

(11) Número de Publicação: **PT 1824563 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61P 1/16** (2007.10) **A61K 31/192** (2007.10)  
**A61K 31/198** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2005.11.28**

(30) Prioridade(s): **2004.11.26 GB 0426141**  
**2004.11.26 GB 0426142**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.08.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.02.10**  
**094/2010**

(73) Titular(es):

**UCL BUSINESS PLC**  
FINANCE DIVISION UNIVERSITY COLLEGE  
LONDON GOWER STREET LONDON WC1E 6BT  
GB

(72) Inventor(es):

**RAJIV JALAN**  
**KAMAL NAYAN JALAN**

GB  
IN

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ORNITINA E FENILACETATO OU  
FENILBUTIRATO PARA TRATAMENTO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### **"Composições compreendendo ornitina e fenilacetato ou fenilbutirato para tratamento de encefalopatia hepática"**

#### **Campo do invento**

O presente invento refere-se à prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

#### **Antecedentes do invento**

A doença crónica do fígado é caracterizada pela destruição gradual do tecido do fígado ao longo do tempo, pela qual tecido de fígado saudável e em regeneração é lentamente substituído por tecido cicatricial e necrótico. Isto é conhecido como cirrose do fígado. A função normal do fígado é diminuída e o tecido cicatricial diminui progressivamente o fluxo sanguíneo através do fígado. À medida que o tecido de fígado em regeneração normal se perde, nutrientes, hormonas, fármacos e toxinas deixam de ser processados eficazmente.

Isto pode resultar em sintomas incluindo depuração anormal de proteínas absorvidas através do tracto intestinal, conduzindo a acumulação de amónia; excreção anormal, conduzindo a uma acumulação de bilirrubina no sangue, produzindo icterícia; pressão sinusoidal aumentada, conduzindo a acumulação de fluido no abdómen (ascite); e hipertensão portal (e derivação porto-sistémica) onde o tecido de fígado cicatrizado actua como barreira ao fluxo sanguíneo, conduzindo a pressão sanguínea portal aumentada e a varizes esofágicas.

Pacientes com doença crónica do fígado podem estar num estado clínico razoavelmente estável e exibir poucos ou nenhum sintomas. Contudo, estes pacientes estão em risco de uma deterioração abrupta na sua condição que pode conduzir a um episódio agudo na insuficiência hepática crónica ("acute-on-chronic"). Esta transição de um estado "compensado", em que o fígado é capaz de funcionar, embora a um nível reduzido, para um estado "descompensado", em que a função do fígado falha, envolve o efeito de eventos precipitadores. Eventos precipitadores associados à doença crónica do fígado incluem hemorragia gastrointestinal, infecção (sepsia), trombose da veia porta e desidratação.

Por exemplo, 50% dos pacientes com cirrose do fígado têm varizes esofágicas e num terço destes pacientes, as varizes esofágicas rebentarão e causarão hemorragia gastrointestinal em dois anos após o diagnóstico (Grace, N.D. (1992) *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 21: 149-161). É conhecido que uma hemorragia gastrointestinal superior aumenta a susceptibilidade a complicações com risco de vida tais como peritonite bacteriana, sepsia, insuficiência renal e encefalopatia hepática (Teran et al. (1997) *Gastroenterology* 112: 473-482; Garden et al. (1985) *Br. J. Surg.* 72: 91-95; Pauwels et al. (1996) *Hepatology* 24: 802-806; Bleichner et al. (1986) *Br. J. Surg.* 73: 724-726) resultando na morte de cerca de 30% dos pacientes apesar do controlo adequado da hemorragia (Grace 1992 *supra*).

A encefalopatia hepática (EH) é uma perturbação neuropsiquiátrica complexa que ocorre em diversas situações clínicas tais como doença do fígado aguda ou crónica e derivação venosa porto-sistémica espontânea. Nas fases iniciais de encefalopatia hepática ocorrem alterações mentais subtils tais como fraca concentração, confusão e desorientação. Em casos graves, a encefalopatia hepática pode conduzir a estupor, coma, inchaço do cérebro (edema cerebral) e morte. No caso de pacientes que desenvolvem EH como resultado de doença crónica do fígado, o surgimento de EH é frequentemente o resultado de um evento precipitador clinicamente tal como hemorragia gastrointestinal, sepsia (infecção), trombose da veia porta ou desidratação.

A hemorragia gastrointestinal e a derivação porto-sistémica permitem que substâncias tóxicas, que são usualmente metabolizadas pelo fígado, façam o bypass ao fígado, entrem na circulação sistémica e atravessem a barreira hematoencefálica para exercer efeitos neurotóxicos directos ou indirectos no sistema nervoso central. Pensa-se que a acumulação de amónia desempenha um papel importante na progressão da encefalopatia hepática e na insuficiência de múltiplos órgãos (insuficiência respiratória, insuficiência cardiovascular, insuficiência renal). Para além da amónia, a septicemia (ou peritonite bacteriana), que se desenvolve pouco depois de uma hemorragia gastrointestinal, é também provavelmente um factor que contribui para a encefalopatia hepática.

A descompensação do fígado pode depois conduzir a insuficiência de múltiplos órgãos e a encefalopatia hepática.

Nas fases iniciais da encefalopatia hepática ocorrem alterações mentais subtils tais como fraca concentração ou a incapacidade para idealizar objectos simples. Em casos graves, a encefalopatia hepática pode conduzir a estupor, coma, inchaço do cérebro e morte.

O prognóstico para pacientes com doença crónica do fígado é difícil de estimar porque a condição tem muitas causas. Medidas preventivas para minimizar a progressão do estado compensado para o estado descompensado incluem o evitar mais agentes causadores que agravarão a condição, tais como abstinência total de álcool e vacinação contra as hepatites A e B.

Contudo, uma vez ocorrida a descompensação do fígado, as probabilidades de sobrevivência são reduzidas e a transplantação de fígado é o único tratamento que pode prolongar a vida. Uma vez que é a descompensação do fígado que conduz a uma expectativa de vida reduzida, é altamente desejável evitar que a descompensação do fígado ocorra.

Uma terapia comum para pacientes com encefalopatia hepática envolve estratégias para reduzir a concentração de amónia. Estas incluem restrição da ingestão de proteínas na dieta; administração de lactulose, neomicina, L-ornitina-L-aspartato (LOLA) ou benzoato de sódio; e enemas de limpeza.

A CN-A-1383815 relata composições compreendendo ornitina ou seus sais e ácido asparágico ou seus sais. Estas composições são propostas para utilização no tratamento de hepatite aguda, hepatite crónica e encefalopatia hepática.

A US 4 228 099 relata compostos preparados fazendo reagir ornitina ou arginina com análogos alfa-ceto de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada, nomeadamente valina, leucina e isoleucina. Estes compostos são propostos para utilização no tratamento de perturbações hepáticas caracterizadas por hiperamonemia e encefalopatia porto-sistémica.

A US 2005/0182064 relata composições compreendendo riboflavina, um componente do ciclo da ureia e um ou mais aminoácidos. Estas composições são propostas para utilização na redução dos efeitos secundários de fadiga e fraqueza associados ao cancro ou quimioterapia do cancro.

**Sumário do invento**

O presente invento refere-se à utilização de ornitina e de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para prevenir ou tratar a descompensação do fígado ou encefalopatia hepática (EH) em pacientes. Pode-se também administrar isoleucina àqueles pacientes possuindo adicionalmente uma deficiência em isoleucina atribuível, por exemplo, a hemorragia gastrointestinal. Por conseguinte, o invento proporciona:

- utilização de ornitina no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática;
- utilização de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com ornitina para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática;
- utilização de ornitina e de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato no fabrico de um medicamento para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática;
- produtos contendo ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde os referidos produtos são para utilização simultânea, separada ou sequencial;
- uma composição farmacêutica compreendendo ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização num método de prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática;
- ornitina para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde a referida ornitina é utilizada em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato;
- pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde o referido fenilacetato e/ou fenilbutirato é utilizado em combinação com ornitina.

**Breve descrição das Figuras**

A Figura 1 mostra que a função dos neutrófilos está alterada em pacientes com cirrose e agrava-se com a gravidade crescente da doença do fígado.

A Figura 2 mostra que a amónia reduz a fagocitose dos neutrófilos.

A Figura 3 mostra que a amónia reduz a quimiotaxia dos neutrófilos.

A Figura 4 mostra que o efeito de amónia na fagocitose dos neutrófilos pode ser revertido por intervenções.

A Figura 5 mostra que uma hemorragia gastrointestinal simulada reduz a quimiotaxia dos neutrófilos o que pode ser parcialmente revertido por administração de isoleucina.

A Figura 6 mostra que uma hemorragia simulada reduz a síntese de proteína e estimula a oxidação de isoleucina inapropriadamente.

A Figura 7 mostra que a administração de isoleucina durante uma hemorragia simulada melhora a síntese de proteína mas não reduz a concentração de amónia.

A Figura 8 mostra que a administração com LOLA reduz a concentração de amónia mas permite que a amónia se regenere.

A Figura 9 mostra que a remoção activa de glutamina previne a elevação secundária da concentração de amónia.

A Figura 10 mostra que o fenilacetato se liga a glutamina para formar um composto excretável e previne a elevação secundária da amónia.

A Figura 11 mostra o efeito de ornitina e fenilbutirato nos níveis de amónia em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 12 mostra o efeito de ornitina e fenilbutirato nos níveis de glutamina em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 13 mostra as alterações no estado mental de pacientes tratados com placebo, O, P ou O+P.

A Figura 14 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de amónia em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 15 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de glutamina em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 16 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de glicina em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 17 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de isoleucina em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 18 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de ornitina em pacientes com cirrose avançada.

A Figura 19 mostra o efeito de ornitina e fenilbutirato na amónia arterial no modelo de rato de ducto biliar laqueado.

A Figura 20 mostra o efeito de ornitina e fenilbutirato na ornitina no plasma no modelo de rato de ducto biliar laqueado.

A Figura 21 mostra o efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina nos níveis de amónia no plasma arterial num modelo de rato de insuficiência hepática aguda hiperamonémica.

A Figura 22 mostra um aumento em amónia arterial contido no modelo de porco desvascularizado de insuficiência hepática aguda com tratamento OP.

A Figura 23 mostra que a amónia está a ser retirada do sangue pelo músculo nos animais tratados com O e OP (as amostras foram retiradas da veia - artéria femoral). Em contraste, os animais tratados com placebo e com P sozinho mostram um aumento na produção de amónia pelo músculo.

A Figura 24 mostra que a amónia é produzida pelo intestino em todos os animais excepto nos animais tratados com

OP (a amostras foram retiradas da víscera escorruda portal - artéria).

A Figura 25 mostra que a libertação de glutamina de músculo é aumentada por O mas não por P utilizado isoladamente. OP causaram uma libertação nitidamente mais elevada de glutamina de músculo (aprisionando por isso amónia como glutamina no músculo).

A Figura 26 mostra que a absorção de glutamina no intestino é melhorada por O, mas reduzida por OP (reduzindo por isso a geração de amónia no intestino).

A Figura 27 mostra que os níveis arteriais de ornitina aumentam nos dois animais (grupos de O sozinho e OP) aos quais é administrada.

A Figura 28 mostra que os níveis de glutamina arterial aumentam com O, mas menos com OP.

A Figura 29 mostra que a combinação de OP previne o aumento no aminoácido amoniagénico glicina.

A Figura 30 mostra que a ornitina sozinha causou um aumento em água no cérebro, o fenilacetato induziu uma pequena redução em água no cérebro, enquanto em combinação estes causam uma redução substancial em água no cérebro (% do controlo).

#### **Descrição detalhada do invento**

Ao longo do presente fascículo e nas reivindicações apensas, as palavras "compreender" e "incluir" e variações tais como "compreende", "compreendendo", "inclui" e "incluindo" devem ser interpretadas inclusivamente. Isto é, estas palavras pretendem transmitir a possível inclusão de outros elementos ou números inteiros não especificamente enunciados, onde o contexto o permita.

O presente invento refere-se ao tratamento precoce de pacientes com doença do fígado, antes do desenvolvimento de descompensação do fígado e assim antes de ter ocorrido encefalopatia hepática, para prevenir ou retardar o surgimento de descompensação do fígado. Alternativamente, o presente invento refere-se ao tratamento de encefalopatia hepática por

redução eficaz da concentração de amónia e manutenção da função dos neutrófilos.

### ***Sujeitos a tratar***

O presente invento refere-se à prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática. O fígado do sujeito pode portanto estar no estado compensado. O sujeito pode ter doença crónica do fígado. O sujeito pode ter cirrose do fígado. O sujeito pode ter insuficiência hepática aguda. O sujeito a ser tratado pode ter encefalopatia hepática.

O início da doença aguda e crónica do fígado pode ser devido a uma causa xenobiótica. Por exemplo, o sujeito pode ter sido exposto a um produto químico, fármaco ou algum outro agente que causa lesão do fígado. O sujeito pode ter uma reacção a um fármaco de venda livre, de prescrição ou "recreativo" que causa lesão do fígado. O sujeito pode ter estado a tomar Rezulin™ (troglitazona; Parke-Davis), Serzone™ (nefazodona; Bristol-Myers Squibb) ou outros fármacos que se pensa que causam lesão do fígado. O sujeito pode ser um sujeito que sofreu uma sobredosagem de um fármaco particular ou que excedeu a dosagem recomendada de um fármaco capaz de causar lesão do fígado. Por exemplo, o sujeito pode ter tomado uma sobredose de paracetamol. O sujeito pode ter estado exposto a produtos químicos que podem causar lesão do fígado tal como, por exemplo, no seu local de trabalho. Por exemplo, o sujeito pode ter estado exposto a tais produtos químicos num contexto industrial ou agrícola. O sujeito pode ter consumido plantas que contêm compostos que podem causar lesão do fígado, em particular este pode ser o caso quando o sujeito é um animal, tal como um herbíboro. Por exemplo, o sujeito pode ter consumido uma planta contendo alcalóide pirrolizidina tal como tasna. O sujeito pode ter sido exposto a toxinas ambientais que se pensa que causam doença do fígado.

A toxicidade hepática relacionada com fármacos compreende mais de 50% de todos os casos com doença aguda do fígado (insuficiência hepática aguda). A toxicidade do acetaminofeno (também conhecido como paracetamol e N-acetil-p-aminofenol) é a causa mais comum de insuficiência hepática aguda nos Estados Unidos e na Grã-Bretanha. Utilizadores de álcool moderados a pesados de longo prazo que tomam acetaminofeno em doses terapêuticas ou moderadamente excessivas estão em risco de grave lesão do fígado e possivelmente de insuficiência

hepática aguda. O uso do álcool potencia os efeitos tóxicos do acetaminofeno. A toxicidade idiossincrática de fármacos contribui também para a insuficiência hepática aguda. Pensa-se que a toxicidade idiossincrática de fármacos é uma resposta de hipersensibilidade onde o sujeito responde a um fármaco de um modo farmacologicamente anormal. Esta resposta anormal pode conduzir a insuficiência hepática aguda.

A insuficiência hepática aguda ou a doença crónica do fígado podem ser causadas por infecção com um organismo patogénico. Por exemplo, a doença do fígado pode ser devida a infecção viral. Em particular, o sujeito pode estar infectado, ou ter sido infectado, por um vírus que causa hepatite. O sujeito pode ter hepatite viral crónica. Por exemplo, o vírus pode ser o vírus de hepatite B, C ou D. Nalguns casos, e em particular quando o sujeito tem hepatite viral, o sujeito pode também estar infectado com HIV-I ou II. O sujeito pode ter SIDA. É possível que o sujeito possa ter estado, ou esteja, infectado com outros organismos que causam doença do fígado e em particular aqueles que estão presentes no fígado durante alguma fase do seu ciclo de vida. Por exemplo, o sujeito pode ter, ou ter tido, fasciola hepática.

O sujeito pode ter uma doença hereditária que causa, ou aumenta o risco de, doença crónica do fígado. Por exemplo, o sujeito pode ter uma ou mais de hemocromatose hepática, doença de Wilson ou deficiência de  $\alpha$ -1-antitripsina. O sujeito pode ter uma perturbação hereditária que causa algum tipo de anomalia estrutural ou funcional no fígado que aumenta a probabilidade de fibrose hepática. O sujeito pode estar geneticamente predisposto a desenvolveu uma perturbação auto-imune que danifica o fígado e que por isso pode contribuir para fibrose hepática.

A doença crónica do fígado pode ser induzida pelo álcool. Um homem ou mulher a serem tratados podem ser, ou ter sido, um alcoólico. Ele ou ela podem estar, ou ter estado, a consumir em média 50 ou mais unidade de álcool por semana, 60 ou mais unidades de álcool por semana, 75 ou mais unidades de álcool por semana e mesmo 100 ou mais unidades de álcool por semana. O homem ou mulher podem estar, ou ter estado, a consumir em média até 100 unidades de álcool por semana, até 150 unidades de álcool por semana e mesmo até 200 unidades de álcool por semana. A medição de uma unidade de álcool difere de país para

país. Aqui, uma unidade de álcool é igual a 8 gramas de etanol de acordo com a norma do Reino Unido.

O homem ou mulher podem ter estado a consumir estes níveis de álcool durante 5 ou mais anos, 10 ou mais anos, 15 ou mais anos ou 20 ou mais anos. O sujeito pode ter estado a consumir estes níveis de álcool durante até 10 anos, até 20 anos, até 30 anos e mesmo até 40 anos. Em casos de cirrose do fígado induzida pelo álcool, o sujeito pode ter a idade, por exemplo, de 25 anos ou mais, 35 anos ou mais, 45 anos ou mais e mesmo mais de 60 anos.

