



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 755**

51 Int. Cl.:

A61K 31/16 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/7024 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04776447 .7**

96 Fecha de presentación : **10.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1635806**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Método para tratar la hepatitis alcohólica.**

30 Prioridad: **13.06.2003 US 478637 P**
02.09.2003 US 499552 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

73 Titular/es: **University of Pittsburgh of the
Commonwealth System of Higher Education
911 William Pitt Union
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

72 Inventor/es: **Fink, Mitchell, P. y
Yang, Runkuan**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

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

DESCRIPCIÓN

Método para tratar la hepatitis alcohólica.

5 **Antecedentes de la invención**

La hepatitis alcohólica está asociada a una considerable morbilidad. La tasa de mortalidad a corto plazo como resultado de la hepatitis alcohólica puede ser hasta de un 46% (Akriviadis *et al.*, "Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind placebo-controlled trial", *Gastroenterology* 119: 1637-1648 (2000)); y Akriviadis *et al.*, "Failure of colchicines to improve short-term survival in patients with alcoholic hepatitis", *Gastroenterology* 99: 811-8.18(1990)).

Las medidas generales para el tratamiento de la hepatitis alcohólica incluyen la abstinencia del alcohol y el cuidado de apoyo tal como el apoyo nutritivo, el alivio de la avitaminosis y los ajustes dietéticos si están presentes la encefalopatía por ascitis o hepática. Mientras que la hepatitis alcohólica es reversible si los pacientes suspenden la bebida, usualmente demora varios meses en resolverse. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos métodos de prevención y/o mejora de los efectos de la hepatitis alcohólica.

El documento WO 02/074301 describe un método para usar pirurato y/o sus derivados para el tratamiento de los trastornos inflamatorios en los que interviene la citoquina.

Uesugi *et al* (*Journal of Immunology*, vol. 168(6), 2002, páginas 2963-2969) formulan la hipótesis de que la proteína fijadora de LPS (LBP) puede jugar un papel importante en las lesiones hepáticas tempranas inducidas por el alcohol mediante el aceleramiento de la transducción de la señal inducida por la LPS.

Naveau *et al* (*The American Journal of Gastroenterology*, vol. 96(12), 2001, pages 3361 to 3367) plantea que en pacientes con hepatitis alcohólica aguda, TNF_sR_p55 probablemente interviene en la citotoxicidad de $\text{TNF-}\alpha$ y que el efecto citotóxico podría ser amplificado por el agotamiento de TGS_H al aumentar la peroxidación de los lípidos.

Nanji AA (*Alcohol*, Vol. 27, no. 1, 2002, pages 13 to 15) expone que un papel combinado para la necrosis de los tumores del factor alfa y la ciclooxigenasa-2 es importante en la patogénesis de la hepatitis alcohólica.

Yang *et al* (*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283; G212-221, 2002) describe que el pirurato etílico modula la expresión del gen inflamatorio en ratones sometidos a un shock hemorrágico.

La WO 01/24793 expone un compuesto de un éster de pirurato y un método de uso para la reanimación después de eventos de isquemia y reperfusión.

Antosiewicz *et al* (*Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 29, no. supplement 1, 2000, page 528) describe que el pirurato protege de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína.

El documento WO 03/088955 revela una composición farmacéutica compuesta por un éster de ácido alfa-acetoalcanoico o de amina y un ácido láctico o de la sal de ácido láctico.

45 **Resumen de la invención**

Se ha encontrado que ciertos α -acetoésteres y α -acetoamidas pueden ser usados para mejorar los efectos de la hepatitis alcohólica aguda. Por ejemplo, cuando la solución de Ringer de piruvato de etilo (REPS), (por sus siglas de la expresión inglesa *Ringer's Ethyl Pyruvate Solution*) fue administrada a ratones de laboratorio C57/BL6 después de inducirles lesiones hepáticas agudas según un modelo de ingestión excesiva de alcohol, la REPS disminuyó la ocurrencia de hepatitis alcohólica aguda, comparada con los ratones de control a los cuales se les administró una solución de Ringer de lactato (Ejemplos 2-5). Por consiguiente, se explica en el presente documento, un método para tratar sujetos que tienen o están en peligro de desarrollar hepatitis, por ejemplo, la hepatitis causada por alcohol y otras toxinas.

La presente invención trata sobre un método para tratar o mejorar los efectos de la hepatitis. Típicamente, la hepatitis es causada por una toxina tal como el alcohol, drogas o productos químicos. El método consiste en administrar al sujeto una cantidad eficaz de un éster de un ácido alfa-acetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-acetoalcanoico. Más comúnmente, el método es usado para tratar la hepatitis causada por el alcohol, de ahora en adelante denominada "hepatitis alcohólica".

El método de la presente invención tiene varias ventajas. El tratamiento terapéutico o profiláctico de la hepatitis alcohólica aguda usando los compuestos descritos en la presente mejora los síntomas de la hepatitis alcohólica aguda. Además, al tratar la hepatitis alcohólica aguda según lo descrito en la presente, el tiempo de recuperación de los pacientes con hepatitis alcohólica puede ser reducido.

Breve descripción de las figuras

Lo anteriormente mencionado y otros objetos, características y ventajas de la invención, serán obvios a partir de la siguiente descripción más concreta de las realizaciones preferentes de la invención, según se ilustra en los dibujos que se adjuntan. Los dibujos no están necesariamente a escala, habiéndose hecho hincapié más bien en ilustrar los principios de la invención.

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los efectos de la solución de Ringer de lactato (RLS) o la solución de Ringer de piruvato de etilo (REPS) sobre la expresión hepática de $\text{TNF-}\alpha$ en ratones con hepatitis alcohólica.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los efectos de la solución de Ringer de lactato (RLS) o la solución de Ringer de piruvato de etilo (REPS) sobre el contenido de malondialdehído hepático en ratones con hepatitis alcohólica.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los efectos de la solución de Ringer de lactato (RLS) o la solución de Ringer de piruvato de etilo (REPS) sobre la concentración de plasma de Amino transferasa Alanina (ALT) (por sus siglas de la expresión inglesa Alanine Aminotransferase) en ratones con hepatitis alcohólica.

Descripción detallada de la invención

A continuación se ofrece una descripción de las mencionadas realizaciones de la invención. La presente invención consiste en un método para tratar la hepatitis en un sujeto mediante la administración de un éster de un ácido alfa-acetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-acetoalcanoico disueltos en un vehículo fisiológicamente aceptable. El método descrito puede ser usado para tratar la hepatitis causada por el alcohol, o sea, la hepatitis alcohólica. Alternativamente, el método descrito es usado para tratar la hepatitis causada por intoxicaciones, agentes químicos y drogas.

