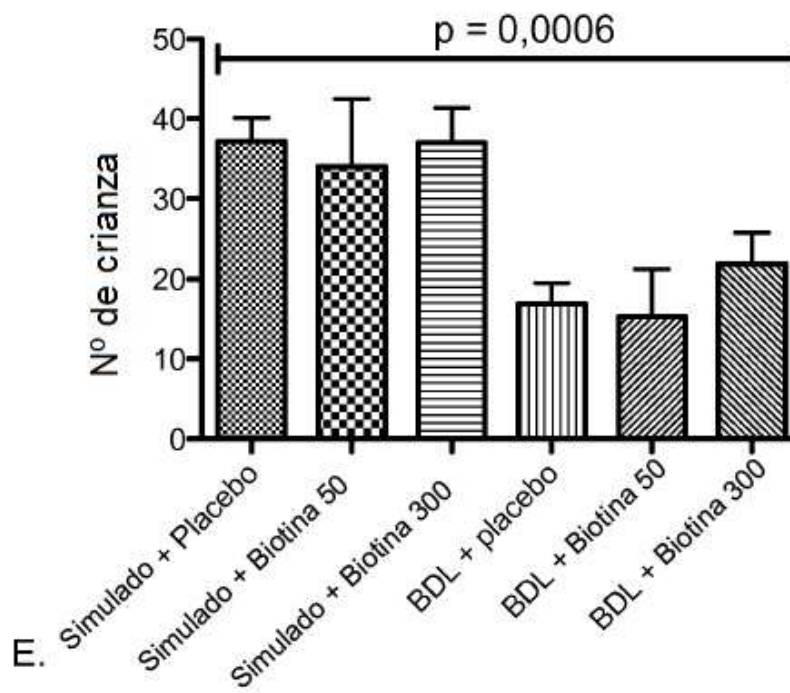
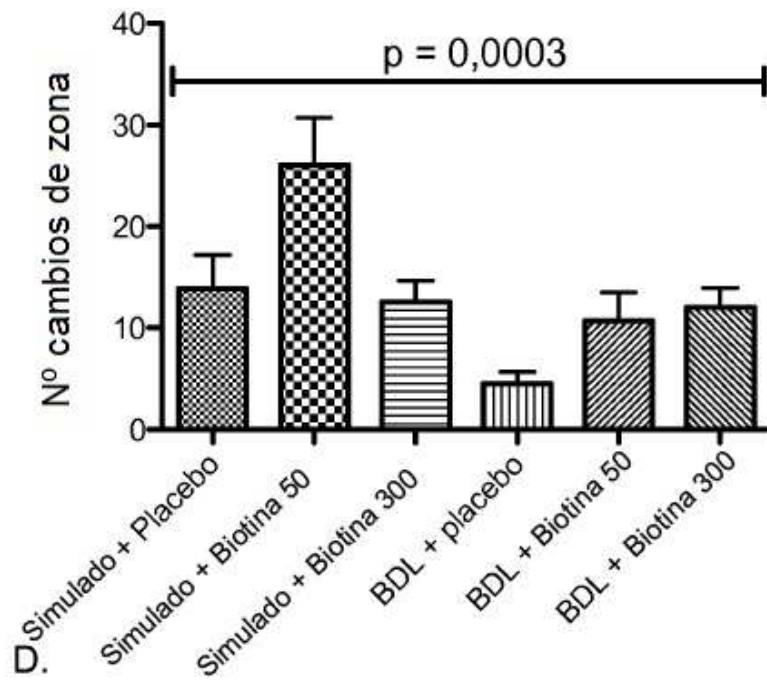


Figura 8 (continúa)