O sujeito pode ser masculino ou feminino. As mulheres podem ser mais susceptíveis aos efeitos adversos do álcool do que os homens. As mulheres podem desenvolver doença crónica do fígado alcoólica num horizonte de tempo mais curto e a partir de quantidades mais pequenas de álcool do que os homens. Parece não existir um único factor a considerar para a susceptibilidade aumentada à lesão alcoólica do fígado em mulheres, mas o efeito de hormonas no metabolismo do álcool pode desempenhar um papel importante.

Noutras concretizações do invento, o sujeito pode ter uma ou mais de várias outras condições conhecidas por resultarem em lesão do fígado tais como, por exemplo, cirrose biliar primária, hepatite activa crónica auto-imune, e/ou esquistossomose (infecção parasitária). O sujeito pode ter ou ter tido uma obstrução do ducto biliar. Nalguns casos, a causa subjacente da doença crónica do fígado pode não ser conhecida. Por exemplo, o sujeito pode ter sido diagnosticado como tendo cirrose criptogénica. Numa concretização, o sujeito pode ser suspeito de ter qualquer uma das condições aqui listadas.

Métodos para diagnóstico de doença crónica do fígado, insuficiência hepática aguda e encefalopatia hepática são bem conhecidos na especialidade e em particular para médicos e veterinários da área. Preferivelmente, o sujeito terá sido diagnosticado como tendo uma doença do fígado e encefalopatia hepática, por exemplo por um profissional médico ou veterinário. O sujeito pode apresentar um ou mais sintomas associados à doença do fígado tais como um ou mais de icterícia, ascite, alterações da pele, retenção de fluidos, alterações nas unhas, fácil formação de equimoses, hemorragias do nariz, varizes esofágicas, e sujeitos masculinos podem ter hipertrófia de seios. O sujeito pode exibir exaustão, fadiga,

perda de apetite, náusea, fraqueza e/ou perda de peso. O sujeito pode também apresentar um ou mais sintomas associados a encefalopatia hepática tais como um ou mais de confusão, desorientação, demência, estupor, coma, edema cerebral, insuficiência de múltiplos órgãos (insuficiência respiratória, insuficiência cardiovascular ou insuficiência renal), falta de flexibilidade/rigidez muscular, apoplexia ou disfunção da fala. O sujeito a ser tratado pode estar a tomar ou não outros fármacos para tratar a doença do fígado. O sujeito a ser tratado pode estar em risco de desenvolver encefalopatia hepática.

A doença do fígado pode ter sido, ou ser, confirmada por exame físico incluindo técnicas tais como ultra-sons. Podem ter sido colhidas biópsias de fígado para procurar o desenvolvimento de fibrose, células necróticas, degeneração celular e/ou inflamação e outras particularidades características de doença do fígado. A função do fígado pode ter sido avaliada no sujeito para determinar se este está ou não comprometido no sujeito. Podem-se caracterizar a natureza e a causa subjacente da doença do fígado. Pode-se determinar qualquer história de exposição a agentes causadores de doença do fígado.

O sujeito a ser tratado pode estar em risco de episódios de encefalopatia hepática, por exemplo pacientes que estão a aguardar transplantes de fígado, pacientes cirúrgicos e/ou de hipertensão portal. Uma pessoa em risco de episódios de encefalopatia hepática é uma pessoa que não padeceu de quaisquer episódios de encefalopatia hepática ou que não padeceu de qualquer episódio de encefalopatia hepática durante um período de tempo prolongado (cerca de 12 semanas ou mais), mas que tem uma perturbação ou condição médica que cria um risco de episódios de encefalopatia hepática. Um episódio de encefalopatia hepática é uma condição clínica caracterizada pela presença de disfunção cerebral em pacientes com doença do fígado ou disfunção. Existe um vasto espectro de perturbações mentais em encefalopatia hepática que vão desde um mínimo, onde os principais efeitos são uma redução na qualidade de vida, até perturbações manifestas que conduzem a coma e finalmente à morte.

Podem-se utilizar sistemas de pontuação para avaliar a gravidade da doença do fígado e encefalopatia hepática e também para o prognóstico dos sujeitos. Podem-se utilizar os

sistemas de pontuação Child-Pugh, Critérios de West Haven, Escala de Coma de Glasgow ou Child-Pugh modificado. Alternativamente, pode-se utilizar o sistema de pontuação (APACHE) II. São atribuídos pontos a parâmetros incluindo níveis de bilirrubina no soro, níveis de albumina no soro e a sinais incluindo presença de ascite ou encefalopatia. Os sujeitos a tratar podem ser classificados na classe Child-Pugh A, B ou C. Geralmente, os sujeitos a tratar são classificados na classe Child-Pugh C.

Um homem ou mulher a serem tratados podem ter uma idade, por exemplo de 25 a 80 anos. Numa concretização, o homem ou mulher têm uma idade de 45 a 70 anos. Noutra concretização, o homem ou mulher têm uma idade de 25 a 44 anos. Numa concretização adicional, o homem ou mulher têm uma idade superior a 65 anos.

O invento tem todavia utilização veterinária. O sujeito a ser tratado pode ser um animal de criação, por exemplo, uma vaca ou touro, ovelha, porco, boi, cabra ou cavalo, ou pode ser um animal doméstico tal como um cão ou gato. O sujeito pode ser ou não um modelo animal para doença do fígado. O animal pode ter qualquer idade, mas será frequentemente um sujeito adulto maduro.

### ***Formulação***

Os aminoácidos utilizados no presente invento podem ser aminoácidos cristalinos puros. Em geral, os aminoácidos estão na forma L, em vez de na forma D, ou numa mistura de D e L. Utilizam-se tipicamente formas isoladas dos aminoácidos. Pode-se utilizar qualquer forma activa do aminoácido para prevenir ou tratar a descompensação do fígado ou encefalopatia hepática. Pode-se utilizar uma forma farmaceuticamente aceitável do aminoácido. Podem-se utilizar os aminoácidos como aminoácidos livres ou como sais ou derivados de aminoácidos.

A ornitina pode estar na forma de aminoácido cristalino puro. Em geral, a ornitina está na forma L, em vez de na forma D, ou numa mistura de D e L. Utilizam-se tipicamente formas isoladas de ornitina. Pode-se utilizar qualquer forma activa de ornitina ou pode-se utilizar uma forma farmaceuticamente aceitável de ornitina. Pode-se utilizar a ornitina como um aminoácido livre ou como um sal ou derivado de aminoácido.

Tipicamente, utiliza-se a ornitina como um aminoácido monomérico simples. Pode-se utilizar a ornitina na forma de sal, por exemplo pode-se utilizar cloridrato de ornitina. A ornitina pode estar na forma de um sal fisiologicamente aceitável em forma livre. Por conseguinte, a ornitina ou o sal de ornitina estão tipicamente não ligados quimicamente, nem ligados covalentemente a qualquer outro agente.

Podem-se utilizar derivados de ornitina. Por exemplo, podem-se administrar análogos ceto ou hidroxi de ornitina como sais de sódio ou cálcio. Cetoácidos de ornitina incluem ornitina-cetoglutarato, ornitina-cetoleucina e ornitina-cetovalina. Podem-se utilizar sais ou derivados de ornitina em vez de ou para além de ornitina livre.

Pode-se utilizar pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato. Fenilacetato e/ou fenilbutirato podem estar em forma de sal fisiologicamente aceitável, tal como um sal de metal alcalino ou metal alcalino-terroso. O sal pode ser fenilacetato de sódio ou fenilbutirato de sódio. A forma de sal de fenilacetato e fenilbutirato pode estar em forma livre. Deste modo, o fenilacetato e fenilbutirato ou sal de fenilacetato e sal de fenilbutirato estão tipicamente não ligados quimicamente, nem ligados covalentemente a qualquer outro agente.

Opcionalmente utiliza-se isoleucina. A isoleucina pode estar na forma de aminoácido cristalino puro. Em geral, a isoleucina está na forma L, em vez de na forma D, ou numa mistura de D e L. Utilizam-se tipicamente formas isoladas de isoleucina. Pode-se utilizar qualquer forma activa de isoleucina ou pode-se utilizar uma forma farmaceuticamente aceitável de isoleucina. Pode-se utilizar a isoleucina como um aminoácido livre ou como um sal ou derivado de aminoácido.

Tipicamente, utiliza-se a isoleucina como um aminoácido monomérico simples. Pode-se utilizar a isoleucina na forma de sal, por exemplo pode-se utilizar cloridrato de isoleucina. A isoleucina pode estar na forma de um sal fisiologicamente aceitável em forma livre. Por conseguinte, a isoleucina ou o sal de isoleucina estão tipicamente não ligados quimicamente, nem ligados covalentemente a qualquer outro agente.

### **Composições farmacêuticas**

A ornitina e o fenilacetato e/ou fenilbutirato são tipicamente formulados para administração com um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável. A ornitina e o fenilacetato e/ou fenilbutirato podem assim ser formulados como um medicamento com transportador(es) e/ou excipiente(s) farmaceuticamente aceitáveis padrão como é rotina na especialidade farmacêutica. A natureza exacta da formulação dependerá de vários factores incluindo a via de administração desejada. Tipicamente, ornitina e o fenilacetato e/ou fenilbutirato são formulados para administração oral, intravenosa, intragástrica, intravascular ou intraperitoneal.

O transportador ou diluente farmacêutico pode ser, por exemplo, uma solução isotónica tal como solução salina fisiológica. Formas orais sólidas podem conter, em conjunto com o composto activo, diluentes, e.g. lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; lubrificantes, e.g. sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou cálcio, e/ou polietilenoglicóis; agentes ligantes; e.g. amidos, goma-arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinilpirrolidona; agentes desintegrantes, e.g. amido, ácido algínico, alginatos ou glicolato de amido sódico; misturas efervescentes; pigmentos; edulcorantes; agentes molhantes, tais como lecitina, polissorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias não tóxicas e farmacologicamente inactivas utilizadas em formulações farmacêuticas. Estas preparações farmacêuticas podem ser fabricadas do modo conhecido, por exemplo, através de processos de mistura, granulação, compressão, revestimento com açúcar ou revestimento com película.

Dispersões líquidas para administração oral podem ser xaropes, emulsões ou suspensões. Os xaropes podem conter como transportadores, por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manitol e/ou sorbitol.

Suspensões e emulsões podem conter como transportador, por exemplo uma goma natural, ágar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou poli(álcool vinílico). As suspensões ou soluções para injecções intramusculares podem conter, em conjunto com ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato, um transportador farmaceuticamente aceitável, e.g. água estéril, azeite, oleato

de etilo, glicóis, e.g. propilenoglicol e, se desejado, uma quantidade adequada de cloridrato de lidocaína.

Medicamentos do invento podem compreender ornitina como o único componente de aminoácido. Medicamentos do invento podem compreender ornitina e isoleucina como os únicos componentes de aminoácido. O medicamento pode consistir essencialmente de ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato. O medicamento pode consistir essencialmente de ornitina, isoleucina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato.

O medicamento pode consistir essencialmente de ornitina, fenilacetato e/ou fenilbutirato e um transportador farmaceuticamente aceitável. Um tal medicamento não contém por isso substancialmente qualquer outro aminoácido para além de ornitina. O medicamento pode consistir essencialmente de ornitina, isoleucina, fenilacetato e/ou fenilbutirato e um transportador farmaceuticamente aceitável. Um tal medicamento não contém por isso substancialmente qualquer outro aminoácido para além ornitina e isoleucina.

O fenilacetato pode estar presente numa quantidade de 5 a 100%, por exemplo de 10 a 50%, ou 20 a 40%, em peso do peso de ornitina. O fenilbutirato pode estar presente numa quantidade de 5 a 100%, por exemplo de 10 a 50%, ou 20 a 40%, em peso do peso de ornitina.

Contudo, o medicamento pode compreender aspartato, glutamato ou arginina livres em forma não peptídica, tipicamente numa quantidade insubstancial. Geralmente, a quantidade em peso de aspartato, glutamato ou arginina não excede a quantidade em peso de ornitina. Por uma quantidade insubstancial, pretende-se significar que a quantidade em peso de aspartato, glutamato ou arginina, ou uma combinação destes aminoácidos, não excede 20% em peso de ornitina. Por conseguinte, o medicamento pode não compreender substancialmente qualquer aspartato. Numa concretização, a composição não compreende aspartato, glutamato ou arginina. Podem estar presentes na composição quantidades vestigiárias de aspartato, glutamato ou arginina. Por quantidade vestigiária, pretende-se significar que a quantidade em peso de aspartato, glutamato ou arginina, ou uma combinação destes aminoácidos, não excede 1% em peso de ornitina. Preferivelmente, a quantidade em peso de aspartato, glutamato ou arginina não excede 0,5% em peso de ornitina.

Noutra concretização, a composição pode compreender ainda outros aminoácidos em forma não peptídica, tipicamente como o aminoácido livre ou um seu sal fisiologicamente aceitável em forma livre. A quantidade destes outros aminoácidos não excede geralmente a quantidade em peso de ornitina. Por exemplo, os outros aminoácidos podem estar presentes numa quantidade em peso até 20%, por exemplo de 5 a 20%, do peso de ornitina. Estes outros aminoácidos que podem estar presentes na composição incluem aminoácidos essenciais e não essenciais. A composição pode compreender outros aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês "Branched cChain Amino Acid"). Os BCAA incluem isoleucina, valina e leucina. Assim, uma composição do invento pode compreender isoleucina e/ou valina e/ou leucina.

### **Tratamento**

Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato são administrados em combinação a um sujeito para prevenir ou retardar o surgimento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem assim ser administrados em combinação para melhorar a condição de um sujeito, por exemplo um sujeito padecendo de doença crónica do fígado após um evento precipitador. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para aliviar os sintomas de um sujeito, por exemplo os sintomas associados a doença crónica do fígado num sujeito após um evento precipitador. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para combater ou retardar o surgimento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação a um sujeito para tratamento de encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para melhorar a condição de um paciente padecendo de encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para aliviar os sintomas associados a encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para combater encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de

fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para prevenir um episódio de encefalopatia hepática inicial numa pessoa em risco de episódios de encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para atenuar a gravidade de um episódio de encefalopatia hepática inicial numa pessoa em risco de episódios de encefalopatia hepática. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação para retardar um episódio de encefalopatia hepática inicial numa pessoa em risco de episódios de encefalopatia hepática.

O desenvolvimento de descompensação do fígado e encefalopatia hepática envolve "eventos precipitadores" (ou "ataques agudos"). Estes eventos precipitadores incluem hemorragia gastrointestinal, infecção (sepsia), trombose da veia portal e desidratação. O início de um tal ataque agudo conduzirá provavelmente a hospitalização. O paciente pode padecer de um destes ataques agudos ou de uma combinação destes ataques agudos.

Um sujeito que teve ou é suspeito de ter tido um ataque agudo é tratado de acordo com o invento com ornitina e fenilacetato e/ou fenilbutirato em combinação para prevenir a progressão do fígado para o estado descompensado. O invento pode por isso prevenir as consequências médicas de descompensação do fígado tais como encefalopatia hepática. A ornitina e fenilacetato e/ou fenilbutirato podem ser utilizados para preservar a função do fígado. A utilização de ornitina e fenilacetato e/ou fenilbutirato pode assim prolongar a vida de um paciente com doença do fígado. Numa concretização, são prevenidas as consequências metabólicas de uma hemorragia gastrointestinal tais como hiperamonemia, hipoisoleucemias e síntese de proteína reduzida no período pós-hemorragia.

Tipicamente, o tratamento de sujeitos pode começar logo que possível após o surgimento ou suspeita de surgimento de um evento precipitador (ataque agudo). Preferivelmente, o tratamento do sujeito começa antes de ataques agudos repetidos. Mais preferivelmente, o tratamento do sujeito começa após o primeiro ataque agudo.

O tratamento é tipicamente dado prontamente após o início de um ataque agudo. O tratamento pode começar após terem sido

detectados o(s) sintoma(s) de um ataque agudo ou suspeitos de ataque agudo e.g. por um profissional de saúde tal como um médico, um paramédico ou um enfermeiro. O tratamento pode começar com a hospitalização do sujeito. O tratamento pode assim começar em 6 horas, em 3 horas, em 2 horas ou em 1 hora após terem sido detectados o(s) sintoma(s) de um ataque agudo ou suspeitos de ataque agudo. O tratamento do sujeito pode por isso começar de 1 a 48 horas, por exemplo de 1 a 36 horas ou de 1 a 24 horas após terem sido detectados o(s) sintoma(s) de um ataque agudo ou suspeitos de ataque agudo.

O tratamento pode ocorrer durante até 8 semanas, por exemplo até 6 semanas, até 4 semanas ou até 2 semanas após terem sido detectados o(s) sintoma(s) de um ataque agudo ou suspeitos de ataque agudo. O tratamento pode por isso ocorrer durante até 48 horas, por exemplo durante até 36 horas ou durante até 24 horas após terem sido detectados o(s) sintoma(s) de um ataque agudo ou suspeitos de ataque agudo. Tipicamente, o tratamento decorre até ao momento em que a recuperação do evento precipitador agudo é evidente.