La "hepatitis alcohólica" es un precursor de la cirrosis y es causada por el alcohol. El cuadro típico histológico incluye la necrosis hepatocelular y la degeneración de balonamiento (distensión) ("*ballooning degeneration*"), y los cuerpos hialinos alcohólicos de Mallory (aglutinación anormal de proteínas de filamentos intermedios celulares indicadores de fibrosis). La colestasis es prominente. La hepatitis alcohólica puede variar desde una hepatitis ligera, con pruebas de laboratorio anormales como únicos indicadores de la enfermedad, hasta la disfunción hepática severa con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), várices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación anormal de la sangre y coma. La hepatitis alcohólica es reversible si los pacientes dejan de beber pero generalmente toma varios meses el resolverla. La hepatitis alcohólica puede conducir a fibrosis y cirrosis hepática. Si las anormalidades hepáticas duran menos de seis meses, la enfermedad será considerada como una hepatitis aguda; si el curso de la enfermedad se extiende más allá de aproximadamente seis meses, la hepatitis será considerada como hepatitis crónica.

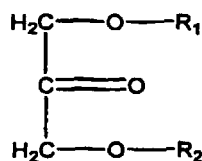
Muchas drogas y agentes químicos pueden causar lesiones hepáticas e inducir a las hepatitis, tales como amfetamina, tetraciclina, acetaminofeno, fenoprofeno, y otras similares. El grado y la gravedad de la lesión hepática está en dependencia de la dosis, el tiempo de evolución y de la constitución del individuo. La exposición a largo plazo a drogas y/o químicos puede inducir a la hepatitis crónica e incluso a la cirrosis. Los métodos descritos son efectivos en el tratamiento de la hepatitis causado por estos agentes. Comúnmente, hay un periodo de tiempo entre la exposición a estos agentes (o exposición inicial) a estos agentes y el debut de los síntomas asociados con la hepatitis, por ejemplo, al menos una semana, un mes, dos meses, seis meses o un año.

Los métodos mostrados también son efectivos para mejorar los efectos de los agentes antivirales tales como alfa interferón y ribavirina, los cuales pueden causar o exacerbar la hepatitis. La coadministración de los compuestos descritos en la presente invención con tales agentes antivirales está también dentro de la esfera de acción de la invención expuesta.

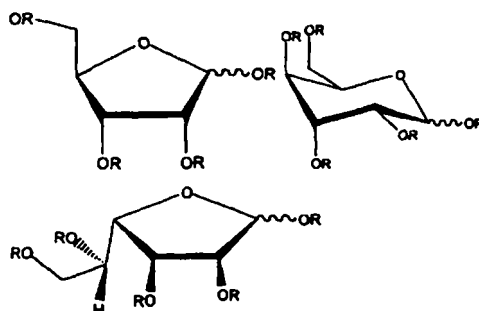
Los métodos expuestos también pueden ser usados profilácticamente, o sea, para tratar a sujetos que tienen riesgo de desarrollar ciertos tipos de hepatitis. Por ejemplo, sujetos con hepatitis alcohólica moderada o crónica o un sujeto infectado con hepatitis viral tal como la hepatitis C tienen mayor riesgo de complicaciones hepáticas ulteriores cuando se exponen a agentes tóxicos o están siendo tratados con ciertas drogas, según lo planteado anteriormente. El método expuesto también puede ser usado profilácticamente antes que dicha exposición o tratamiento comience. El método de la presente invención también puede ser administrado antes o posterior a ingestiones grandes de alcohol para prevenir, inhibir o reducir la ocurrencia de hepatitis alcohólica aguda.

En un aspecto, el agente terapéutico usado en el método expuesto en este documento es una cantidad eficaz de un éster de un ácido alfa-acetoalcanoico, por ejemplo, un ácido alfa-acetoalcanoico de cadena lineal o ramificada C_3 - C_8 . Los ejemplos incluyen alfa-aceto-butilato, alfa-acetopentanoato, alfa-aceto-3-metil-butilato, alfa-aceto-4-metil-pentanoato o alfa-aceto-hexanoato. Se prefiere el piruvato. Una variedad de grupos tales como alquilo, aralquilo, alcoxi-alquilo, carbalcoxi-alquilo o acetoxi-alquilo son adecuados para la posición éster de la molécula. Ejemplos específicos incluyen etilo, propilo, butilo, carbametoximetilo ($-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), carbetoximetilo ($-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), acetoxi-metilo ($-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), carbametoxi-etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), carbetoxi-etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), metoxi-metilo ($-\text{CH}_2\text{OCH}_3$) y etoxi-metilo ($-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$). Se prefieren los ésteres de etilo. También se incluyen los

tiolésteres (p. ej., en los cuales la porción de tiol es cisteína u homocisteína) y los ésteres de glicerilo (p. ej., en los cuales uno o más grupos de alcohol glicerol son sustituidos con un grupo α -acetoalcanoato. Otros grupos adecuados para la esterificación de los ácidos acetoalcanoicos incluyen: 1) ésteres de dihidroxiacetona de fórmula:



en la cual R_1 es un grupo α -acetoalcanoato tal como piruvilo y R_2 es H, un grupo α -acetoalcanoato tal como el piruvilo o un grupo acilo C_1 - C_3 tal como acetilo o propionilo; y 2) ésteres de monosacáridos tales como ésteres de ribosilo y glucosilo:



en la cual cada R es independientemente H, un grupo α -acetoalcanoato tal como piruvilo o un grupo acilo C_1 - C_3 tal como acetilo o propionilo, en caso de que al menos una R sea un grupo α -acetoalcanoato.

Ejemplos específicos de ésteres alfa-acetoalcanoicos para usarse en el método expuesto incluyen etil piruvato, propil piruvato, carbometoximetil piruvato, acetoximetil piruvato, carbetoimetil-metil piruvato, etoximetil piruvato, alfa-aceto-butirato de etilo, alfa-aceto-pentanoato de etilo, alfa-aceto-3-metil-butirato de etilo, alfa-aceto-4-metil-pentanoato de etilo o alfa-aceto-hexanoato de etilo. El piruvato de etilo es el éster de alfa-acetoácido preferido.

En otro aspecto más, el agente terapéutico usado en el método expuesto en la presente solicitud es una cantidad eficaz de una amida de un ácido alfa-acetoalcanoico. Las amidas adecuadas de los ácidos alfa-acetoalcanoicos para usarse en el método de la presente invención incluyen compuestos que poseen la siguiente fórmula estructural: $\text{RCOCONR}_1\text{R}_2$. R es un grupo alquilo; R_1 y R_2 son independientemente -H, alquilo, aralquilo, alcoxilalquilo, carbalcoxialquilo o $-\text{CHR}_3\text{COOH}$ (o sea, una "amida de aminoácido" de un ácido alfa-acetoalcanoico); y R_3 es la cadena lateral de un aminoácido de ocurrencia natural. Preferiblemente, la amida de un ácido alfa-acetoalcanoico es una piruvamida.