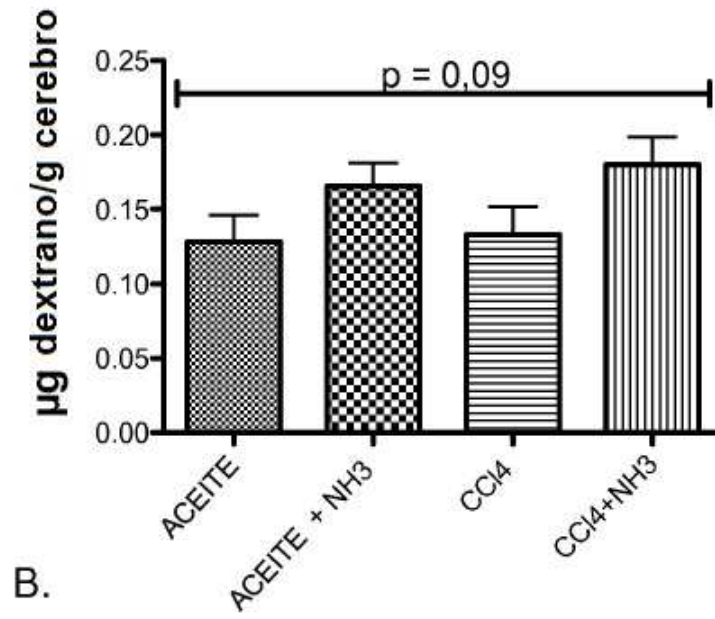
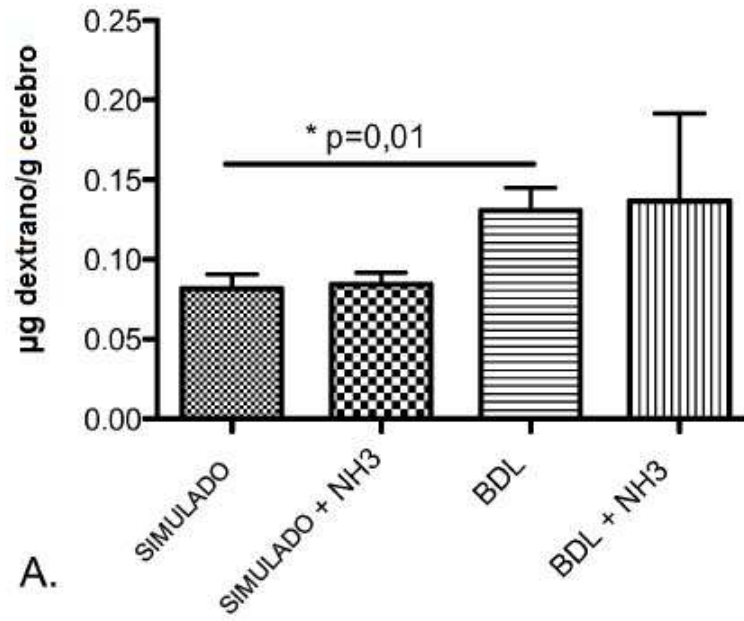