O sujeito é tratado com a ornitina e o fenilacetato e/ou fenilbutirato. Ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato podem ser administrados em combinação num único medicamento, ou separadamente em dois ou três medicamentos diferentes. Quando se pretende que ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato sejam administrados num medicamento combinado, a combinação pode ser preparada imediatamente antes da administração, ou pode ser armazenada como um medicamento combinado.

Quando se pretende que a ornitina e o fenilacetato e/ou fenilbutirato sejam administrados separadamente, os medicamentos podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente durante um período de tempo. Podem ser administrados dois ou três medicamentos separados durante um período de tempo.

Quando são administrados dois medicamentos, a ornitina pode ser administrada em primeiro lugar, seguida pela administração do fenilacetato e fenilbutirato, o fenilacetato ou o fenilbutirato. Alternativamente, o fenilacetato e fenilbutirato, o fenilacetato ou o fenilbutirato podem ser administrados em primeiro lugar, seguidos pela ornitina. Noutra concretização, uma combinação de ornitina e

fenilacetato pode ser administrada em primeiro lugar, seguida pela administração de fenilbutirato. Alternativamente, uma combinação de ornitina e fenilbutirato pode ser administrada em primeiro lugar, seguida por administração de fenilacetato. Noutra concretização, o fenilacetato pode ser administrado em primeiro lugar, seguido pela administração de uma combinação de ornitina e fenilbutirato. Alternativamente, o fenilbutirato pode ser administrado em primeiro lugar, seguido por administração de uma combinação de ornitina e fenilacetato.

Quando são administrados três medicamentos, ornitina, fenilacetato e fenilbutirato são administrados em momentos separados. A ornitina pode ser administrada em primeiro lugar, segundo ou terceiro. Quando a ornitina é administrada em primeiro lugar, fenilacetato ou fenilbutirato podem ser administrados em segundo lugar, seguidos por administração de fenilbutirato ou fenilacetato. Quando a ornitina é administrada em segundo lugar, fenilacetato ou fenilbutirato são administrados em primeiro lugar, e fenilbutirato ou fenilacetato são administrados em terceiro lugar. Quando a ornitina é administrada em terceiro lugar, fenilacetato ou fenilbutirato são administrados em primeiro lugar, e fenilbutirato ou fenilacetato são administrados em segundo lugar.

O segundo medicamento pode ser administrado até 5 horas, tal como até 2 horas ou até 1 hora, após administração do primeiro medicamento. O segundo medicamento pode assim ser administrado de 15 minutos a 5 horas, por exemplo de 30 minutos a 4 horas ou de 1 hora a 3 horas, após administração do primeiro medicamento.

O terceiro medicamento pode ser administrado até 5 horas, tal como até 2 horas ou até 1 hora, após administração do segundo medicamento. O terceiro medicamento pode assim ser administrado de 15 minutos a 5 horas, por exemplo de 30 minutos a 4 horas ou de 1 hora a 3 horas, após administração do segundo medicamento.

Os medicamentos do invento podem ser administrados no mesmo local ou em locais diferentes. Os medicamentos do invento podem ser administrados através da mesma via ou por vias diferentes. Um medicamento do invento pode ser administrado por qualquer via adequada. Preferivelmente é administrado pelas vias oral, intravenosa, intragástrica,

intraperitoneal ou intravascular. Por exemplo, quando ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato são administrados separadamente, estes podem ser todos administrados oralmente ou estes podem ser todos administrados intravenosamente ou a ornitina pode ser administrada oralmente e o fenilacetato e/ou fenilbutirato podem ser administrados intravenosamente, ou o fenilacetato e/ou fenilbutirato podem ser administrados oralmente e a ornitina pode ser administrada intravenosamente.

São administradas ao sujeito quantidades terapeuticamente eficazes de ornitina, do fenilacetato e/ou fenilbutirato e da isoleucina opcional. As doses da ornitina, do fenilacetato e/ou fenilbutirato e da isoleucina podem ser determinadas de acordo com vários parâmetros tais como a idade, peso e condição do sujeito a ser tratado; o tipo e gravidade da doença do fígado; a via de administração; e o regime requerido.

Uma dose típica de ornitina, de fenilacetato ou fenilbutirato, ou de isoleucina é de 0,02 a 1,25, por exemplo de 0,1 a 0,5 g por kg de peso corporal, dependendo destes parâmetros. Consequentemente, uma dosagem de ornitina, de fenilacetato ou fenilbutirato, ou de isoleucina pode ser de 1 g a 50 g tal como de 5 g a 30 g. A dosagem de ornitina pode ser de 10 a 30 g. A dose de isoleucina pode ser 5 a 15 g. A ornitina e fenilacetato/fenilbutirato podem ser administrados numa proporção em peso de 10:1 a 1:10 tal como de 5:1 a 1:5 ou de 2:1 a 1:2 ou cerca de 1:1. Um médico será capaz de determinar a dosagem requerida de ornitina e de fenilacetato ou fenilbutirato e da isoleucina opcional para qualquer sujeito particular.

Podem ser administradas uma dose única de ornitina e uma dose única de fenilacetato e/ou fenilbutirato. Opcionalmente, pode também ser administrada uma dose única de isoleucina. Alternativamente, podem ser administradas múltiplas doses, por exemplo duas, três, quatro ou cinco doses, de ornitina e/ou do fenilacetato e/ou fenilbutirato e/ou da isoleucina opcional. Estas múltiplas doses podem ser administradas durante um período de um mês ou duas semanas ou uma semana. Noutra concretização, podem ser administradas diariamente uma única dose ou múltiplas doses tais como duas, três, quatro ou cinco doses de ornitina e/ou de fenilacetato e/ou fenilbutirato.

Podem ser administrados outros aminoácidos a um sujeito como acima observado. O outro ou cada um dos outros aminoácidos podem ser administrados no mesmo medicamento que a ornitina e/ou o fenilacetato e/ou fenilbutirato, ou podem ser administrados separadamente. Quando administrados separadamente, o outro ou cada um dos outros aminoácidos podem ser dados simultaneamente com, ou num momento diferente tal como até 5 horas, até 2 horas ou até 1 hora antes ou após, a administração de ornitina e/ou fenilacetato e/ou fenilbutirato. O outro ou cada um dos outros aminoácidos é tipicamente administrado oralmente ou intravenosamente.

É administrada ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz do outro ou de cada um dos outros aminoácidos. A dose dependerá de vários parâmetros tais como os acima observados para ornitina, fenilacetato e fenilbutirato. Uma dose típica do outro ou de cada um dos outros aminoácidos é de 0,02 a 1,25, por exemplo de 0,1 a 0,5 g por kg de peso corporal. Uma dosagem do outro ou de cada um dos outros aminoácidos pode pois ser de 1 g a 50 g tal como 5 g a 30 g.

Pode ser administrada uma única dose do outro ou de cada um dos outros aminoácidos. Alternativamente, podem ser administradas múltiplas doses, por exemplo duas, três, quatro ou cinco doses. Estas múltiplas doses podem ser administradas durante um período de um mês ou duas semanas ou uma semana. Noutra concretização, podem ser administradas diariamente uma única dose ou múltiplas doses tais como duas, três, quatro ou cinco doses.

Os Exemplos seguintes ilustram invento.

**Exemplo 1: A função dos neutrófilos está alterada em pacientes com cirrose e agrava-se com a gravidade crescente da doença do fígado**

**Métodos para medição de fagocitose dos neutrófilos e explosão oxidativa ("oxidative burst")**

*Phagotest:* Incubou-se sangue completo heparinizado com *E. coli* marcada com FITC opsonizada e CD16. Analisaram-se depois as células por citometria de fluxo (FACScan Becton Dickinson), balizadas através de difusão frontal e lateral e avaliaram-se subsequentemente com base na expressão do

fluorócromo R-ficoeritrina (PE) [Immunotech, Marselha, França] para identificar células CD16 positivas. A população balizada foi depois avaliada quanto à presença de bactérias marcadas com FITC.

*Phagoburst:* Incubou-se sangue completo heparinizado com suspensão de *E. coli* opsonizado para estimular a explosão oxidativa. Adicionou-se uma solução de substrato para determinar a conversão de di-hidro-rodamina (DHR) 123 no composto fluorogénico rodamina (R) 123. Parou-se a reacção e fixou-se antes da incubação com anticorpo CD16 para identificação dos neutrófilos positivos. Realizou-se depois a análise por citometria de fluxo.

*Quimiotaxia dos neutrófilos:* Mediu-se a quimiotaxia dos neutrófilos utilizando um método de câmara de Boyden modificado utilizando interleucina-8 como quimioattractante para estimular a quimiocinese.

### **Pacientes e métodos**

Estudámos 30 pacientes com cirrose (cirrose alcoólica; idade média 53,2 (EPM 4,6) e 20 voluntários saudáveis. Classificaram-se os pacientes com cirrose como aqueles com hepatite alcoólica sobreposta (AH+) e aqueles com fígados descompensados ou compensados. Utilizou-se o Phagotest para determinar a capacidade fagocítica e utilizou-se o Phagoburst para determinar se as células eram ou não capazes de gerar explosão oxidativa quando expostas a *E. coli*.

### **Resultados**

Observámos que os neutrófilos de pacientes cirróticos tinham uma capacidade significativamente reduzida para fagocitose de bactérias. Constatámos também que pacientes com cirrose tinham uma capacidade reduzida para responder a estimulação dos neutrófilos por *E. coli* em termos de aumentar a velocidade de geração de explosão oxidativa (Figura 1). Esta redução em capacidade estava correlacionada com a gravidade da doença de fígado indicando que quanto mais avançado o estado da doença de fígado, menor a capacidade para responder e lidar com a infecção.

**Exemplo 2: A amónia reduz a capacidade fagocítica em neutrófilos****Métodos para medição de fagocitose dos neutrófilos e explosão oxidativa**

Como no Exemplo 1.

**Pacientes e métodos**

Colheu-se sangue a partir de voluntários saudáveis (n=15) e incubou-se durante 1 hora com concentrações crescentes de amónia. Mediu-se a capacidade dos neutrófilos para fagocitose de bactérias utilizando os ensaios *Phagotest* e de quimiotaxia dos neutrófilos. Utilizou-se IL-8 10 ng/ml no ensaio de quimiotaxia dos neutrófilos.

**Resultados**

Com incubação de concentrações crescentes de amónia, verificou-se uma redução significativa na fagocitose dos neutrófilos (Figura 2) e também na quimiotaxia dos neutrófilos (Figura 3).

**Exemplo 3: O efeito de amónia na fagocitose dos neutrófilos pode ser revertido por intervenções****Métodos para medição de fagocitose dos neutrófilos e explosão oxidativa**

Como no Exemplo 1.

**Pacientes e métodos**

Colheu-se sangue a partir de voluntários saudáveis (n=15) e incubou-se durante 1 hora com amónia e aminoácidos seleccionados. Mediu-se a capacidade dos neutrófilos para fagocitose de bactérias utilizando o ensaio *Phagotest*.

**Resultados**

Observámos que a redução induzida por amónia na fagocitose dos neutrófilos podia ser parcialmente revertida por ornitina e glutamina (Figura 4). No entanto, a fagocitose de neutrófilos foi pior por co-incubação de amónia com

aspartato, mas permaneceu inalterada com L-ornitina-L-aspartato.

**Exemplo 4: Uma hemorragia gastrointestinal simulada reduz a quimiotaxia dos neutrófilos que pode ser parcialmente revertida por administração de isoleucina**

**Métodos**

Estudaram-se dez pacientes metabolicamente estáveis, em jejum de um dia para o outro, com cirrose do fígado comprovada por biopsia [9 masculinos e 1 feminino; média 49,6 anos (EPM 9,1); pontuação Child-Pugh média de 7,8 (EPM 1,2)] antes e duas horas após uma administração oral de 75 gramas de uma mistura de aminoácidos que mimetiza a molécula de hemoglobina (Nutricia, Cuijk, Países-Baixos). Em sete outros pacientes [4 masculinos e 3 femininos; média 51,4 anos (EPM 6,7); pontuação Child-Pugh média de 8,1 (EPM 1,4)], após administração da mistura de aminoácidos, administrhou-se intravenosamente isoleucina durante um período de 2 horas (solução iso-osmótica contendo 40 mg/l de isoleucina a um caudal de 100 ml/h). Mediram-se a quimiotaxia dos neutrófilos (ver Exemplo 1 para o método) e a amónia no plasma em amostras de sangue venoso periférico.

**Resultados**

A quimiotaxia dos neutrófilos foi significativamente inferior nestes pacientes cirróticos em comparação com controlos da mesma idade (53,3 EPM 4,6) e foi significativamente reduzida após hemorragia simulada de 31 ( $\pm 4,2$ ) para 8 ( $\pm 5,4$ ) células/campo de alta energia ( $p<0,0001$ ) (Figura 5). A concentração de amónia no plasma aumentou significativamente de 75,1 ( $\pm 4,2$ ) para 124 ( $\pm 8,5$ ) ( $p<0,001$ ). A alteração na concentração de amónia correlacionou-se com a alteração na quimiotaxia dos neutrófilos ( $r=0,65$  e  $p<0,05$ ). A redução na quimiotaxia dos neutrófilos observada com a hemorragia simulada foi anulada no grupo de pacientes tratados com isoleucina 25,4 ( $\pm 6,0$ ) células/campo de alta energia.

**Exemplo 5: A hemorragia simulada reduz síntese de proteína e estimula inapropriadamente a oxidação de isoleucina**

**Métodos**

Recrutaram-se cinco pacientes com cirrose do fígado em jejum de um dia para o outro. Colheram-se uma amostra de sangue e uma amostra de ar expirado antes do início da perfusão dos isótopos estáveis para a medição do enriquecimento isotópico de fundo. Depois, os pacientes receberam uma perfusão intravenosa contínua antecedida de bolus ("primed") de [ $l-^{13}C$ ]-isoleucina (1 mg/kg de peso corporal/h) até ao final da experiência ( $t=480$  min).

**Resultados**

A Figura 6 mostra a velocidade média de aparecimento de isoleucina no corpo inteiro ( $W_b$  Ra) e de oxidação de isoleucina durante a última hora de perfusão de solução salina (barras a negro) e de aminoácido (barras a cinzento) (valores em média  $\pm$  EPM; # representa  $p < 0,05$ ). Uma hemorragia GI superior em pacientes com cirrose resultou numa redução em isoleucina e diminuiu acentuadamente a síntese de proteína no corpo inteiro. A fração de fluxo de isoleucina utilizada para oxidação não se alterou após a hemorragia simulada apesar da redução acentuada na concentração de isoleucina, apontando para a ocorrência de antagonismo de BCAA.

**Exemplo 6: A administração de isoleucina durante uma hemorragia simulada melhora a síntese de proteína mas não reduz a concentração de amónia**

**Métodos**

Estudaram-se dezasseis pacientes metabolicamente estáveis com cirrose do fígado comprovada por biopsia. Os pacientes foram randomizados para suplementação quer com isoleucina (solução de 40 mg/L; 50 ml/h) quer com placebo durante uma hemorragia simulada durante um período de 4 horas. Síntese de proteína (medida utilizando perfusão contínua antecedida de bolus ("primed") de L-[anel- $^2H_5$ ]fenilalanina), L-[anel- $^2H_4$ ]tirosina e L-[anel- $^2H_2$ ]tirosina e amónia.

## Resultados

Os resultados mostraram que a perfusão de isoleucina durante uma hemorragia simulada em pacientes com cirrose do fígado restaura a síntese comprometida de proteína de fígado e músculo conduzindo a um estado anabólico líquido nestes órgãos (Tabela 1). A concentração de amónia aumentou significativamente em ambos os grupos mas não foi significativamente diferente entre os pacientes a que se administrou isoleucina ou placebo (Figura 7).

### Exemplo 7: Acumulação de aspartato após perfusão de L-ornitina-L-aspartato em pacientes com cirrose avançada

#### Métodos

Submeteram-se 5 pacientes com cirrose avançada que estavam a aguardar transplante de fígado (idade: 59; 3 do sexo masculino, doença Classe C Child, ascite grave, creatinina 102  $\mu\text{mol/L}$ ) a tratamento com 40 g/dia de L-ornitina-L-aspartato.

#### Resultados

Durante um período de 3 dias verificou-se um aumento significativo e progressivo na concentração de aspartato aumentando até 5 vezes o valor basal (Tabela 2).

**Tabela 2**

	<b>PRE</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
ASPARTATO ( $\mu\text{mol/L}$ )	72 (11,8)	178 (23,2)	289 (27,1)	354 (31,1)

**Tabela 1**

**Cinética da proteína determinada utilizando o modelo Phe para t=0 horas e no final do estudo**

	Tempo	Síntese de P proteína	Quebra de P proteína	Saldo P líquido	P
Fígado SB-sol. salina	0	415±120	263±50	152±76	
	Final	274±250	0,445 108±162	0,366 166±231	0,836
SB-isoleucina	0	218±37	109±25	98±33	
	Final	839±221	0,038 157±204	0,412 682±165	0,010
Perna	SB-sol. salina	0	117±52	137±51	-20±19
	Final	372±211	0,189 288±175	0,232 87±140	0,694
SB-isoleucina	0	-31±201	196±61	-185±152	
	Final	377±135	0,209 159±100	0,535 261±102	0,005

Os dados são a média ± EPM em nmol/kg de massa de células corporais/min. Os valores finais representam os valores médios da hora final da perfusão de aminoácido. Os dados de síntese de proteína de fígado e rim estão corrigidos quanto à hidroxilação (ver métodos). Estatística: valores de p para o teste U de Mann-Whitney para diferenças dentro dos grupos; não se verificaram quaisquer diferenças significativas entre grupos.