Los grupos alquilos adecuados incluyen una cadena lineal o un grupo alquilo ramificado C_1 - C_8 , preferiblemente grupos alquilos de cadena lineal C_1 - C_6 .

Los grupos arilos adecuados incluyen grupos aromáticos carbocíclicos (p. ej., fenilo y naftilo) y heterocíclicos (p. ej., furanilo y tiofenilo), preferiblemente fenilo.

Un grupo alcoxi es $-\text{OR}_4$, en el cual R_4 es un grupo alquilo, según lo definido anteriormente. Un grupo alcoxilalquilo es un grupo alquilo sustituido con $-\text{OR}_4$.

Un grupo aralquilo es $-\text{XY}$, en el cual X es un grupo alquilo y Y es un grupo arilo, ambos según lo definido anteriormente.

Un grupo carboxialquilo es un grupo alquilo sustituido con $-\text{COOH}$. Un grupo carbalcoxialquilo es un grupo alquilo sustituido con $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$, en el cual R es un grupo alquilo, según lo definido anteriormente.

Un grupo acilo es $-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, en el cual R es un grupo alquilo, según lo definido anteriormente.

Un grupo acetoxi alquilo es un grupo alquilo sustituido con $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, en el cual R es un grupo alquilo, según lo definido anteriormente.

Los términos "terapéutico" y "tratamiento" según se utilizan en el presente documento, se refieren a la mejoría de los síntomas asociados con una enfermedad o condición, incluyendo la prevención, inhibición o retraso de la

aparición de los síntomas de la enfermedad, y/o la reducción de la gravedad, duración o frecuencia de los síntomas de la enfermedad.

Un “sujeto” es preferiblemente un paciente humano, pero también puede ser un animal de compañía (p. ej., perro, gato y similares), un animal de granja (p.ej. caballo, vaca, oveja y similares) o un animal de laboratorio (p. ej., rata, ratón, un conejillo de indias y otros por el estilo).

La formulación de un agente terapéutico para ser administrado variará según la ruta de administración seleccionada (p. ej., solución, emulsión, cápsula). Una composición apropiada compuesta por el agente que será administrado puede ser preparada en un vehículo o portador fisiológica o farmacéuticamente aceptable. Un portador fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable para la composición usada en el método de la presente invención puede ser cualquier vehículo portador generalmente reconocido como seguro para administrar un agente terapéutico a un mamífero, por ejemplo, una solución buffer por infusión o inyección intravenosa de rápida absorción, una tableta para la administración oral o en forma de gel, micelas o lisosoma para la administración local/*in situ*. Una solución buffer preferente es el agua o una solución salina isotónica o hipertónica usando como búfer bicarbonato, fosfato, lactato o citrato a 0,1 M a 0,2 M. Alternativamente, el agente terapéutico es administrado en un diluyente, solución microcoloidal o microcristalina. Un vehículo preferente es la solución de Ringer salina isotónica que contenga aproximadamente de 105 mM a 110 mM de NaCl, aproximadamente de 3,8 mM a 4,2 mM de KCl y aproximadamente de 2,5 mM a 2,9 mM de CaCl₂. De mayor preferencia, el vehículo es la solución de Ringer de lactato que contenga aproximadamente de 105 mM a 110 mM de NaCl, aproximadamente de 3,8 mM a 4,2 mM de KCl y aproximadamente de 2,5 mM a 2,9 mM de CaCl₂ y aproximadamente de 25 mM a 30 mM de una sal de lactato como lactato de sodio. Preferentemente, la acidez de la formulación se ajusta en un intervalo de pH aproximadamente entre 4 y 8, de mayor preferencia a un valor de pH aproximadamente entre 5 y 7. Otros vehículos para los compuestos de la presente invención incluyen soluciones salinas isotónicas usando como búfer citrato, por ejemplo, aproximadamente de 100 mM a 200 mM de citrato.

Un intervalo de concentración preferente del agente terapéutico es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% del peso. En un aspecto de particular preferencia, la composición farmacéutica contiene aproximadamente 10 mg/ml de piruvato de etilo. Un ejemplo preferente de la formulación usada para tratar la hepatitis alcohólica contiene de 2% a 3% en peso de piruvato etilo, aproximadamente 100 mM del buffer de citrato (o aproximadamente de 25 mM a 30 mM de lactato sódico), aproximadamente 4 mM de KCl y, opcionalmente, 2,7 mM de CaCl₂. La formulación administrada para el tratamiento de la hepatitis alcohólica aguda puede formarse mediante la mezcla de componentes de una formulación de dos partes, una parte contiene, por ejemplo, piruvato de etilo (neto) y la segunda parte consiste en los componentes restantes de una formulación acuosa deseada, por ejemplo, aquellos reactivos descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas usadas en el método de la presente invención pueden incluir opcionalmente un agente de enolización cuando el agente terapéutico es un α -acetoéster. El agente de enolización y un α -acetoéster se contienen en un vehículo fisiológicamente aceptable. Un “agente de enolización” es un agente químico, el cual induce y estabiliza la resonancia de la forma enol de un α -acetoéster en o alrededor de un pH fisiológico (p. ej., entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,0, mas preferente entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5). Los agentes de enolización incluyen un material catiónico, preferiblemente un catión divalente como el calcio o el magnesio o, por ejemplo, un aminoácido catiónico como la ornitina o la lisina. Los cationes divalentes se introducen en la formulación farmacéutica en forma de una sal, por ejemplo como cloruro de calcio o cloruro de magnesio. El agente de enolización en la composición de la invención se encuentra a una concentración apropiada para inducir la enolización de la funcionalidad alfa-aceto de la cantidad de agente éster activo en la composición administrada, por ejemplo, de 0,0 a 4,0 de equivalentes molares relativos al éster.

La dosis precisa a emplear en la formulación de un agente terapéutico dependerá de la ruta de administración y de la seriedad de las condiciones, y se decidirá a criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden ser extrapoladas a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de los sistemas de pruebas *in vitro* o en animales.

Según el método, un éster de un ácido alfa-acetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-acetoalcanoico pueden ser administrados a un sujeto a través de la ruta apropiada, ya sea solo o en combinación con otro medicamento. Una cantidad eficaz de un éster de un ácido alfa-acetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-acetoalcanoico son administradas. Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado, bajo las condiciones de administración, como una cantidad suficiente para tratar (terapéutica o profilácticamente), evitando, mejorando o retardando la aparición de los síntomas de la hepatitis alcohólica.