Figura 9

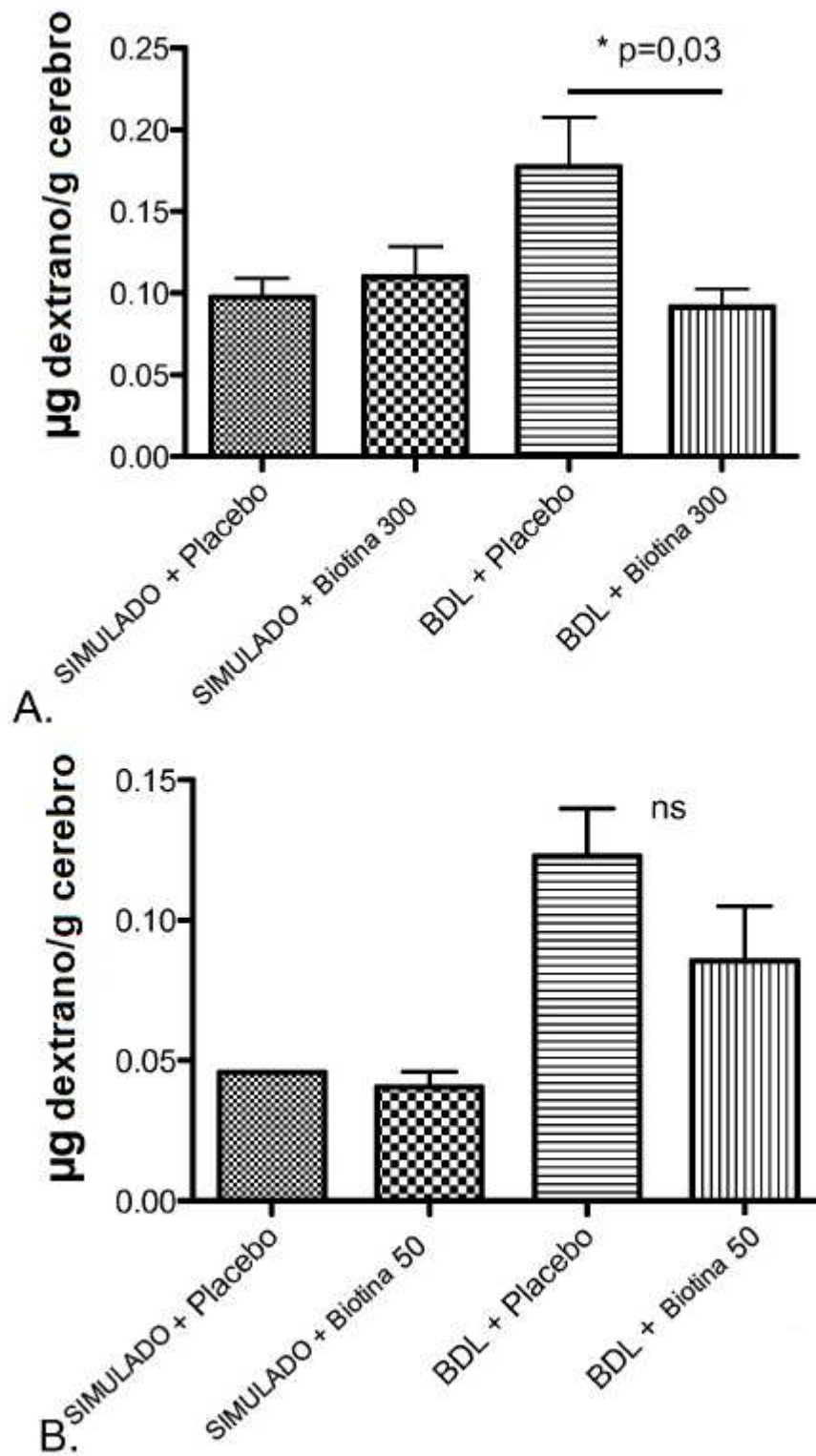


Figura 10

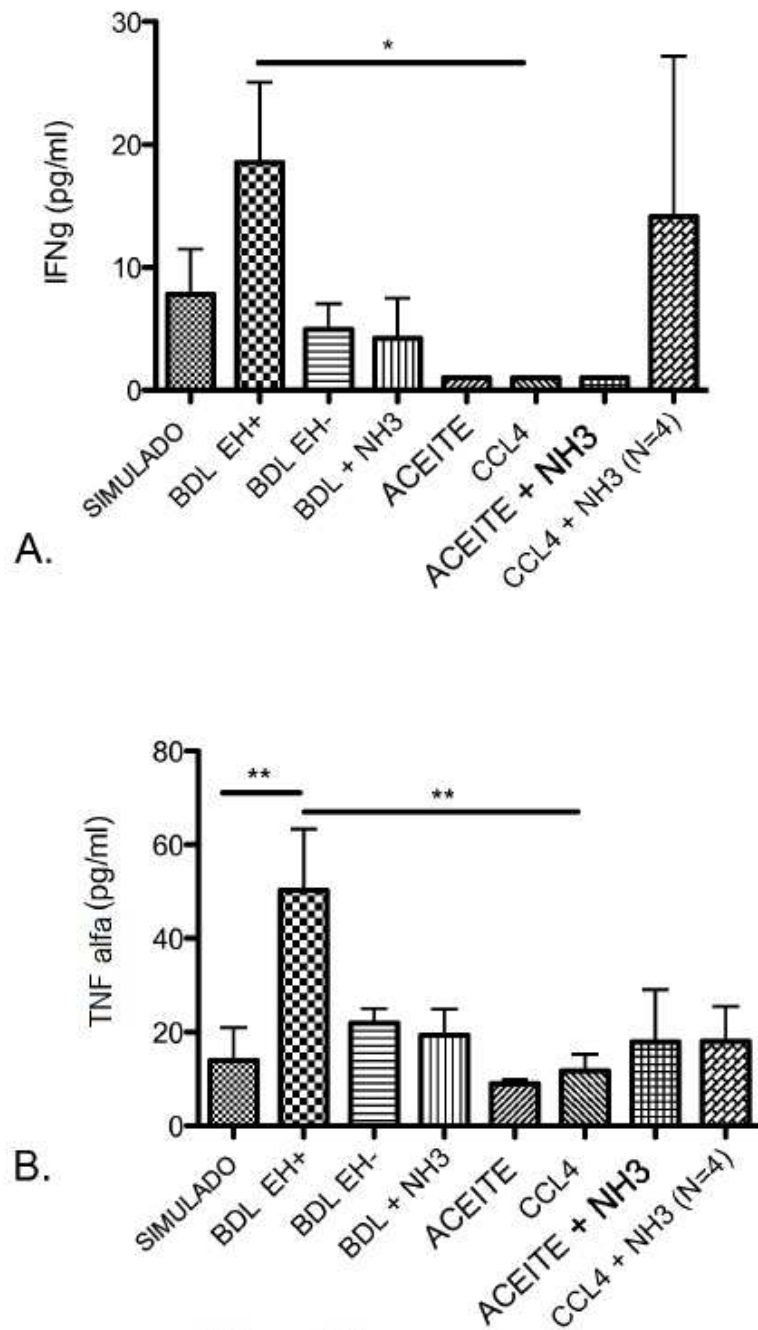