**Exemplo 8: A administração com LOLA reduz a concentração de amónia mas permite à amónia regenerar-se**

**Pacientes e métodos**

Trataram-se oito pacientes com cirrose (idade 56 (5,6), 5M, ALD-6; EH Grau 2: 4; EH Grau 3-4: 4) com uma perfusão de LOLA (40 g durante 8 horas). Colheu-se sangue para medição de amónia e glutamina.

**Resultados**

Os resultados mostraram que a administração de LOLA resultou numa redução significativa na concentração de amónia com uma elevação concomitante na concentração de glutamina (Figura 8). Esta redução em amónia teve efeitos benéficos na gravidade de EH. Contudo, quando se parou com LOLA, verificou-se um aumento de recuperação nos níveis de amónia na circulação, resultando em recorrência de EH em 3 dos 6 pacientes que tinham melhorado.

**Exemplo 9: A remoção activa de glutamina previne a elevação secundária na concentração de amónia**

**Pacientes e métodos**

Trataram-se 3 pacientes (idade 45 (4,1) 2M, ALD, todos EH grau 3, HRS todos os 3) que estavam a ser submetidos a hemofiltração (CVVH) com uma perfusão de LOLA (40 g durante 8 horas). Colheu-se sangue para medição de amónia e glutamina.

**Resultados**

Os resultados mostraram que LOLA resultou numa redução da concentração de amónia mas a adição de diálise previniu o aumento concomitante da concentração de glutamina (Figura 9). Por isso, pensamos que existiu uma redução sustentada na concentração de amónia.

**Exemplo 10: O fenilacetato liga-se a glutamina para constituir um composto excretável e previne a elevação secundária de amónia**

**Pacientes e métodos**

Trataram-se 6 pacientes com insuficiência hepática aguda (5 hepatite não A não B) e encefalopatia grave (Grau 3-4) com LOLA e fenilacetato (40 g/dia durante 8 horas).

**Resultados**

Não se verificou qualquer aumento significativo na concentração de glutamina e os níveis de amónia foram reduzidos com o tratamento combinado (Figura 10). Não se observou qualquer aumento de amónia de recuperação.

**Exemplo 11: O efeito de ornitina e fenilbutirato em pacientes humanos com encefalopatia hepática**

**Pacientes**

1. Grupos - 3 pacientes por grupo. Total 12.
2. Critérios de inclusão
  - Pacientes adultos com 18-80 anos de idade, cirrose do fígado documentada por histologia ou critérios clínicos,

EH tipo C, concentração de amónia >80 µmol/L, consentimento informado/concordância.

### 3. Critérios de exclusão

- outra perturbação neurológica concomitante, utilização de outro fármaco específico de redução de amónia, insuficiência respiratória requerendo ventilação mecânica e sedação, hemorragia gastrointestinal não controlada, hipotensão requerendo inotrópicos, insuficiência renal evidente (creatinina >2 mg/dl), hemodiálise, suporte hepático extracorporeal, hipersensibilidade conhecida a qualquer dos fármacos de estudo, gravidez.

### **Avaliação do estado mental**

Classificação da encefalopatia hepática (Critérios West-Haven)

Grau 0 (EH mínima)	estado mental normal (uma ou mais anormalidades quantificáveis nos testes psicométricos)
Grau 1	falta trivial de consciência euforia ou ansiedade tempo de atenção reduzido desempenho de adição prejudicado
Grau 2	letargia ou apatia desorientação mínima em tempo ou espaço alteração subtil da personalidade comportamento inapropriado desempenho de subtração prejudicado
Grau 3	sonolência até semi-estupor, mas responsivo a estímulos verbais confusão desorientação flagrante
Grau 4	coma (não responsivo a estímulos verbal ou nocivos)

### **Métodos**

Num estudo aberto, incluímos 8 pacientes com cirrose e hiperammonemia. Estes foram classificados quanto à gravidade da doença do fígado (ver Tabela 3). Trataram-se com um dos

regimes seguintes durante um período de 3 dias e efectuaram-se observações durante 5 dias. Os grupos de estudo foram:

- (i) Placebo: Dextrose a 5% durante 4 horas;
- (ii) Ornitina sozinha: 20 g em 500 ml, dextrose a 5% entre 0800 e 1200;
- (iii) Fenilbutirato: 10 g duas vezes ao dia, oralmente (0800 e 1600); e
- (iv) Ornitina + Fenilbutirato: 20 g em 500 ml, dextrose a 5% entre 0800 e 1200 + 10 g duas vezes ao dia, oralmente (0800 e 1600).

Submeteram-se os pacientes a jejum de um dia para o outro entre a meia-noite 0000 e as 0800 am. Alimentaram-se intragasticamente com uma dieta de 25 kcal/kg que incluiu 1 g/kg de dieta de proteína com início às 0800 e terminando à meia-noite. Colheu-se sangue às 0730 am e depois às 1800 h para a medição de amónia e glutamina. Monitorizaram-se os pacientes minuciosamente quanto a efeitos secundários. O fármaco foi bem tolerado em cada um dos grupos e não se observaram quaisquer eventos adversos.

**Tabela 3.** Dados demográficos dos pacientes

	Placebo	Ornitina sozinha	Fenilbutirato sozinho	OP
Idade	P1: 47 P2: 57	P3: 46 P4: 40	P5: 56 P6: 48	P7: 52 P8: 52
Sexo	P1: M P2: M	P3: F P4: F	P5: F P6: M	P7: M P8: F
Etiologia da doença de fígado	P1: HCV P2: HBV	P3: HBV P4: NASH	P5: NASH P6: HBV	P7: HBV P8: HBV
Gravidade da doença de fígado (Pontuação de Pugh)	P1: 9 P2: 12	P3: 13 P4: 13	P5: 14 P6: 13	P7: 14 P8: 12
Factor precipitador	P1: Infecção P2: Infecção	P3: SBP P4: Infecção	P5: SBP P6: Infecção	P7: SBP P8: Infecção
Gravidade de EH (critérios West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 3 P4: 3	P5: 3 P6: 3	P7: 3 P8: 3
Gravidade de EH (pontuação de coma Glasgow)	P1: 9 P2: 8	P3: 8 P4: 8	P5: 9 P6: 10	P7: 9 P8: 9

Insuficiência de outros órgãos	P1: nenhuma P2: hipotensão	P3: pré-renal, hipotensão P4: hipotensão	P5: nenhuma P6: pré-renal	P7: nenhuma P8: nenhuma
Morto (D) /Vivo (A)	P1: A P2: A	P3: D P4: A	P5: A P6: A	P7: A P8: A
Complicações	P1: infecção, SBP P2: infecção, hemorragia varicosa	P3: HRS P4: infecção rec.	P5: sepsia, ICU P6: SBP recorrente	P7: nenhuma P8: hemorragia, dia 14
SBP: peritonite bacteriana espontânea, esteato-hepatite não alcoólica, ICU: Necessário apoio de cuidados intensivos, HRS: Síndrome hepato-renal				

## Resultados

A Figura 11 mostra que os níveis médios de amónia permaneceram grandemente inalterados ao longo do período de tratamento no grupo de placebo. No grupo de L-ornitina e no grupo de fenilbutirato, a concentração de amónia aumentou em relação aos valores da linha de base. No grupo tratado com L-ornitina e fenilbutirato em conjunto, verificou-se uma redução substancial de amónia. O aumento pós-prandial em amónia foi reduzido nos animais tratados com OP para além da redução nas concentrações de amónia. Ambos os pacientes no grupo OP melhoraram a sua pontuação de encefalopatia em 2 graus ao dia 3, o que não foi observado em qualquer dos outros 6 pacientes.

A Figura 12 mostra que os níveis médios de glutamina permaneceram grandemente inalterados ao longo do período de tratamento no grupo OP apesar de uma redução na amónia. Verificou-se uma redução em glutamina no grupo de fenilbutirato, o que pode bem ser prejudicial. Nos grupos de L-ornitina e placebo verificou-se um aumento nas concentrações de glutamina que foi nitidamente acentuado no estado pós-prandial.

A Figura 13 mostra as alterações no estado mental nos grupos tratados com Placebo, O, P e OP.

**Exemplo 12: O efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina em pacientes humanos com encefalopatia hepática**

**Pacientes**

1. Grupos - 2 pacientes por grupo. Total 6

2. Critérios de inclusão

- Pacientes adultos com 18-80 anos, cirrose do fígado documentada por histologia ou critérios clínicos, B ou C Child, hemorragia gastrointestinal recente de varizes (<6 horas após apresentação), consentimento informado/concordância.

3. Critérios de exclusão

- outra perturbação neurológica concomitante, utilização de outro fármaco específico de redução de amónia, insuficiência respiratória requerendo ventilação mecânica e sedação, hemorragia gastrointestinal não controlada, hipotensão requerendo inotrópicos, insuficiência renal evidente (creatinina >2 mg/dl), hemodiálise, suporte hepático extracorporeal, hipersensibilidade conhecida a qualquer dos fármacos de estudo, gravidez/lactação.

**Métodos**

Num estudo aberto, incluímos 6 pacientes com cirrose e que foram admitidos para gestão de hemorragia varicosa. Estes foram classificados quanto à gravidade da doença do fígado (ver Tabela 4). Trataram-se com um dos regimes seguintes durante um período de 3 dias e efectuaram-se observações durante 5 dias. Os grupos de estudo foram:

- i. Placebo: Dextrose a 5% durante 4 horas (250 ml)
- ii. Isoleucina sozinha: 10 g IV em 250 ml de dextrose a 5% durante 2 horas em duas doses divididas.
- iii. Isoleucina + Ornitina + Fenilbutirato: Isoleucina: 10 g IV em 250 ml de dextrose a 5% durante 2 horas em duas doses divididas; Ornitina: 20 g em 250 ml, dextrose a 5% (t=0; 24, 48 h); Fenilbutirato: 10 g duas vezes ao dia, oralmente (t=0, 12, 24, 36, 48 h).

Submeteram-se os pacientes a jejum de um dia para o outro entre a meia-noite 0000 e as 0800 am. Alimentaram-se intragasticamente com uma dieta de 25 kcal/kg que incluiu 1 g/kg de dieta de proteína com início às 0800 e terminando à meia-noite. Colheu-se sangue às 0730 am e depois às 1800 h para a medição de amónia e glutamina. Monitorizaram-se os pacientes minuciosamente quanto a efeitos secundários. O fármaco foi bem tolerado em cada um dos grupos e não se observaram quaisquer eventos adversos. Porque os pacientes receberam sedação para a sua endoscopia inicial, a avaliação do estado mental foi impossível de interpretar. Um paciente em cada um dos grupos de placebo e isoleucina morreu de insuficiência de múltiplos órgãos no hospital. O resto dos pacientes sobreviveu.

**Tabela 4**

	Placebo	Isoleucina sozinha	OIP
Idade	P1: 43 P2: 62	P3: 57 P4: 42	P5: 43 P6: 45
Sexo	P1: M P2: M	P3: F P4: M	P5: M P6: M
Etiologia da doença de fígado	P1: ALD P2: HCV	P3: HBV P4: ALD	P5: HBV P6: NASH
Gravidade da doença de fígado (Pontuação de Pugh)	P1: 13 P2: 14	P3: 13 P4: 11	P5: 14 P6: 10
Gravidade de EH (critérios West-Haven)	P1: 2 P2: 3	P3: 2 P4: 1	P5: 2 P6: 2
Perda de sangue estimada (u)	P1: 9 P2: 10	P3: 7 P4: 8	P5: 7 P6: 10
Morto (D)/Vivo (A)	P1: D P2: A	P3: A P4: D	P5: A P6: A
Complicações	P1: infecção, re-hemorragia P2: encefalopatia grave	P3: HRS P4: infecção rec.	P5: infecção no peito P6: nenhuma
SBP: peritonite bacteriana espontânea, esteato-hepatite não alcoólica, ICU: Necessário apoio de cuidados intensivos, HRS: Síndrome hepato-renal			

## Resultados

A Figura 14 mostra que não ocorreram quaisquer alterações significativas nas concentrações de amónia nos grupos de placebo e de isoleucina. No grupo tratado com OIP,

verificou-se uma redução substancial na concentração de amónia.

A Figura 15 mostra que os níveis de glutamina não são significativamente alterados por administração de qualquer um de isoleucina, placebo ou OIP. Apenas no grupo OIP a amónia foi reduzida substancialmente.

A Figura 16 mostra que uma alternativa pela qual OIP podem actuar é através de uma redução no aminoácido amoniagénico, glicina. Uma redução substancial em glicina é observada apenas no grupo OIP.

A Figura 17 mostra que os níveis de isoleucina são muito baixos de início em cada um dos grupos mas aumentam até ao dobro dos valores normais nos grupos tratados com isoleucina. A concentração no grupo de placebo permanece baixa e inalterada.

A Figura 18 mostra as alterações nos níveis de ornitina nos pacientes durante o curso de tratamento mostrando um aumento sustentado nítido nas concentrações de ornitina que são significativamente reduzidas até aos valores basais ao parar com o fármaco indicando absorção nos diferentes tecidos.

#### **Exemplo 13: O efeito de ornitina e fenilbutirato no rato de ducto biliar laqueado**

##### **Métodos**

###### **Indução de cirrose por laqueação do ducto biliar (BDL)**

Utilizaram-se ratos Sprague-Dawley machos (200-250 g) para este procedimento. Após anestesia, realizou-se uma laparotomia de linha média, expôs-se o ducto biliar, laqueou-se triplamente com sutura de seda 4.0, e cortou-se entre a segunda e terceira laqueação. Fechou-se a ferida em camadas com sutura absorvível, e deixou-se o animal recuperar numa sala em silêncio antes de se devolver à instalação de alojamento de animais. Mantiveram-se os animais a uma temperatura constante (20°C) num ciclo de 12 horas de luz/escuridão com acesso a água e ração padrão para roedores *ad libitum*.

Após cinco semanas pós-BDL (ou procedimento simulado) mudaram-se os animais da ração para roedores para uma dieta líquida completa (Liquidiet, Bio-Serv, Frenchtown NJ, E.U.A.) à qual se adicionou uma mistura de aminoácidos mimetizando a composição de hemoglobina (2,8 g/kg/dia, Nutricia Cuijk, Países-Baixos, Produto N.º 24143). Às seis semanas, sob anestesia, inseriu-se um cateter arterial na carótida direita e utilizou-se para colher amostras de sangue repetidas. Seguindo este procedimento colheu-se uma amostra de linha de base antes da administração das formulações de estudo por injecção IP. Os grupos de estudo foram: controlo de BDL + solução salina (n=5), BDL + ornitina (0,22 g/kg, n=6) em solução salina IP, BDL + fenilbutirato (0,3 g/kg, n=7) em solução salina IP, BDL + OP (0,22 g/kg / 0,3 g/kg, n=7) em solução salina IP.

Colheram-se amostras de sangue para tubos heparinizados pré-arrefecidos e armazenaram-se em gelo antes do processamento. Colheu-se o plasma após centrifugação (3000 rpm, 10 min) e armazenou-se a -80°C antes das análises.

Mediram-se amónia, glucose, lactato e ureia utilizando um COBAS Mira S de acordo com as instruções do fabricante. Quantificaram-se os aminoácidos por HPLC com detecção de fluorescência.

## Resultados

No modelo de rato cirrótico de ducto biliar laqueado verifica-se um aumento substancial no nível de amónia no plasma arterial ( $205 \pm 11 \mu\text{mol/L}$ , média  $\pm$  EPM) em comparação com controlos saudáveis ( $25,6 \pm 2 \mu\text{mol/L}$ ,  $p<0,001$ , dados não mostrados). Neste modelo, constatámos que não existiu qualquer alteração nos níveis de amónia arterial durante três horas no grupo de placebo tratado com solução salina.

A Figura 19 mostra a alteração nos níveis de amónia no plasma arterial em ratos cirróticos de BDL após injecções IP de solução salina (controlo BDL, n=5), ornitina (Orn, 0,22 g/kg, n=6), fenilbutirato (PB, 0,3 g/kg, n=7) e ornitina fenilbutirato (OP, 0,22 g/kg + 0,3 g/kg, n=7). \* significa  $p<0,05$  para OP vs. Orn às 3 horas (ANOVA de dois factores).

Esta figura mostra que, nos animais tratados com ornitina, foi detectada uma ligeira diminuição na concentração

de amónia, ainda que se constatasse que esta não era diferente do placebo. No grupo tratado com fenilbutirato verificou-se um aumento significativo da amónia no plasma após 1 hora ( $p<0,01$  vs. todos os outros grupos), ainda que se constatasse que esta diferença era mais pequena no ponto às três horas. Esta constatação coaduna-se com a hipótese de que fenilbutirato (fenilacetato) apenas é eficaz em sujeitos com concentrações de glutamina elevadas. Nos animais sem suplementação de ornitina, que pode ser metabolizada para formar glutamina, os efeitos de P sozinho são indesejáveis e são potencialmente nocivos. Observou-se um nível de amónia significativamente inferior no grupo tratado com ornitina mais fenilbutirato (OP). Nestes animais mediu-se uma diminuição sustentada de amónia ao longo das três horas de duração do estudo, cujos níveis se verificou serem significativamente menores do que os verificados no grupo tratado apenas com ornitina no final do estudo ( $p<0,05$ ).

Isto demonstra claramente que a combinação de OP tem maior eficácia na redução da amónia no plasma do que quer O quer P sozinhos. Adicionalmente, os níveis de amónia no plasma podem ser prejudiciais nos animais tratados com P sozinho.