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden ser administradas a través de una variedad de rutas, por ejemplo, ruta de administración oral, dietética, tópica, intravenosa, intramuscular o por inhalación (p. ej., intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales), en dependencia del agente y enfermedad o condición a tratarse, mediante el uso de/usando métodos de rutina en sustancias vehículo inertes fisiológicamente aceptables. Otros métodos de administración convenientes pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas pueden ser administradas en una formulación de liberación sostenida usando un polímero biocompatible y biodegradable, o por medio de sumministrazione *in situ* usando micelas, geles lisosomas o soluciones buffer. Preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada en forma de infusión a una concentración, por ejemplo, de 10 mM a 200 mM, preferentemente de 20 mM a 90 mM del agente

activo, en una proporción de 1 mg/kg de peso corporal al día a 200 mg/kg de peso corporal al día, en una solución buffer según lo que se describe en este documento. De mayor preferencia, la composición farmacéutica se administra en forma de una infusión a una concentración de aproximadamente entre 26 y 30 mM del agente activo en una dosis entre 100 mg/kg de peso corporal al día y 150 mg/kg de peso corporal al día del ácido alfa-acetoalcanoico en una solución buffer. En forma de bolo, el agente activo puede ser administrado en una dosis similar, por ejemplo, de 1 mg/kg de peso corporal al día a 200 mg/kg de peso corporal al día de agente activo, donde la dosis se divide en partes alícuotas y se suministra de 1 a 4 veces al día (para una dosis total desde 1 mg/kg de peso corporal al día hasta 200 mg/kg de peso corporal al día), con la concentración del agente activo ajustada en consecuencia. La dosificación óptima y los modos de administración pueden ser fácilmente determinados por medio de protocolos convencionales.

Las alfa-acetoamidas y los alfa-acetoésteres que se muestran en este documento para el tratamiento de la hepatitis pueden ser administrados como monoterapia (es decir, solos y como agentes terapéuticos únicos que se usen para tratar la hepatitis) o en combinación con otros agentes farmacéuticos, por ejemplo, agentes usados en el tratamiento de la hepatitis como el interferón alfa y la ribavirina. Además, las alfa-acetoamidas y los alfa-acetoésteres pueden ser administrados en combinación con agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antivirales, antimicóticos, antihistamínicos y otros de este tipo.

Ejemplos de agentes antimicrobianos apropiados incluyen medicamentos con sulfa, penicilinas (p. ej., bencil penicilina, P-hidroxi-bencil penicilina, 2-pentenil-penicilina, N-heptil-penicilina, fenoximetil-penicilina, feneticilina, metecilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, ciclacilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, azlocilina, mezclocilina, mecilinamo, amdinocilina), cefalosporina y los derivados de la misma (e.g. cefalocina, cefapirina, cefacetil, cefzolona, caflexina, cefandina, cefadroxil, cefamandol, cefuroxima, ceforanida, cefoxitina, cefotetan, cefaclor, cefotaxima, ceftizoxima, ceftioxona, ceft*azidima, moxalactam, cefoperozona, cefixima, ceftibuteno y cefprozil), ácido oxolinico, amifloxacina, temafloracina, ácido nalidixico, ácido piroimidico, ciprofloxacina, cinoxacina norfloxacina, perfloxacina, rosaxacina, ofloxacina, enoxacina, ácido pipemídico, sulbactam, ácido clavulánico, 6-ácido bromopenicilánico, ácido 6-cloropenicilánico, ácido 6-acetilmetileno-penicilánico, cefoxazol, sultampicilina, hidrato de formaldehído-éster de adinocilina y sulbactam, tazobactam, aztreonam, sulfazetina, isosulfazetina, norcardinas, fenilacetamidometilfosfonato de m-carboxifenilo, clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina y minociclina.

Ejemplos de agentes antiinflamatorios apropiados incluyen ejemplos de los NSAIDs apropiados que incluyen derivados del ácido aminoarilcarboxílico (p. ej., ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato y ácido tolfenámico), derivados del ácido arilacético (p. ej., acematinina, alclofenaco, amfenaco, bufexamac, caprofen, cinmetacina, clopiraco, diclofenaco, diclofenaco de sodio, etodolaco, felbinaco, fenclofenaco, fencloraco, ácido fenclóxico, fenoprofeno, fentiazaco, flubiprofeno, glucametacina, ibufenaco, ibuprofeno, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, ketoprofeno, lonazolaco, ácido metiazínico, naproxeno, oxametacina, proglumrtacina, sulindac, tenidap, tiramida, tolectina, tolmetina, zomax y zomepiraco), derivados de ácido arilbutírico (p. ej., bumadizona, butibufeno, fenbufeno y xenbucina), ácidos arilcarboxílicos (p. ej., clidanaco, ketorolaco y tinoridina), derivados de ácidos arilpropiónicos (p. ej., alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, mioprofeno, naproxeno, ozaprozina, piketoprofeno, pioprofeno, pranoprofeno, ácido protinizínico, suprofeno y ácido tiaprofénico), pirazoles (p. ej., difenamizola y epirizola), pirazonas (p. ej., apazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propifenazona, ramifenazona, suxibuzona y tiazolinobutazona), derivados del ácido salicílico (p. ej., acetaminosalol, 5-ácido aminosalicílico, aspirina, benorilato, bifenil aspirina, bromosaligenina, acetilsalicilato de calcio, diflunisal, etersalato, fendosal, flufenisal, ácido gentísico, salicilato de glicol, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato fenilo, ácido 2-fosfonoxibenzoico, salacetamida, ácido salicilamida-o-acético, ácido salicílico, ácido saliciloil-salicílico, ácido salicilsulfúrico, salsalato y sulfasalazina), tiazinecarboxamidas (p. ej., droxicam, isoxicam, piroxicam y tenoxicam), ácido α -acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazaco, benzidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, quetorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, nabumetona, nimesulide, orgoteína, oxaceprol, parnilina, perisoxal, pifoxime, piroxicam, proquazona y tenidap.

Ejemplos de analgésicos adecuados incluyen un opioide (p. ej., morfina), un inhibidor de COX-2 (p. ej., Rofecoxib, Valdecocixib y Celecoxib), salicilatos (p. ej., ASPIRINA, trisalicilato de magnesio de colina, salsalato, difunisal y salicilato de sodio), derivados de ácido propiónico (p. ej., fenoprofeno cálcico, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y naproxeno sódico), derivados de ácido indoleacético (p. ej., indometacina, sulfindaco, etodalaco y tolmetina), fenamatos (p. ej., ácido mefenámico y meclofenamato), derivados de benzotiazina u oxicams (p. ej., móbico o piroxicam) o ácido pirrolacético (p. ej., ketorolaco).