Figura 11

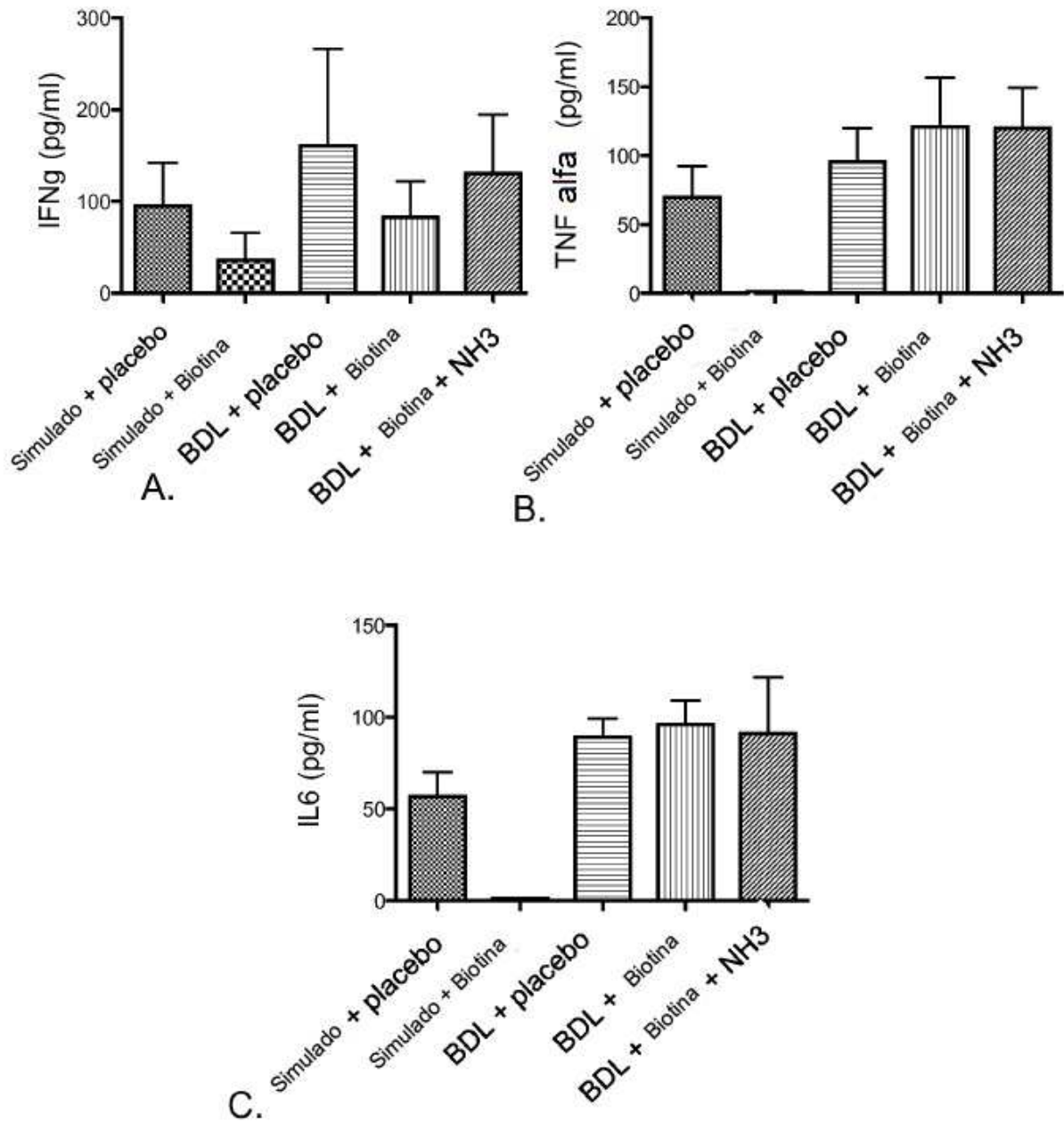


Figura 12