Num subconjunto de amostras examinámos a absorção de ornitina pela corrente sanguínea após injecção IP de O ou OP. A Figura 20 mostra a concentração de ornitina arterial nos grupos suplementados. Pode-se observar claramente que em ambos os grupos a concentração de ornitina no plasma está nitidamente aumentada 1 hora após a injecção IP, que é subsequentemente reduzida às 3 horas à medida que esta ornitina é metabolizada no corpo. Não se constatou qualquer diferença significativa na concentração de ornitina no plasma entre estes grupos em qualquer intervalo de tempo.

Esta constatação é importante pois demonstra que o método de administração escolhido é eficaz para entregar a ornitina nestes animais. Para além disso, a rápida absorção e a diminuição observada dos níveis no plasma indicam que está a ocorrer o metabolismo activo deste aminoácido.

**Exemplo 14: O efeito de ornitina, fenilbutirato e isoleucina no rato de ducto biliar laqueado**

**Método**

Utilizaram-se ratos Sprague-Dawley machos (200-250 g) para este procedimento. Durante 48 h antes do sacrificio mudaram-se os animais da ração padrão para roedores para uma dieta líquida completa (Liquidiet, Bio-Serv, Frenchtown NJ, E.U.A.) à qual se adicionou uma mistura de aminoácidos mimetizando a composição de hemoglobina (2,8 g/kg/dia, Nutricia Cuijk, Países-Baixos, Produto N.º 24143). Induziu-se insuficiência hepática aguda (ALF) 24 horas antes do sacrificio por injeção IP de galactosamina (1 g/kg, Sigma, Poole, Reino Unido) em solução salina (n=5 em cada grupo). Três horas antes do sacrificio, trataram-se os animais quer com uma formulação de OIP (ornitina 0,22 g/kg, isoleucina 0,25 g/kg, fenilbutirato 0,3 g/kg, em solução salina IP) quer com solução salina de controlo. No final da experiência colheu-se sangue arterial experimental para tubos heparinizados pré-arrefecidos e armazenou-se em gelo até ao processamento. Colheu-se o plasma e armazenou-se como acima. Determinou-se a amónia como acima.

**Resultados**

Constatou-se que os níveis de amónia arterial foram significativamente reduzidos em ratos com insuficiência hepática aguda tratados com OIP em comparação com controlos de placebo (Fig. 21). Este estudo foi desenhado para testar se a isoleucina em combinação com ornitina e fenilbutirato (fenilacetato) seria capaz de diminuir eficazmente a amónia no plasma. Tinha sido previamente demonstrado que a isoleucina sozinha não afecta os níveis de amónia em estudos com humanos, ainda que a sua eficácia em combinação com O e P não tenha sido previamente testada.

A Figura 21 mostra os níveis de amónia no plasma arterial num modelo de insuficiência hepática aguda hiperamonémica para placebo de solução salina (ALF) e tratado com OIP (ALF + OIP). Determinou-se um nível de significância de  $p<0,01$  entre estes dois grupos (teste T).

Esta constatação suporta a hipótese de que a isoleucina em combinação com ornitina e fenilbutirato é eficaz na redução

dos níveis de amónia. Estes são adicionais aos efeitos benéficos da isoleucina anteriormente descritos para síntese de proteína.

### **Exemplo 15: O efeito de ornitina e fenilbutirato no modelo de porco desvascularizado**

#### **Métodos**

Cinco porcos foram randomizados em quatro grupos: insuficiência hepática aguda (ALF)+placebo+placebo (n=2); ALF+ornitina+placebo; ALF+fenilbutirato+placebo; ALF+ornitina e fenilbutirato. Os porcos tinham cateteres inseridos na artéria e veia femoral, veia portal, veia renal e artéria pulmonar. A experiência iniciou-se no tempo = -1 h, quando se iniciaram as perfusões de placebo ou tratamento.

1. Placebo: dextrose a 5% durante 3 horas, placebo de água oral
2. Ornитина sozinha: 0,3 g/kg, dextrose a 5% durante 3 horas de gotejamento intravascular
3. Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrose a 5% durante 3 horas de alimentação intragástrica

Ornитина + Fenilbutirato: 0,3 g/kg, dextrose a 5% durante 3 horas de gotejamento intravascular, 0,3 g/kg, dextrose a 5% durante 3 horas de alimentação intragástrica.

Induziu-se ALF por anastamose da veia portal para a veia cava inferior e ligação da artéria hepática subsequente (desvascularização) no tempo = 0 h; pararam-se as perfusões a t = +2 h e terminou-se a experiência a tempo = 8 h. Colheram-se amostras de sangue e de urina no tempos = 0, 1, 3, 5, 7 e 9 h para a medição de alterações regionais de amónia e de aminoácido. No final da experiência removeu-se uma secção de córtex frontal para medições de água no cérebro.

#### **Resultados**

Após perfusão de ornitina gerando glutamato intracelular e o fornecimento intragástrico de fenilacetato de conjugação os resultados sugerem profunda alteração nos níveis globais de amónia e na utilização de glutamina neste modelo catastrófico de insuficiência hepática.

Verifica-se um aumento consistente na concentração de amónia arterial com o tempo desde a desvascularização no animal tratado com placebo (Figura 22), com alguma produção no músculo (Figura 23) e uma grande quantidade de amónia proveniente do intestino (Figura 24). Este animal exibe uma modesta libertação de glutamina no músculo (Figura 25) e uma absorção apreciável de glutamina no intestino (Figura 26).

No caso do animal tratado com ornitina sozinha, a elevação inicial de amónia é contida inicialmente, mas eleva-se depois para ser a mais elevada no final da experiência (Figura 22). Verifica-se uma absorção líquida de amónia pelo músculo neste animal (Figura 24), com uma quantidade comparável de glutamina sendo libertada a partir do músculo - em comparação com o animal tratado com placebo (Figura 25) com uma absorção de glutamina aumentada no intestino (Figura 26).

O fenilbutirato sozinho exibe também uma contenção inicial dos níveis de amónia arterial, que rapidamente sobe para níveis comparáveis com os de ornitina sozinha no final da experiência (Figura 22) com pouca alteração na absorção de amónia no músculo (Figura 23), mas produção apreciável de amónia no intestino (Figura 24). Interessantemente, existe uma remoção líquida de glutamina pelo músculo com o tratamento de fenilbutirato sozinho (Figura 25) com pouco efeito evidente na absorção de glutamina no intestino, em comparação com o animal tratado com placebo (Figura 26).

A combinação de ornitina e fenilbutirato tem o impacto mais elevado nos níveis de amónia arterial com uma redução impressionante dos níveis na circulação no final da experiência em comparação com todos os outros animais (Figura 22). A amónia é activamente removida do sangue pelo músculo neste animal (Figura 23) com uma produção de amónia no intestino grandemente reduzida (Figura 24). É interessante notar que a libertação de glutamina no músculo é aumentada em comparação com ambos os animais tratados com placebo e ornitina sozinha (Figura 25). Apesar desta produção aumentada de glutamina no músculo, a absorção de glutamina no intestino é substancialmente reduzida (Figura 26).

Uma demonstração dos níveis aumentados de ornitina na circulação nos animais tratados com ornitina é apresentada na Figura 27.

O impacto das intervenções de desvascularização e tratamento na glutamina arterial é apresentado na Figura 28. Verifica-se um aumento no nível de glutamina na circulação no animal tratado com ornitina, que é melhorado pela co-administração de fenilacetato. Uma constatação interessante foi a melhoria substancial dos níveis arteriais de glicina que foi verificada no animal tratado com ornitina e fenilbutirato em conjunto (Figura 29).

No final da experiência removeu-se o córtex frontal do cérebro e mediu-se o teor em água do cérebro (Figura 30).

Um patologista independente relatou a anatomia celular do cérebro destes animais experimentais. Resume-se a seguir o seu relato.

ALF: Microvasos com edema perivascular com vesículas circundantes. Neurónios com alterações necróticas rodeados por vesículas.

ALF + O+P: Microvasos com edema perivascular com vesículas circundantes (menos do que da ALF sem qualquer tratamento). Edema intracelular.

Simulado: Tecido cerebral com alterações ultra-estruturais mínimas = tecido cerebral normal.

## **Conclusões**

Os inventores constataram que a simulação de alguns dos sintomas de um ataque agudo associado a doença crónica do fígado, tais como aumento da concentração de amónia ou simulação de uma hemorragia gastrointestinal, resulta em redução da função dos neutrófilos e esta redução pode ser parcialmente revertida por ornitina ou isoleucina. O resgate da função dos neutrófilos tanto por ornitina como por isoleucina desempenha um papel importante na prevenção de sepsia que é um factor precipitador comum na progressão da descompensação do fígado.

Além disso, os inventores constataram que a isoleucina não afecta a elevação na concentração de amónia após uma hemorragia gastrointestinal simulada. Deste modo, contrário à hipótese de que os níveis de amónia diminuirão após administração de isoleucina por causa da estimulação da

síntese de proteína, os níveis de amónia não são afectados. Assim, a utilização de isoleucina em combinação com ornitina, conhecida por diminuir os níveis de amónia, é particularmente vantajosa.

Por conseguinte, a administração de ornitina e isoleucina previne as consequências metabólicas de uma hemorragia gastrointestinal. Níveis de amónia em ascensão são contidos, a deficiência em isoleucina é corrigida e a função dos neutrófilos é recuperada. A utilização combinada de ornitina e isoleucina proporciona pois um novo tratamento para pacientes após um evento precipitador para prevenir a ocorrência de descompensação do fígado.

Os inventores constataram também que L-ornitina-L-aspartato (LOLA), que é utilizado para reduzir a amónia em pacientes com encefalopatia hepática, não reverte o efeito de amónia na função dos neutrófilos. Assim, a utilização de ornitina sozinha é mais vantajosa do que a utilização de LOLA, uma vez que a ornitina pode não só reduzir a amónia mas também recuperar a função dos neutrófilos. Também, o componente de aspartato de LOLA acumula-se no corpo. Esta acumulação de aspartato pode realmente ser prejudicial para os pacientes uma vez que o aspartato agrava o efeito da amónia na função dos neutrófilos, reduzindo adicionalmente a função dos neutrófilos. Consequentemente, a prevenção ou retardamento do surgimento da descompensação do fígado podem ser conseguidas utilizando ornitina em combinação com isoleucina, preferivelmente na ausência de aspartato.

Adicionalmente, os inventores constataram que o tratamento de pacientes com encefalopatia hepática (EH) com L-ornitina-L-aspartato (LOLA) reduz os níveis de amónia e, como consequência, aumenta os níveis de glutamina. Contudo, a glutamina é apenas um tampão de amónia temporário na medida em que esta pode reciclar e regenerar amónia no rim e no intestino delgado. Deste modo, o tratamento com LOLA sozinho pode conduzir a uma elevação secundária nos níveis de amónia, contribuindo adicionalmente para a patologia da encefalopatia hepática.

A utilização de fenilacetato ou fenilbutirato em crianças com perturbações do ciclo da ureia reduz os níveis anormalmente elevados de glutamina. Em contraste, pacientes padecendo de EH têm níveis normais de glutamina a não ser que,

como se mostra no Exemplo 1, estes estejam a ser tratados com LOLA que reduz os níveis de amónia mas aumenta os níveis de glutamina. Por conseguinte, a utilização de fenilacetato e/ou fenilbutirato permite a remoção de glutamina para prevenir a elevação secundária nos níveis de amónia em pacientes com EH.

Consequentemente, um tratamento melhorado para a encefalopatia hepática pode ser conseguido por administração de ornitina em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato, preferivelmente na ausência de aspartato.

As nossas investigações exaustivas em modelos animais e também em humanos com cirrose suportam a perspectiva de que o principal órgão de remoção de amónia em pacientes com cirrose é o músculo, convertendo amónia em glutamina, uma reacção na qual é utilizado glutamato. Em insuficiência hepática, a enzima responsável por esta reacção, glutamina-sintetase, é induzida e a provisão de glutamato aumentaria a desintoxicação de amónia.

A ornitina, um precursor de glutamato, desintoxica a amónia por transformação em glutamina. No entanto, os nossos estudos preliminares mostraram que esta glutamina recicla e regenera amónia. O nosso invento proporciona um novo método não apenas de desintoxicação de amónia em glutamina mas também de eliminação da glutamina em excesso que é gerada. Assim, OP reduz a concentração de amónia em pacientes com cirrose e hiperamonomia de um modo significativamente mais acentuado do que qualquer um destes sozinho. O efeito é claramente sinérgico em vez de aditivo. Para além disso, o aumento pós-prandial na amónia é abolido por administração de OP. Isto pode permitir alimentar pacientes com cirrose descompensada com dietas ricas em proteína sem o risco de hiperamonomia. A redução de amónia foi associada à melhoria no estado mental. Consegue-se uma redução da concentração de amónia prevenindo um aumento em glutamina. Isto é consistente com a hipótese de que a ornitina está a conduzir a produção de glutamina no músculo (aprisionando por isso 1 molécula de amónia) mas esta glutamina é excretada (possivelmente como um aducto de fenilacetato) prevenindo uma elevação da glutamina sistémica, prevenindo por isso o ressurgimento de hiperamonomia.

O conhecimento estabelecido de que o fenilacetato reduz a amónia no bebé hiperamonémico apresentando perturbações no ciclo da ureia é que a amónia é aprisionada em glutamina e que

a glutamina é transportada para os rins para excreção como o aducto fenilacetatoglutamina. Estes bebés apresentam amónia elevada e, o mais importante, glutamina elevada. Inversamente, o paciente cirrótico apresenta amónia elevada e glutamina normal a baixa. O modelo de porco descrito acima não tem uma glutamina elevada e os níveis de amónia aumentam dramaticamente após o fígado ser isolado.

O tratamento com ornitina sozinha aumenta a glutamina no sangue enquanto os níveis de amónia não são afectados. O fenilbutirato sozinho aumenta marginalmente a glutamina e mais uma vez tem efeitos insignificantes nos níveis de amónia. Em contraste dramático, neste modelo catastrófico de hiperamonemia galopante, a combinação de ornitina e fenilbutirato em conjunto (OP) consegue uma redução apreciável de amónia na circulação e melhora o aumento da glutamina observado com ornitina sozinha. A glicina, um aminoácido gerador de amónia, aumentou em todos os animais, porém, a elevação deste aminoácido foi substancialmente contida apenas no animal tratado com OP, sugerindo um benefício adicional para esta forma de intervenção. Uma consequência estabelecida de amónia elevada é o inchaço do cérebro à medida que o teor em água do cérebro aumenta. O cérebro a partir de porcos tratados com ornitina sozinha exibe um aumento considerável do teor em água enquanto a ornitina e fenilbutirato combinados reduzem o teor em água do cérebro. Histologicamente, existe uma lesão menos evidente na micro-estrutura do cérebro do animal com tratamento combinado de ornitina e fenilbutirato em comparação com o animal tratado com placebo.

Lisboa, 2010-05-10

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de ornitina no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

2. Utilização de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com ornitina para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

3. Utilização de ornitina e de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato no fabrico de um medicamento para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde

- (a) a referida descompensação do fígado é num paciente com doença crónica do fígado; e/ou
- (b) a referida prevenção ou tratamento envolve retardar o início de descompensação do fígado; e/ou
- (c) o paciente teve ou é suspeito de ter tido um evento precipitador; e/ou
- (d) a encefalopatia hepática é tratada num paciente com doença crónica do fígado ou insuficiência hepática aguda.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, onde o referido evento precipitador é hemorragia gastrointestinal, infecção, trombose da veia portal ou desidratação; e/ou o medicamento é administrado em 6 horas após terem sido detectados o(s) sintoma(s) de um referido evento precipitador ou evento suspeito de ser precipitador.

6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde o referido medicamento

- (a) comprehende adicionalmente isoleucina; e/ou
- (b) não contém substancialmente qualquer outro aminoácido.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde

- (a) a referida ornitina está presente como um aminoácido monomérico livre ou um sal fisiologicamente aceitável; e/ou
- (b) o pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato está presente como fenilacetato de sódio ou fenilbutirato de sódio; e/ou
- (c) a referida isoleucina está presente como um aminoácido monomérico livre ou um sal fisiologicamente aceitável.

8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes onde o medicamento é formulado para administração intravenosa, intraperitoneal, intragástrica, intravascular ou oral.

9. Produtos contendo ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde os referidos produtos são utilizados na forma de uma preparação combinada para utilização simultânea, separada ou sequencial.

10. Produtos de acordo com a reivindicação 9 que

- (a) compreendem adicionalmente isoleucina; e/ou
- (b) não compreendem substancialmente qualquer outro aminoácido.

11. Composição farmacêutica compreendendo ornitina e pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização num método de prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11 que

- (a) compreende adicionalmente isoleucina; e/ou
- (b) não compreende substancialmente qualquer outro aminoácido.

13. Ornitina para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde a referida ornitina é utilizada em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato.