Ejemplos de agentes antivirales adecuados incluyen inferno gamma, ribavirina, fialuridina, aciclovir, ganciclovir, penciclovir, famciclovir, PMEa, bis-POM PMEa, lamivudina, citaleño, oxetanocinas, oxetaonocinas carbocíclicas, foscarnet, fillatus amarus, n-aceti-L-cisteína, destruxina B, hipericina, aucubina y N-butildeoxinojirimicina.

Ejemplos de antifúngicos adecuados incluyen anfotericina B, nistatina, itraconazol, fluconazol, ketoconazol, miconazol, flucitosina y dapsona.

La presente invención será ilustrada a continuación mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Inducción de Lesiones hepáticas agudas mediante un ratón modelo de ingestión excesiva de alcohol

A todos los animales se les suministró comida de laboratorio estándar y se les permitió aclimatarse durante 7 días. Después de la aclimatación, se les indujo lesiones hepáticas agudas usando un modelo de ingestión excesiva de alcohol originalmente descritas por Carson EJ, Pruett SB. "Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol", *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20: 132-138 (1996), y posteriormente modificado por Zhou Z, *et al.* "Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress", *Exp. Biol. Med.* 227: 214-222 (2002) y Zhou Z., *et al.*, "Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury" *Am. J. Pathol.* 160: 2267-2274 (2002), cuyas teorías incluiremos en la presente en su totalidad como referencia. Este modelo fue designado para alcanzar niveles de alcohol en sangre, efectos de comportamiento y cambios fisiológicos comparables con los del consumo de alcohol excesivo. Los ratones fueron divididos en tres grupos (n = 8-10 cada uno). Los ratones en el grupo de la solución de Ringer de Lactosa (RLS) recibieron etanol (5 g/kg de peso corporal) cada 12 horas hasta un total de tres dosis. El etanol fue administrado por cebadura en forma de una solución acuosa al 25% (w/v). Comenzando una hora después de la última dosis de etanol, se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) 0,4 ml de RLS cada seis horas por un total de tres dosis. A los ratones en el grupo de la solución de Ringer de piruvato de etilo (REPS) se les suministraron dosis de alcohol según el mismo cronograma que el de los animales en el grupo RLS. Posteriormente, sin embargo, en lugar de ser tratados con RLS, estos ratones recibieron tres inyecciones i.p. de REPS, que fueron formuladas según lo descrito previamente (Yang R, *et al.*, "Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283:G212-G22 (2002), incorporadas en la presente como referencia. Cada dosis de REPS suministró 40 mg/kg de EP en 0,4 ml de una solución que también contenía 130 mM de NaCl, 4 mM KCl y 2,7 mM de CaCl₂. Se les inyectó REPS cada 6 horas, comenzando una hora después de la administración de la última dosis de etanol. Los ratones del grupo control (CONT) no fueron cebados con etanol, sino que recibieron un volumen igual de una solución de maltosa isocalórica. Los ratones en este grupo no fueron tratados con RLS o REPS. Diecinueve horas después de la última dosis de etanol o maltosa, todos los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (90 mg/kg i.p.), y se llevaron a cabo los siguientes procedimientos: se realizó un cultivo de un segmento del fleon para determinar la permeabilidad de la mucosa; se cultivó el complejo del nódulo linfático mesentérico (MLN) (por sus siglas de la expresión inglesa *Mesenteric lymph node*) para medir la dislocación bacteriana; se aspiró sangre del corazón para medir la concentración en plasma de alanina aminotransferasa (ALT); y se extrajo una porción del hígado para determinar la activación de NF- κ B usando la (EMSA) (por sus siglas de la expresión inglesa: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, la expresión TNF ARNm usando RT-PCR semicuantitativo e histopatología. El tejido hepático que sería usado para EMSA o RT-PCR fue inmediatamente congelado a -80°C, mientras que el tejido para la histopatología fue inmediatamente fijado en formol al 10%.

Ejemplo 2

La REPS inhibe la respuesta inflamatoria en un ratón modelo de hepatitis alcohólica según los estimados obtenidos por la activación de TNF- α

La expresión hepática aumentada de TNF- α ha estado implicada en la patogénesis de la lesión hepática temprana inducida por alcohol en ratones (Yin M. *et al.*, "Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice", *Gastroenterology* 117: 942-952 (1999)).

Tras la inducción de hepatitis aguda según lo descrito en el Ejemplo 1, el ARN total fue extraído de las muestras de tejida hepático cultivadas con cloroformo y reactivos TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) según las instrucciones del fabricante. El ARN total fue tratado con DNaseFree® (Ambion, Houston, TX) según las instrucciones del fabricante, usando 10 unidades de DNase 1/10 μ g RNA. Dos μ g del ARN total fueron transcritos a la inversa en una reacción en un volumen de 40 μ l que contenía 0,5 μ g de oligo(dT)₁₅ (Promega), 1 mM de cada dNTP, 15 U AMV transcriptasa inversa (Promega), y 1 U/PL del inhibidor de RNAsina ribonucleasa recombinante (Promega) en 5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, Q.1% Tritón X-100 (pH = 8,0). Las mezclas de reacción fueron preincubadas a 21°C durante 10 min antes de la síntesis del ADN. Las reacciones de la transcriptasa inversa (RT) (por las siglas de la expresión inglesa, *Reverse Transcriptase*) se realizaron durante 50 min a 42°C y fueron calentadas hasta 95°C durante 5 min para completar la reacción. Las mezclas de reacción (50 μ L) para PCR fueron unidas usando 5 μ L de la plantilla de cADN, 10 unidades de AdvanTaq Plus ADN Polimerasa (Clontech, Palo Alto, CA), 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂ y 1,0 μ M de cada cebador en un búfer 1 x de AdvanTaq Plus™ para PCR. Las reacciones por PCR se realizaron usando un *Thermocycler* modelo 480 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Se inició la replicación del cADN con 5 min de desnaturalización a 94°C. Las condiciones de la PCR para amplificar el cADN para TNF e IL-6 fueron según se describirá a continuación: desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 61°C durante 45 s, y polimerización a 72°C durante 45 s. Se llevó a cabo la replicación de cADN mediante la desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 58°C durante 1 min y polimerización a 72°C durante 45 s. Para asegurar que la replicación tuviera lugar en un intervalo lineal, determinamos empíricamente que 25, 22; 20 y 33 eran la cantidad de ciclos óptima para cADN TNF e IL-6 preparadas a partir de 264,7 extractos celulares RAW (originales), para cADN iNOS preparadas a partir de 264,7 extractos celulares RAW, y cADN TNF de extractos de tejido hepático preparados, respectivamente.. Después del último ciclo de replicación, las muestras fueron incubadas a 72°C durante 10 min y posteriormente se mantuvieron a 4°C. Los cebadores 5' y 3' para iNOS fueron CAC CAC AAG GCC ACA TCG GAT T (SEQ ID NO: 1) y CCG ACC