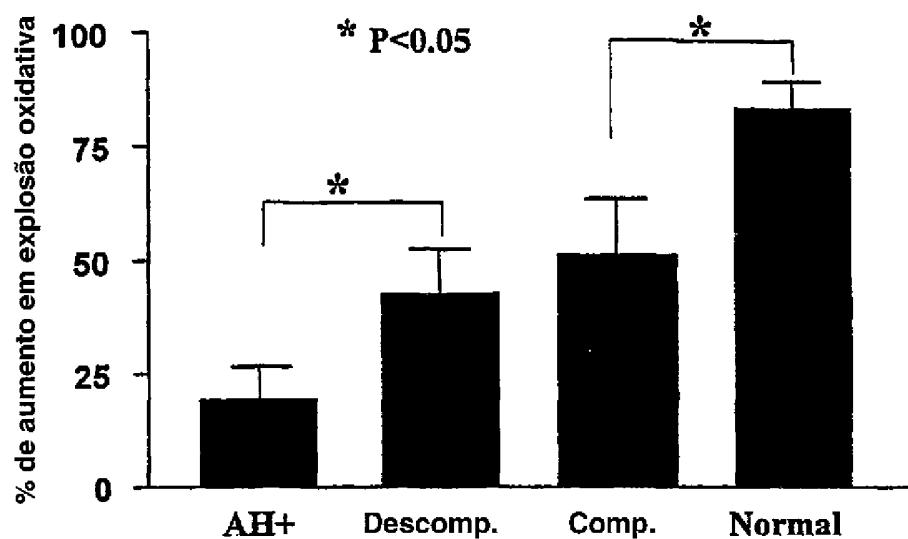
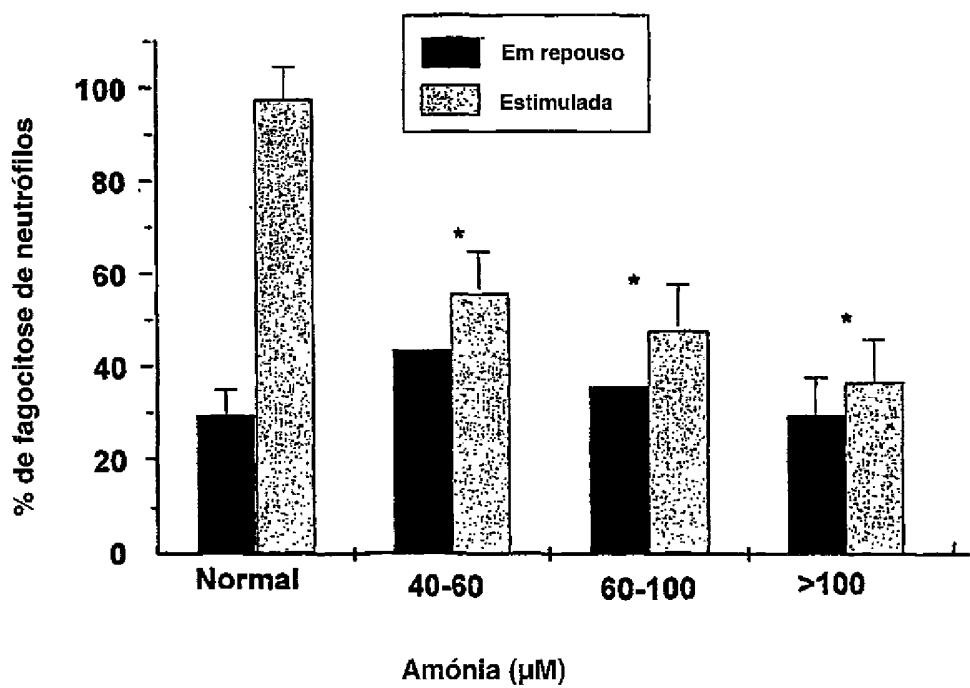
14. Pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para utilização na prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática, onde o referido fenilacetato e/ou fenilbutirato é utilizado em combinação com ornitina.

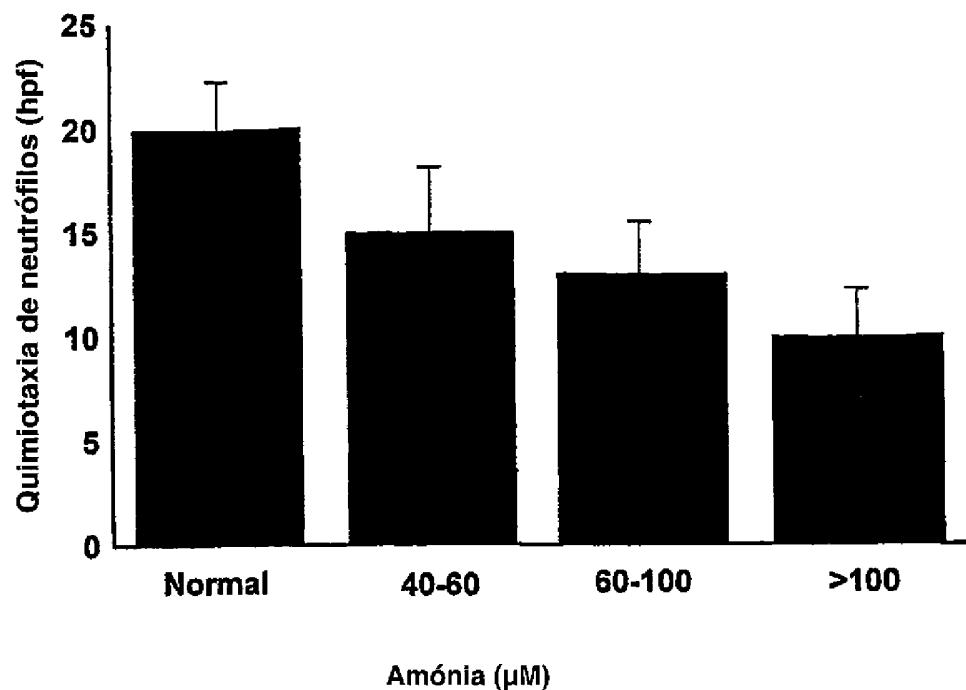
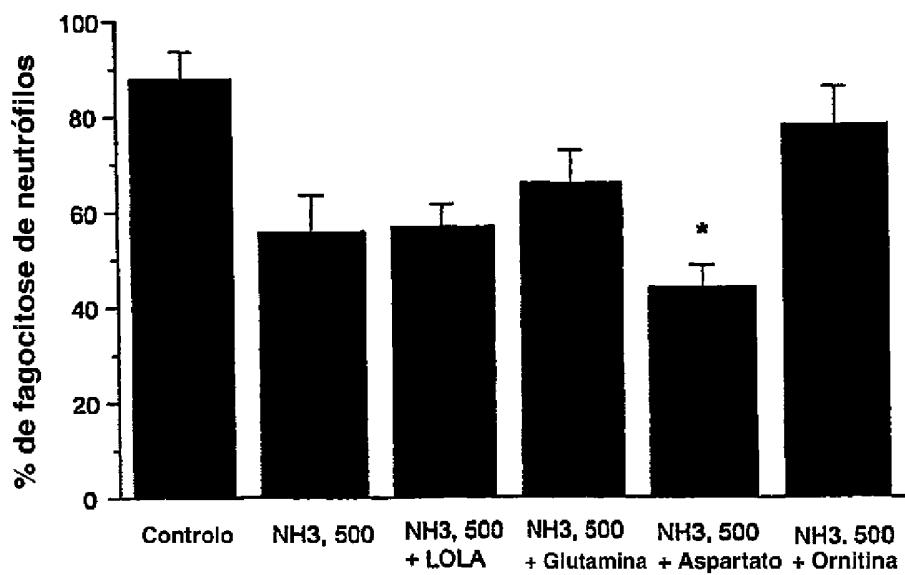
Lisboa, 2010-05-10

RESUMO

**"Composições compreendendo ornitina e fenilacetato ou fenilbutirato para tratamento de encefalopatia hepática"**

O presente invento refere-se à utilização de ornitina no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática. O invento refere-se também à utilização de pelo menos um de fenilacetato e fenilbutirato no fabrico de um medicamento para utilização em combinação com ornitina para prevenção ou tratamento de descompensação do fígado ou encefalopatia hepática.

**Figura 1****Figura 2**

**Figura 3****Figura 4**

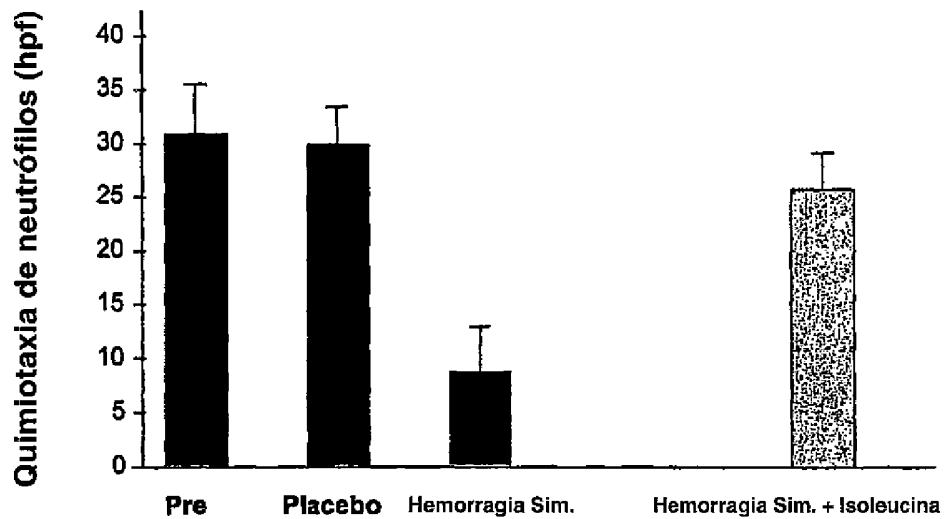
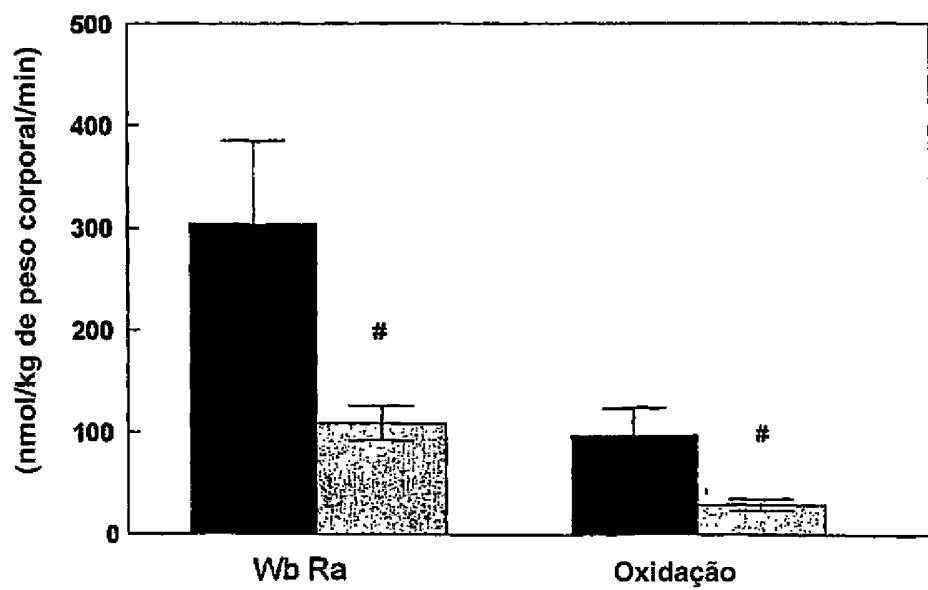
**Figura 5****Figura 6**

Figura 7

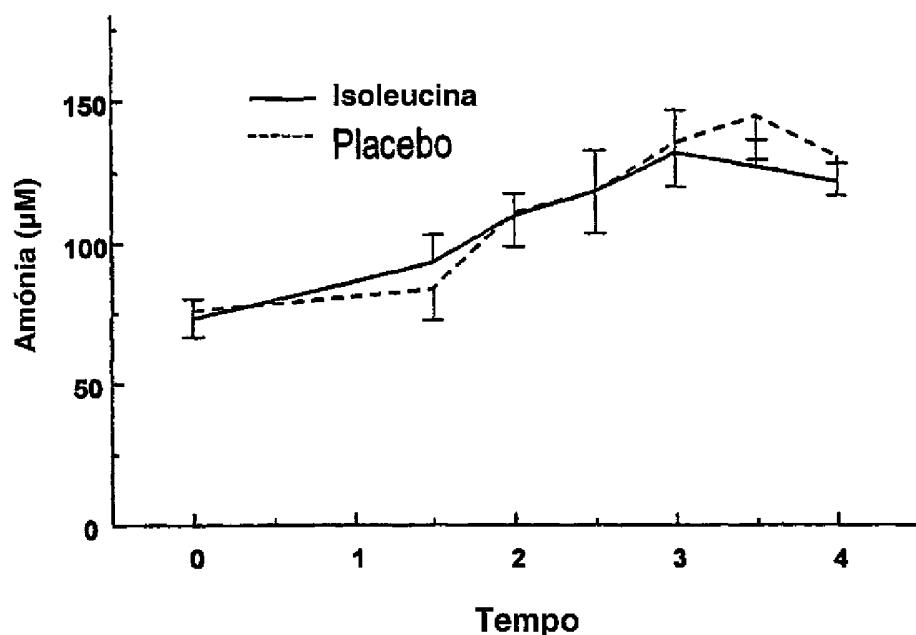
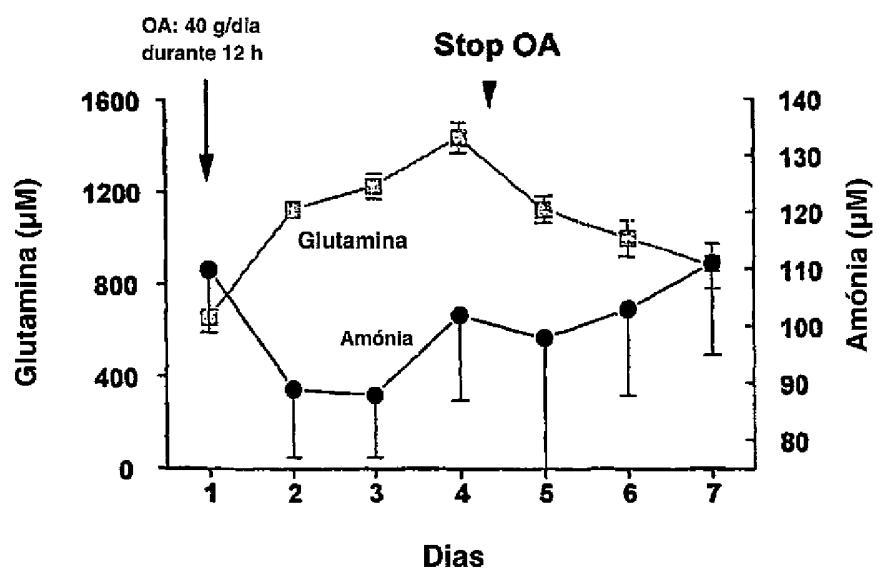
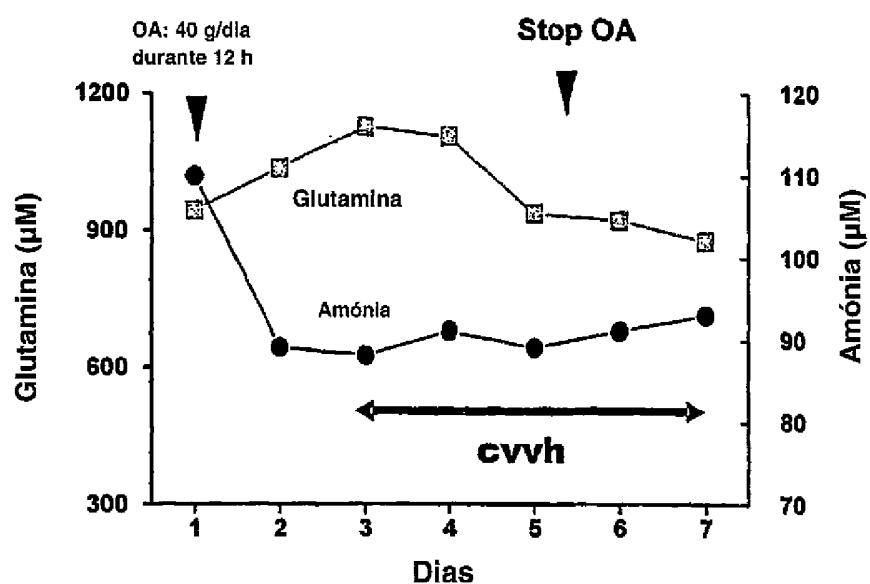
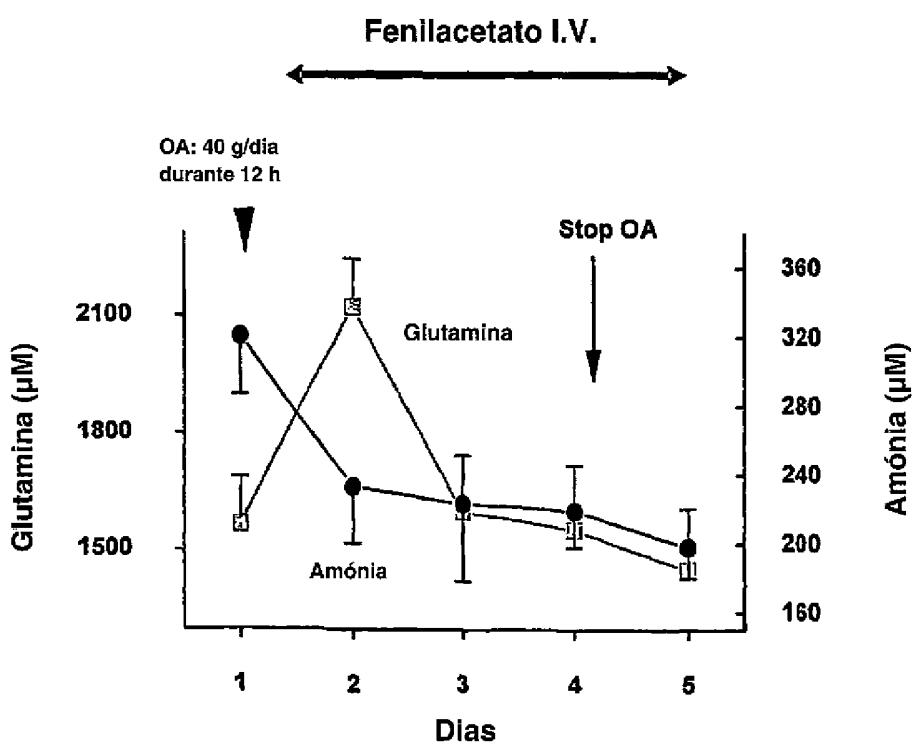