TGA TGT TGC CAT TGT T (SEQ ID NO: 2), respectivamente (Invitrogen, Carlsbad, CA); la longitud esperada del producto era 426 bp. Los cebadores 5' y 3' para TNF fueron GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C (SEQ ID NO: 3) y ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G (SEQ ID NO: 4), respectivamente; la longitud esperada del producto era 307 bp. Las cebadores 5' y 3' para IL-6 fueron TTC CATCCA GTT GCC TTC TTG G (SEQ ID NO: 5) y TTC TCA TTT CCA CGA TTT CCC AG (SEQ ID NO: 6), respectivamente; la longitud esperada del producto era 174 bp. Se replicó el ARN ribosomal 18S para verificar cargas iguales. Para esta reacción, las cebadores 5' y 3' fueron CCC GGG GAG GTA GTG ACG AAA AAT (SEQ ID NO: 7) y CGC CCG CTC CCA AGA TCC AAC TAC (SEQ ID NO: 8), respectivamente; la longitud esperada del producto era 209 bp. Diez microlitros de cada reacción PCR fueron sometidos a la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, escaneados en un dispositivo *NucleoVision imaging workstation* (NucleoTech, San Mateo, CA), y fueron cuantificados usando el método *GelExpert release 3, 5*.

Según se presentó en la Fig. 1, la reacción RT-PCR semicuantitativa mostró que la expresión hepática de TNF- α ARNm fue marcadamente aumentada cuando los ratones fueron tratados con RLS durante 1 h, después de la última de las tres dosis de 5 g/kg de alcohol administradas entericamente durante un periodo de 12 h. Si los ratones fueron tratados con REPS en lugar de RLS, no se observó una sobreexpresión de la replicación de la expresión hepática de TNF- α ARNm.

Ejemplo 3

La REPS inhibe la respuesta inflamatoria en un ratón modelo de Hepatitis Alcohólica según los estimados obtenidos por la activación de TNF- α

Se conoce que la administración aguda o subaguda de etanol favorece la activación hepática del factor de transcripción proinflamatorio, NF- κ B (Nanji A.A. *et al.* "Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappaB dependent genes", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2002); Kono H. *Et al.*, "Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G1005-G1012 (2002); Spitzer J.A. *et al.* "Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells *in vivo*" *Front. Biosci.* 7: a99-a108 (2002)). Por consiguiente, EMSA fue usado para determinar si el tratamiento con REPS regularía la activación de NF- κ B en nuestro modelo de ratón por un consumo excesivo de alcohol.

Tras la inducción de hepatitis aguda según lo descrito en el Ejemplo 1, se prepararon extractos nucleares, se homogenizaron muestras de tejidos hepáticos con T-PERTM (Pierce, Rockford, IL), usando una proporción de tejido de 1:20 para el reactivo de preparación de la muestra, según lo indicado en las instrucciones de los productores. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 5 min hasta reducirlos a fragmentos de restos de tejidos. Las partículas sobrenadantes fueron recogidas y congeladas a -80°C. Se determinó una concentración de proteína nuclear usando un ensayo Bradford comercialmente disponible (Bio-Rad, Hercules, CA).

El EMSA para los enlaces nucleares NF- κ B fue realizado usando una sonda duplex de oligonucleótidos basado en el sitio de enlace de NF κ B por encima del promotor mudo de iNOS según lo descrito previamente (Yang R, *et al.*, "Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283: G212-G222 (2002)). La secuencia de la doble cadena oligonucleótida NF- κ B fue de la siguiente manera: en el sentido 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (SEQ ID NO: 9); antisentido: 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5' (SEQ ID NO: 10) (Promega; Madison, WI). Los oligonucleótidos fueron marcados en su extremo con γ -32P trifosfato de adenosina (New England Nuclear; Boston, MA) usando polinucleótido quinasa T4 (Promega; Madison, WI). Se incubaron a temperatura ambiente 6 μ g de proteínas nucleares con una sonda de NF- κ B marcado con γ -32P en 4 μ l de búfer de reacción 5X (65 mM HEPES, 325 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,7 mM EDTA, 40% glicerol, pH = 8.0) en presencia de 2 μ g de poliDI-DC durante 20 min, siendo el volumen total de la mezcla de la reacción de enlace 20 μ l. La mezcla de la reacción de enlace fue sometida a electroforesis en geles para electroforesis de poliacrilamida no desnaturizada al 4%. Después de la electroforesis, los geles se secaron y se expusieron a una película X-Omat de Kodak a -80°C. La especificidad de la reacción de enlace ha sido previamente verificada mediante ensayos de competición y Super-shift.

Según la evaluación por electroforesis en gel, hubo un aumento marcado en la activación de NF- κ B posterior a la inducción de hepatitis en ratones tratados con RLS. Sin embargo, el tratamiento de ratones con REPS después de ingestión de alcohol redujo la regulación del enlace NF- κ B-ADN.

Ejemplo 4

La REPS previene la peroxidación de los lípidos en un ratón modelo de Hepatitis Alcohólica según los estimados obtenidos por la activación de TNF- α

La intoxicación aguda por alcohol ha sido asociada a la peroxidación de los lípidos tanto en humanos como en roedores. Incluso, en ratas sometidas a shock hemorrágico y resucitación, el tratamiento con EP disminuye la peroxidación hepática de los lípidos. En consonancia, buscamos determinar si un efecto beneficioso similar del tratamiento con EP se observaría en nuestro modelo de ratones con ingestión excesiva de alcohol.

Tras la inducción de la hepatitis aguda según lo descrito en el Ejemplo 1, se llevó a cabo el ensayo para la peroxidación de lípidos según lo descrito en Tawadrous Z.S., *et al.* "Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats", *Shock* 17: 473-477 (2002), adjunto al presente documento como referencia en su totalidad. En resumen, después de disolverse las muestras de tejido, se añadieron 2 ml de búfer de fosfato (0,05 M, pH = 7,4) a 1,0 g de tejido. El tejido fue homogenizado. Se añadieron ácido tricloroacético (solución v/v al 20%; 2,5 ml) y ácido tiobarbitúrico (solución p/v al 0,67%; 1,0 ml) a 0,5 ml de tejido homogenizado. El color del pigmento de ácido tiobarbitúrico fue desarrollado mediante la incubación de una mezcla en baño maría a 100°C durante 30 min. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente por inmersión en agua del grifo, se añadieron 4 ml de n-butanol y se agitó vigorosamente. Después de la centrifugación, se determinó la absorbancia de la capa de butanol a 535 nm. Se ensayaron las muestras por duplicado y se promediaron los resultados. Se usó 1,1,3,3-tetratoxipropeno para generar una curva estándar. Los resultados fueron expresados en nanomoles de malondialdehído (MDA) por gramo de tejido.