Figura 8



**Figura 9****Figura 10**

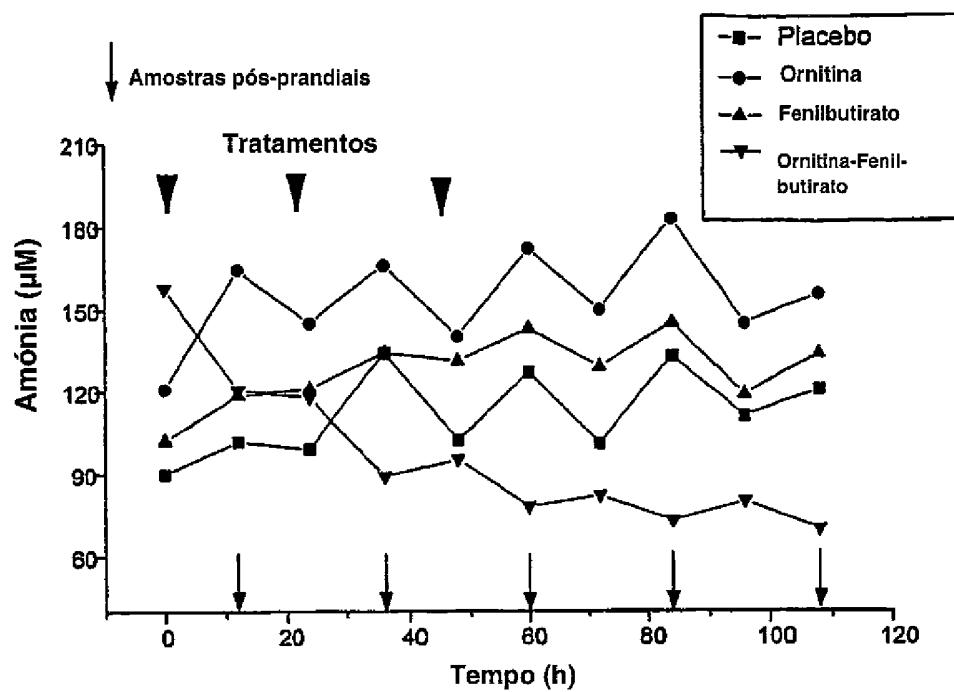
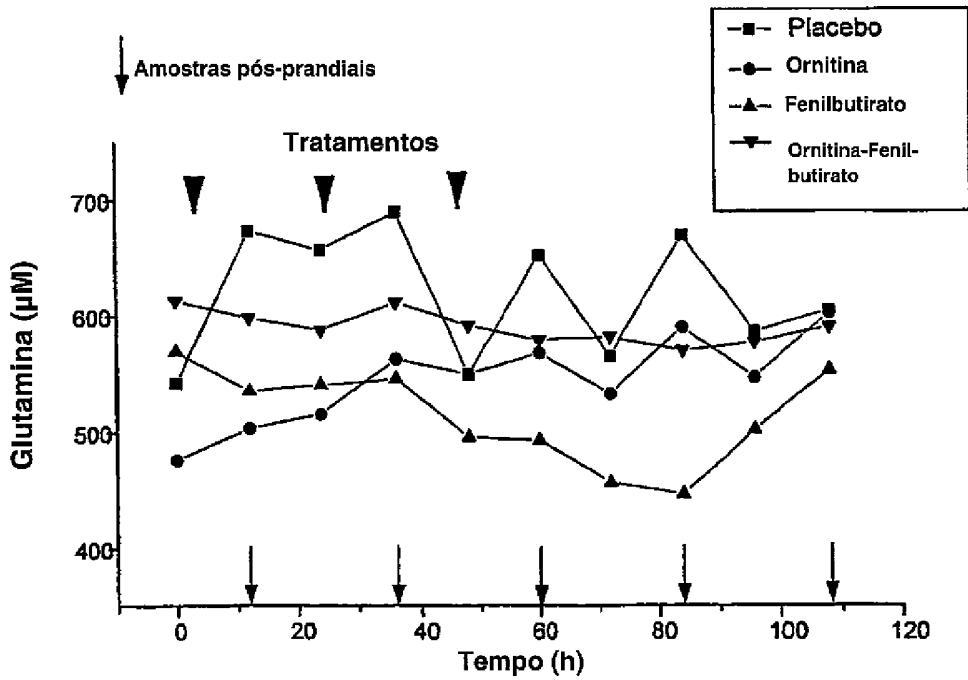
**Figura 11****Figura 12**

Figura 13

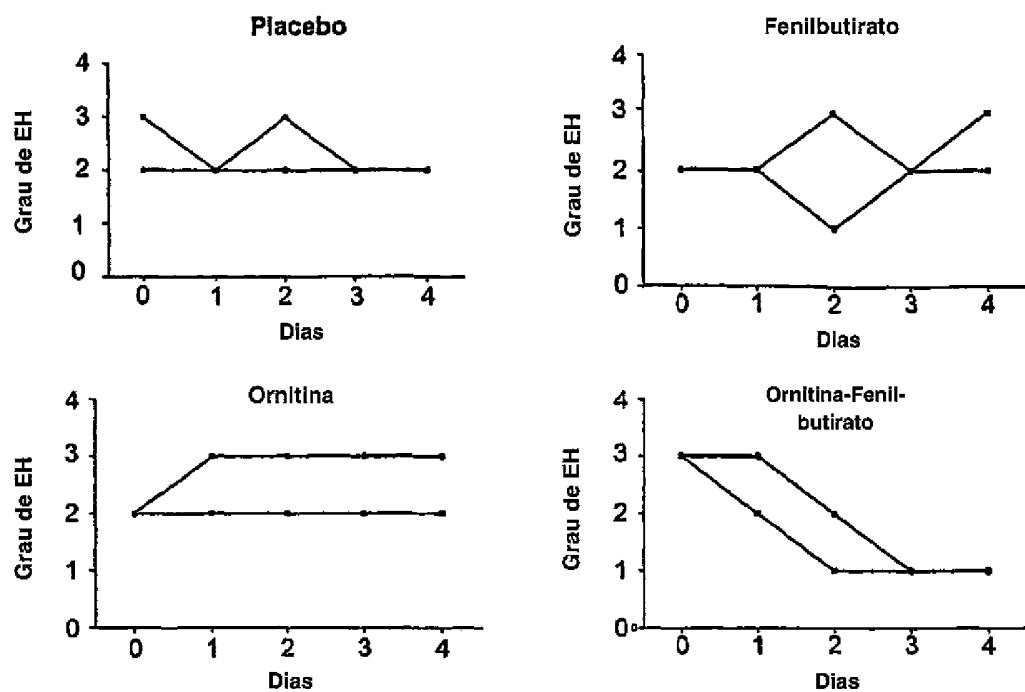


Figura 14

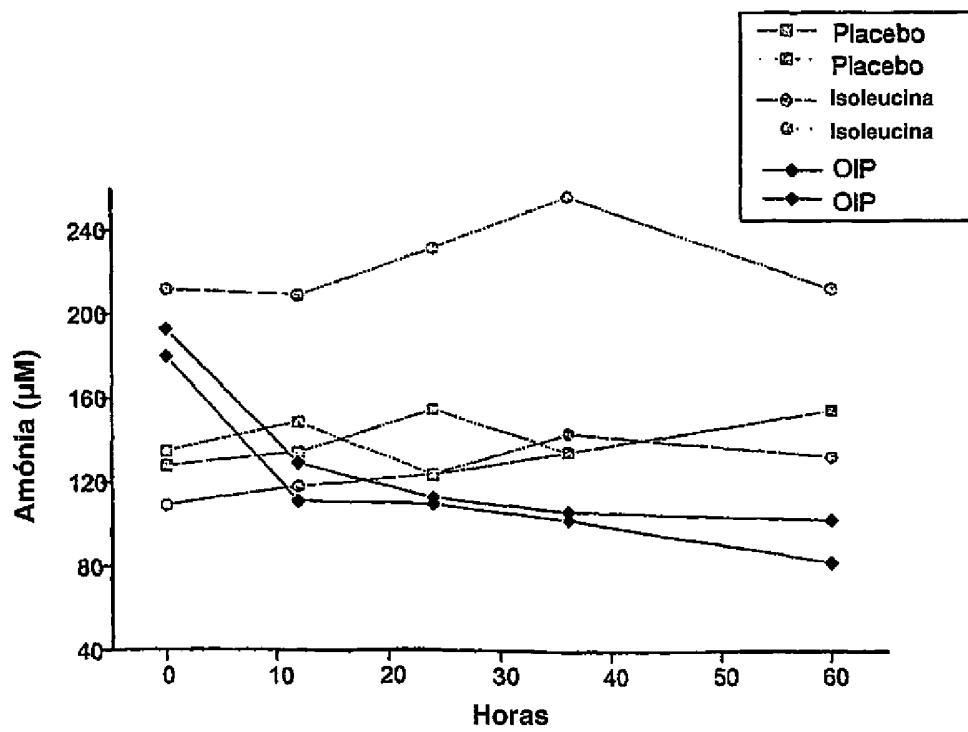


Figura 15

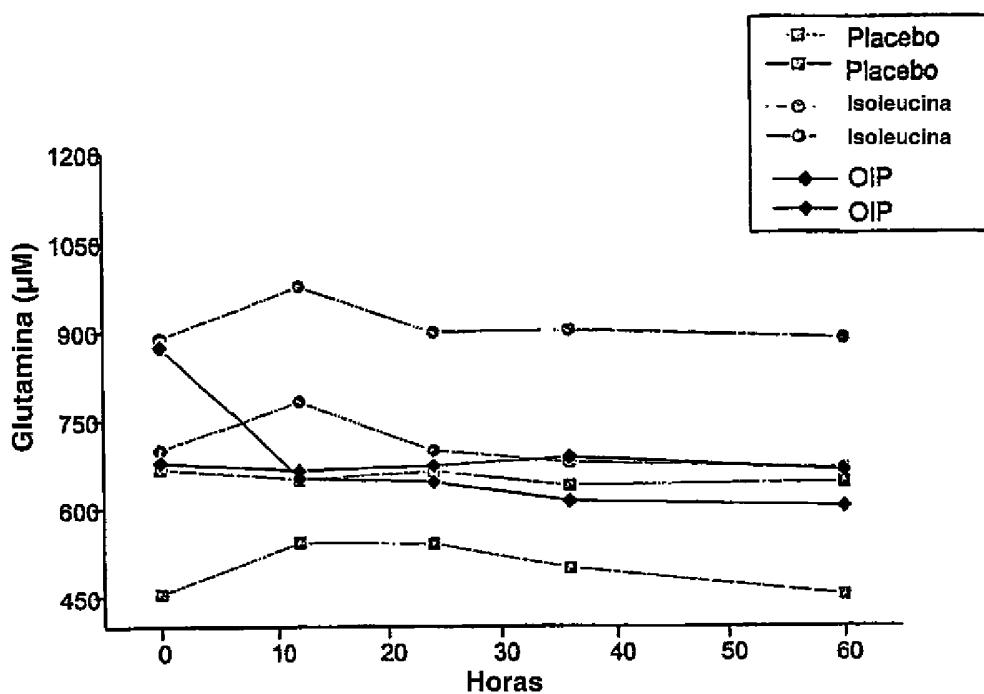


Figura 16

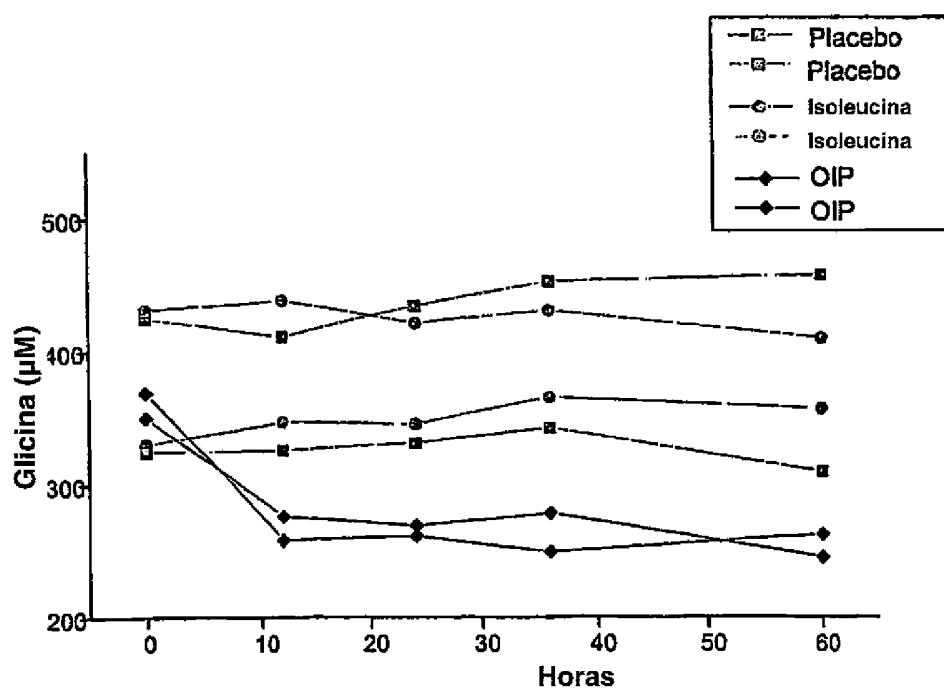


Figura 17

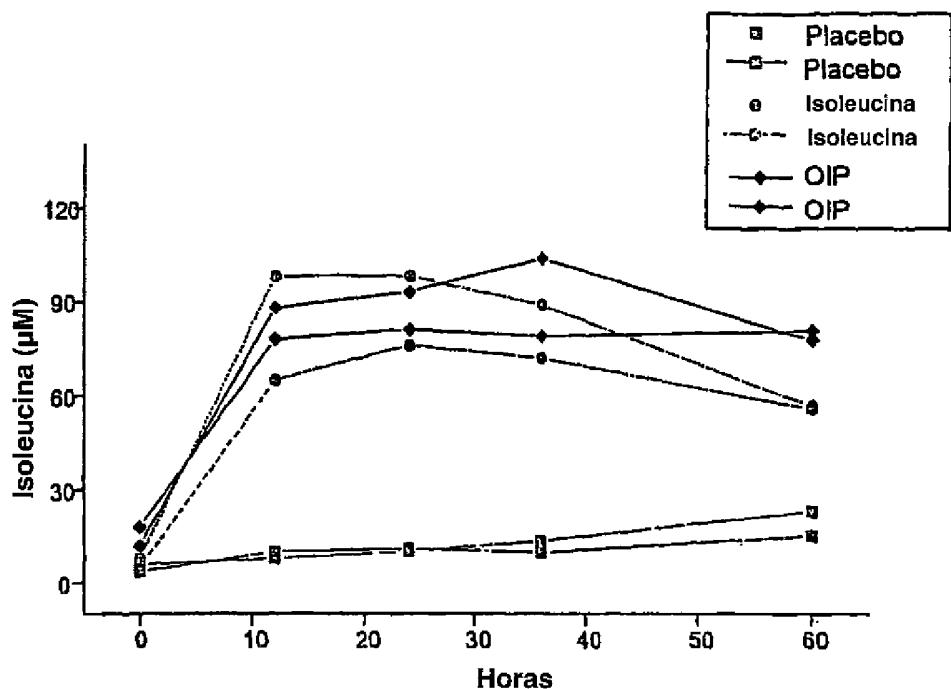
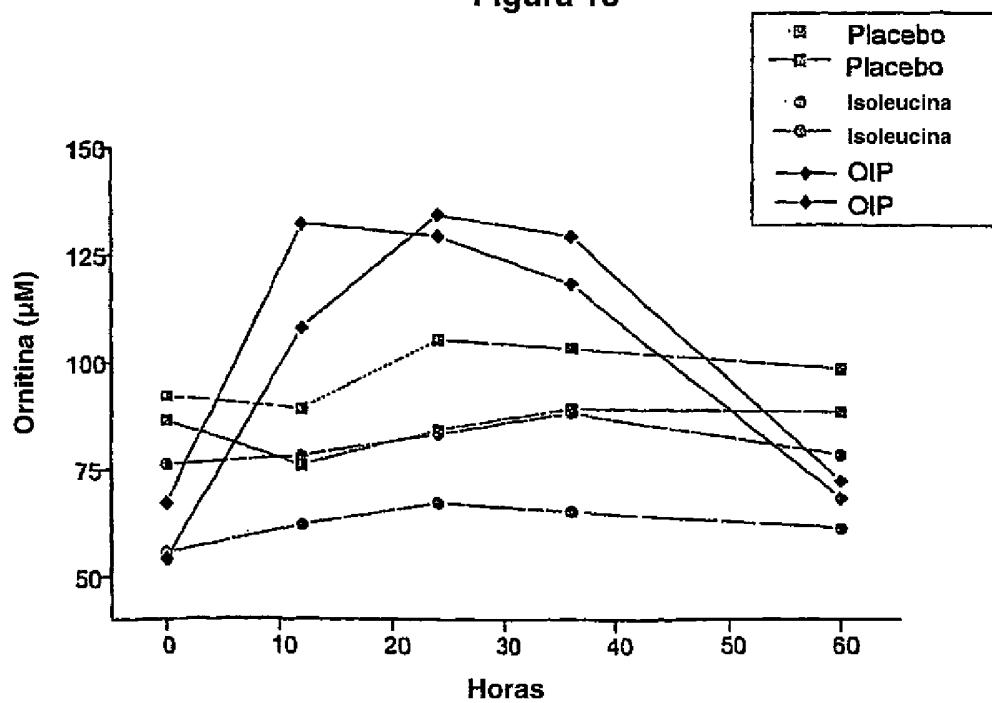
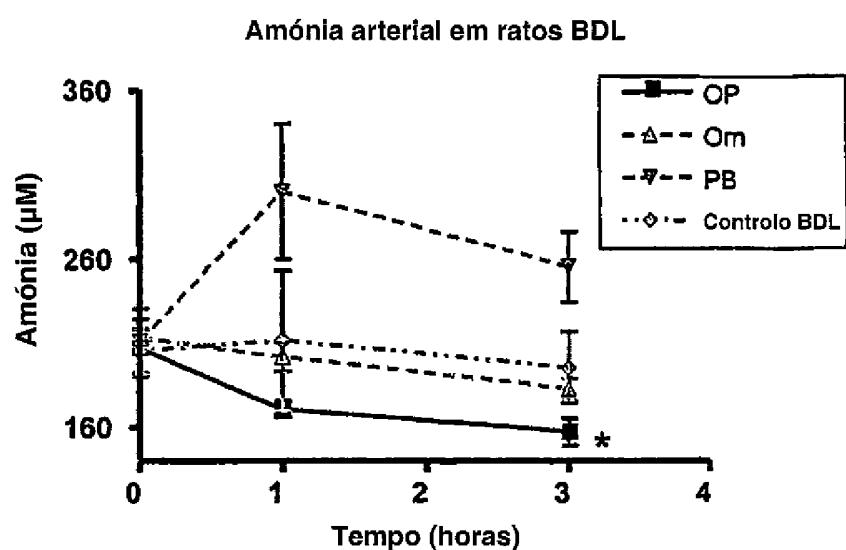
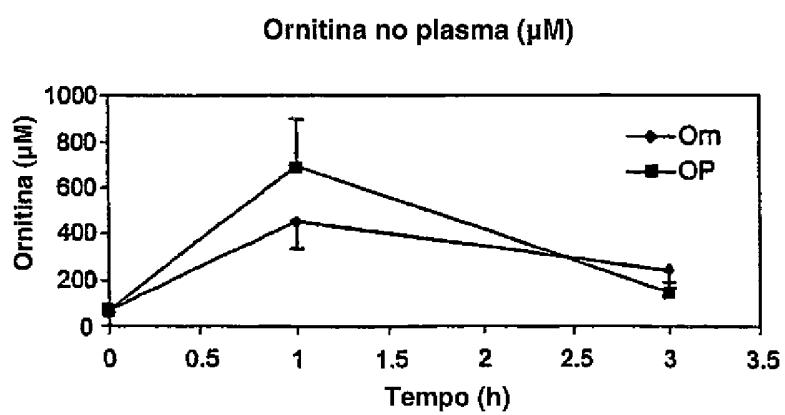


Figura 18



**Figura 19****Figura 20**

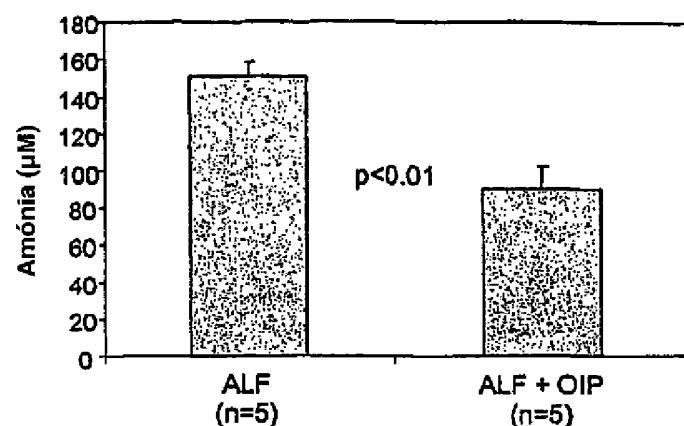
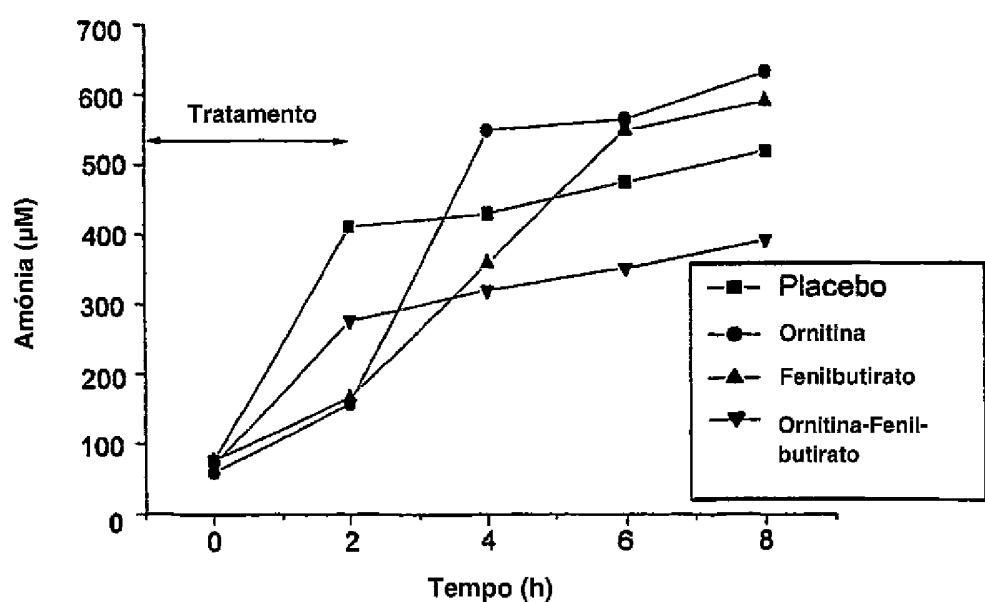
**Figura 21****Figura 22**

Figura 23

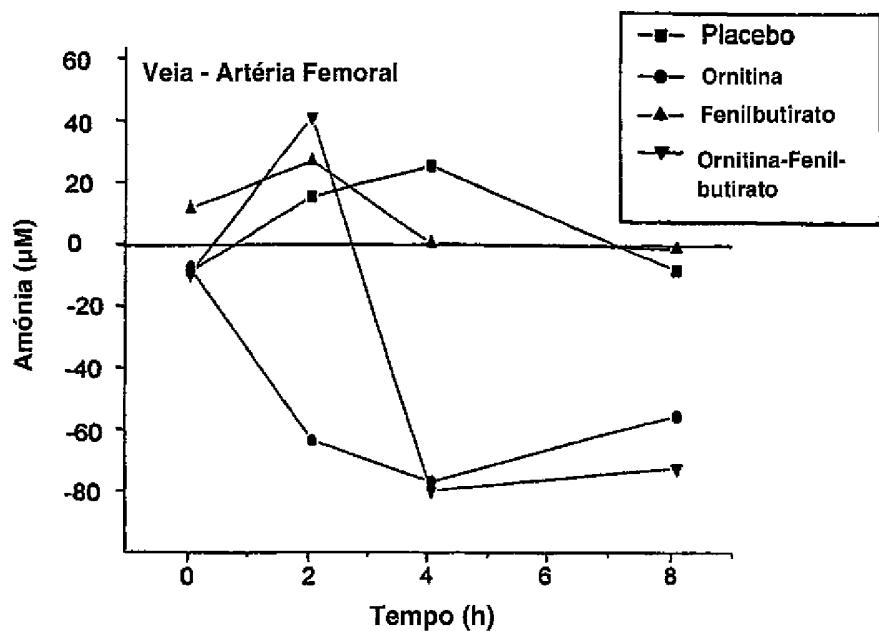
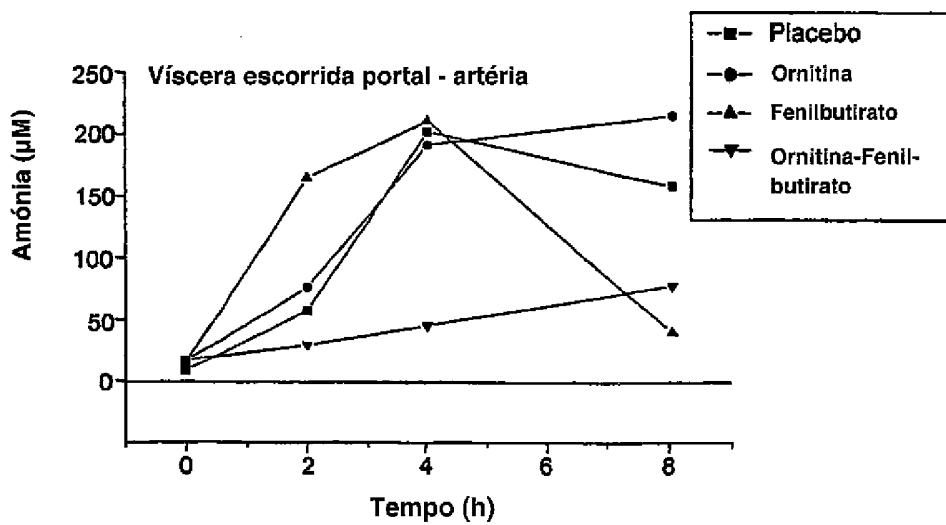
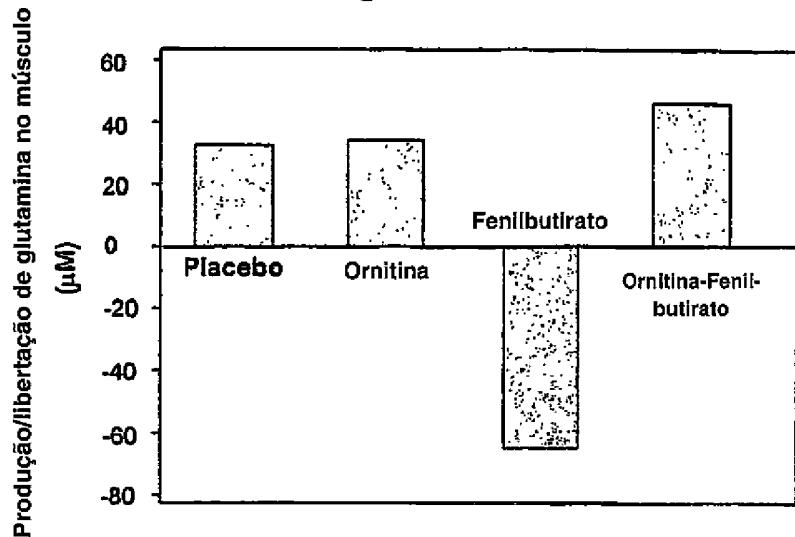
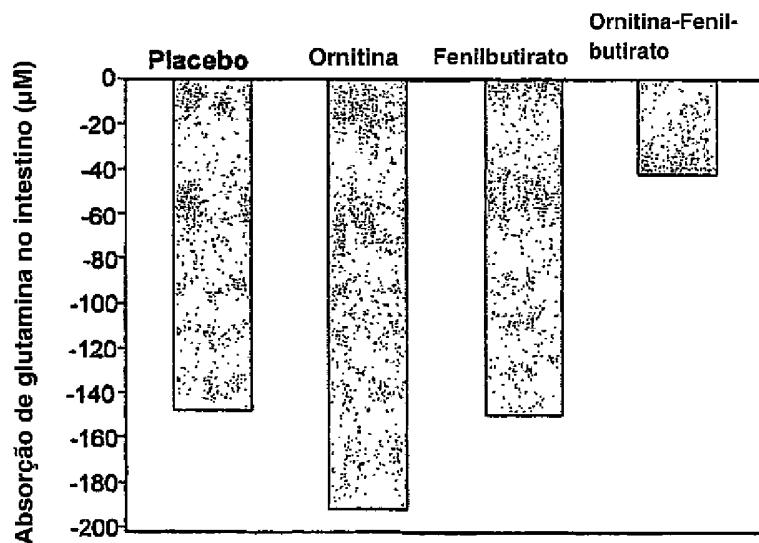
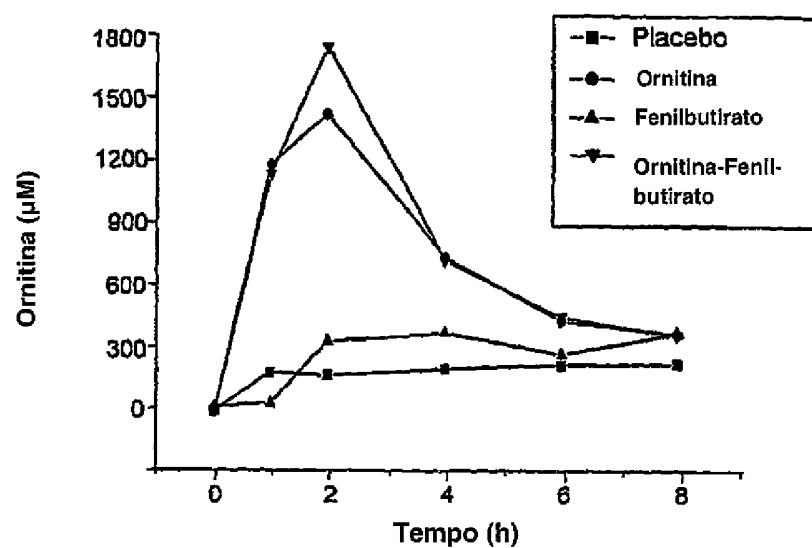
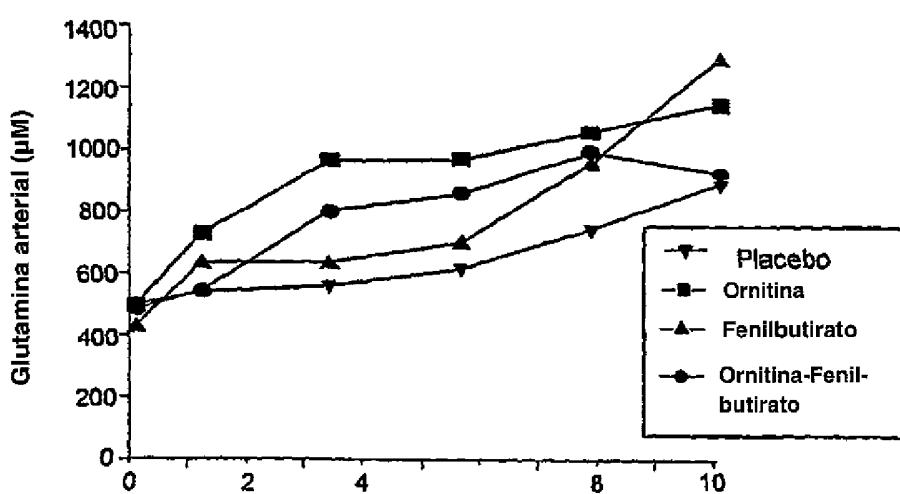
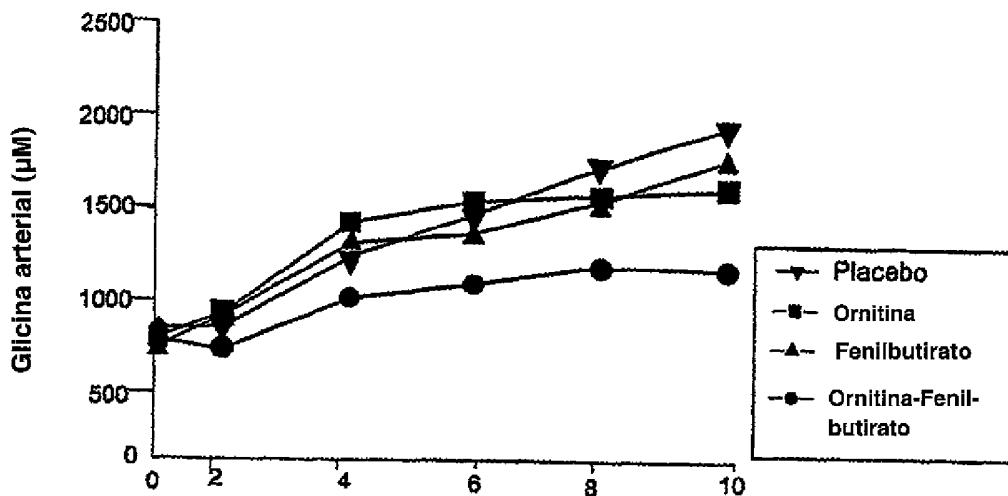


Figura 24



**Figura 25****Figura 26**

**Figura 27****Figura 28**

**Figura 29****Figura 30**