La concentración media de MDA en el tejido fue significativamente mayor en el grupo RLS, que en el grupo control (Fig. 2). Sin embargo, el nivel medio de este marcador de la peroxidación hepática de lípidos fue significativamente más bajo en el grupo de REPS que en el grupo de RLS, indicando la mejoría de la lesión del hígado en los ratones tratados con REPS.

Ejemplo 5

Evidencia de la inducción del daño hepatocelular en un ratón modelo de Hepatitis Alcohólica según los estimados obtenidos por la evaluación de la alanina amino transferasa en plasma

Se obtuvieron por punción cardíaca 200 µl de sangre y se colocaron en un tubo de centrifugación de 0,5 ml en hielo. Se centrifugaron las muestras a 5,000 g durante 3 min. El suero fue recogido y sometido a ensayo para determinar la alanina amino transferasa (ALT) usando un sistema de ensayo automatizado.

Según se muestra en la Fig. 3, el plasma medio de la concentración ALT 19 horas después de la última dosis de alcohol o de la solución de maltosa fue significativamente mayor en el grupo de RLS, que en el grupo control (CONT). Sin embargo, el nivel medio de circulación de este marcador bioquímico de lesión hepatocelular fue significativamente menor en el grupo de REPS que en el grupo de RLS.

Ejemplo 6

El tratamiento con PERS previene el daño hepatocelular en un ratón modelo de Hepatitis Alcohólica según lo evidenciado por el examen histológico

Se seccionó tejido hepático preparado fijado con formalina, se tiñó con hematoxilina y eosina y se examinó usando microscopia de luz con un aumento a 600x y 1000x.

El examen mostró que en el grupo RLS, las secciones hepáticas revelaron amplia evidencia de cambios adiposos en los espacios portal y en partes de los lóbulos. Bajo un alto aumento, el material hialino de glóbulos rojos fue evidente en los hepatocitos y la necrosis de fragmentos aislados de hepatocitos fue aparente. En contraste, en el grupo de REPS los cambios adiposos y la necrosis en los lóbulos se redujeron considerablemente y el material hialino no fue evidente.

Los resultados de los Ejemplos 2-5 están presentados como promedios $\pm$ SEM. Las diferencias en CFU entre grupos fueron analizadas usando un test-U Wilcoxon. Otros datos continuados fueron analizados usando un test-t de estudiantes o análisis de varianza seguido por un test de LSD de Fisher, según lo conveniente. Los valores $P < 0,05$ fueron considerados significativos. Se presentan los resúmenes estadísticos para obtener resultados de densitometría a partir de los estudios usando RT-PCR para estimar la expresión de iNOS, TNF- α y IL-6 ARNm, pero estos resultados no estuvieron sometidos al análisis estadístico debido a que el método empleado era solamente semicuantitativo y los tamaños de las muestras ($n = 3-4$) fueron pequeños. (Ulloa L., *et al.* "Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12351-12356 (2002); Sappington P.L., *et al.* "Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated Caco-2 enterocytic monolayers", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 464-476 (2003); Yang R., *et al.* "Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene express in mice subjected to hemorrhagic shock", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283:G212-G22 (2002)).

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante fue hecha solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aún cuando se tuvo gran cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO desconoce toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 02074301 A
- US 60478637 B
- WO 0124793 A
- US 60499552 B
- WO 03088955 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- **AKRIVIADIS** *et al.* Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, 1637-1648
- **AKRIVIADIS** *et al.* Failure of colchicines to improve short-term survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*, 1990, vol. 99, 811-818
- **UESUGI** *et al.* *Journal of Immunology*, 2002, vol. 168 (6), 2963-2969
- **NAVEAU** *et al.* *The American Journal of Gastroenterology*, 2001, vol. 96 (12), 3361-3367
- **NANJI** AA. *Alcohol*, 2002, vol. 27 (1), 13-15
- **YANG** *et al.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, vol. 283, G212-221
- **ANTOSIEWICZ** *et al.* *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, vol. 29 (1), 528
- **CARSON** EJ; **PRUETT** SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1996, vol. 20, 132-138
- **ZHOU** Z *et al.* Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp. Biol. Med.*, 2002, vol. 227, 214-222
- **ZHOU** Z. *et al.* Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. *Am. J. Pathol.*, 2002, vol. 160, 2267-2274
- **YANG** R *et al.* Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002, vol. 283, G212-G22
- **YIN** M. *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*, 1999, vol. 117, 942-952
- **NANJI** A. A. *et al.* Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappaB dependent genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002
- **KONO** H. *et al.* Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002, vol. 280, G1005-G1012
- **SPITZER** J.A. *et al.* Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells *in vivo*. *Front. Biosci.*, 2002, vol. 7, a99-a108
- **TAWADROUS** Z.S. *et al.* Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock*, 2002, vol. 17, 473-477
- **ULLOA** L *et al.* Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 12351-12356
- **SAPPINGTON** P.L. *et al.* Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated Caco-2 enterocytic monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, vol. 304, 464-476
- **YANG** R. *et al.* Ethyl pyruvate modulates inflammatory, gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002, vol. 283, G212-G22

REIVINDICACIONES

1. El uso de un éster de ácido alfa-cetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-cetoalcanoico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hepatitis en un sujeto.

2. El uso de la Reivindicación 1 donde la hepatitis es una hepatitis alcohólica aguda.

3. El uso de la Reivindicación 1 donde la hepatitis es una hepatitis alcohólica crónica.

4. El uso de la Reivindicación 1 donde la hepatitis es causada por un agente químico o un medicamento.

5. El uso de la Reivindicación 1 donde dicho medicamento es para tratar la hepatitis profilácticamente.

6. El uso de la Reivindicación 1, donde se usa un éster de un ácido alfa-cetoalcanoico y donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de ácido alfa-cetoalcanoico C_3 -Cede cadena lineal o ramificada.

7. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de alquilo, aralquilo, alcoxialquilo, carbalcoxialquilo o acetoxialquilo.

8. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es seleccionado del grupo consistente en piruvato de etilo, piruvato de propilo, piruvato de carboximetilo, piruvato de acetoximetilo, piruvato de carbetoimetimetilo y piruvato de etoximetilo.

9. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es seleccionado del grupo consistente en alfa-ceto-butirato de etilo, alfa-ceto-pentanoato de etilo, alfa-aceto-3-metil-butirato de etilo, alfa-aceto-4-metil-pentanoato de etilo y alfa-aceto-hexanoato de etilo.

10. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de etilo.

11. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de ácido pirúvico.

12. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es piruvato de etilo.

13. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico está contenido en una solución salina isotónica de Ringer.

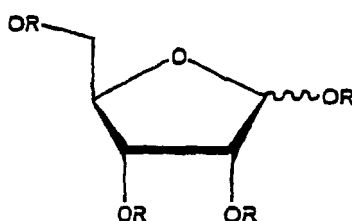
14. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico está contenido en un vehículo fisiológicamente aceptable, el cual adicionalmente contiene lactato.

15. El uso de la Reivindicación 14, donde dicho vehículo fisiológicamente aceptable también contiene un agente de enolización fisiológicamente aceptable.

16. El uso de la Reivindicación 14, donde dicho vehículo fisiológicamente aceptable es una solución salina isotónica de Ringer conteniendo un ión de potasio y/o un ión de sodio.

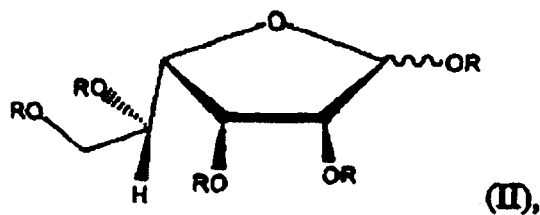
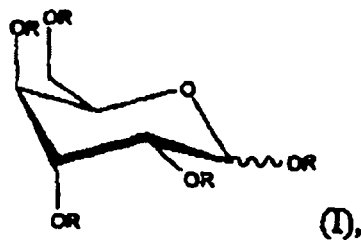
17. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de glicerilo.

18. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de ribosilo representado por la fórmula siguiente:



donde cada R es independientemente H, un grupo alfa-cetoalcanoato o un acilo C_1 - C_3 y al menos una R es un grupo alfa-cetoalcanoato.

19. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de glucosilo descrito por las fórmulas (I) o (II):



donde cada R es independientemente H, un grupo alfa-cetoalcanoato o acilo C_1-C_3 y al menos una R es un grupo alfa-cetoalcanoato.

20. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un éster de dihidroxiacetona.

21. El uso de la Reivindicación 6, donde dicho éster de un ácido alfa-cetoalcanoico es un tioléster.

22. El uso de la Reivindicación 21, donde una porción tiol de dicho tioléster es cisteína u homocisteína.

23. El uso de la Reivindicación 1 donde se usa una amida de un ácido alfa-cetoalcanoico.

24. El uso de la Reivindicación 23, donde dicha amida de un ácido alfa-cetoalcanoico es una piruvamida.

25. El uso de la Reivindicación 23, donde dicha amida es una amida de aminoácido de un ácido alfa-cetoalcanoico.

26. El uso del piruvato de etilo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hepatitis alcohólica.

27. El uso de la Reivindicación 26 donde la hepatitis alcohólica es una hepatitis alcohólica aguda.

28. El uso de la Reivindicación 26 donde la hepatitis alcohólica es una hepatitis alcohólica crónica.

29. Un éster de un ácido alfa-cetoalcanoico o una amida de un ácido alfa-cetoalcanoico para el uso en el tratamiento de hepatitis en un sujeto.

30. Un éster según la Reivindicación 29, donde se usa un éster de un ácido alfa-cetoalcanoico y dicho éster es piruvato de etilo.

31. Un éster según la Reivindicación 29, donde se usa un éster de un ácido alfa-cetoalcanoico C_3-C_8 de cadena lineal o ramificada y dicho éster está contenido en solución salina isotónica de Ringer.

32. Piruvato de etilo para uso en el tratamiento de la hepatitis alcohólica.

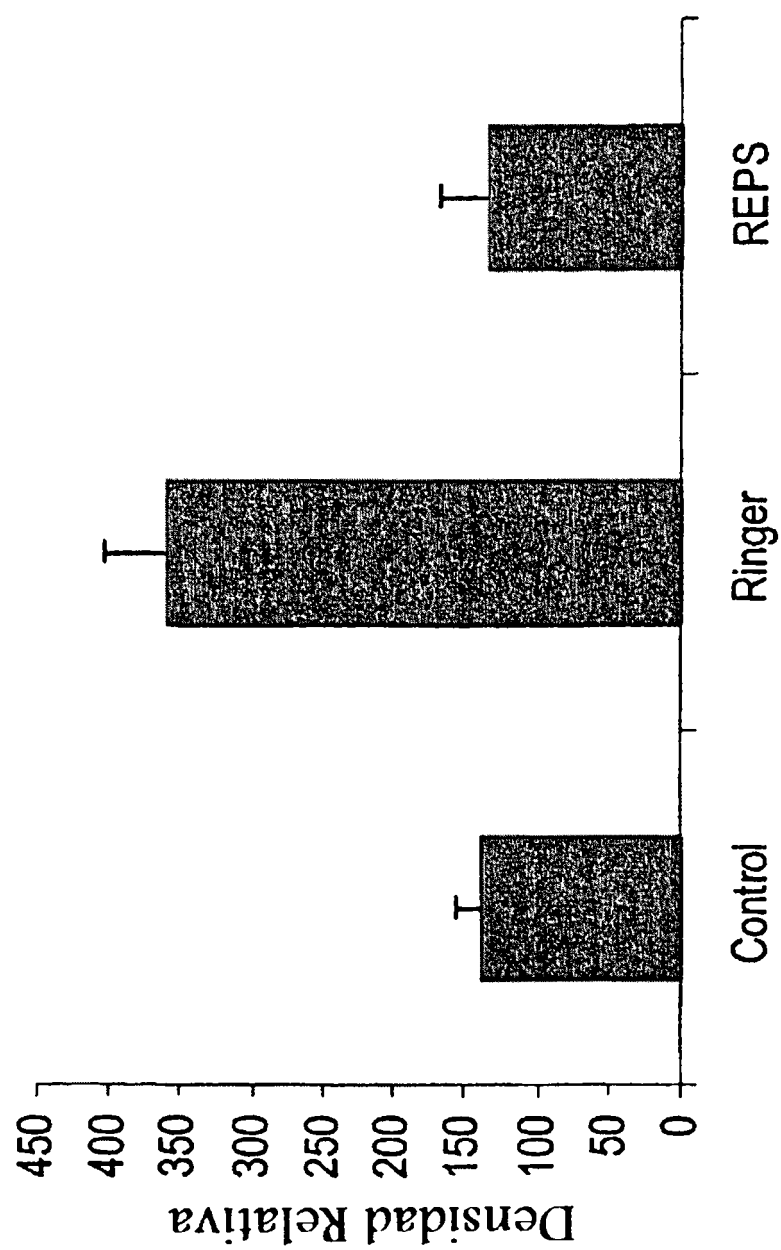


FIG. 1

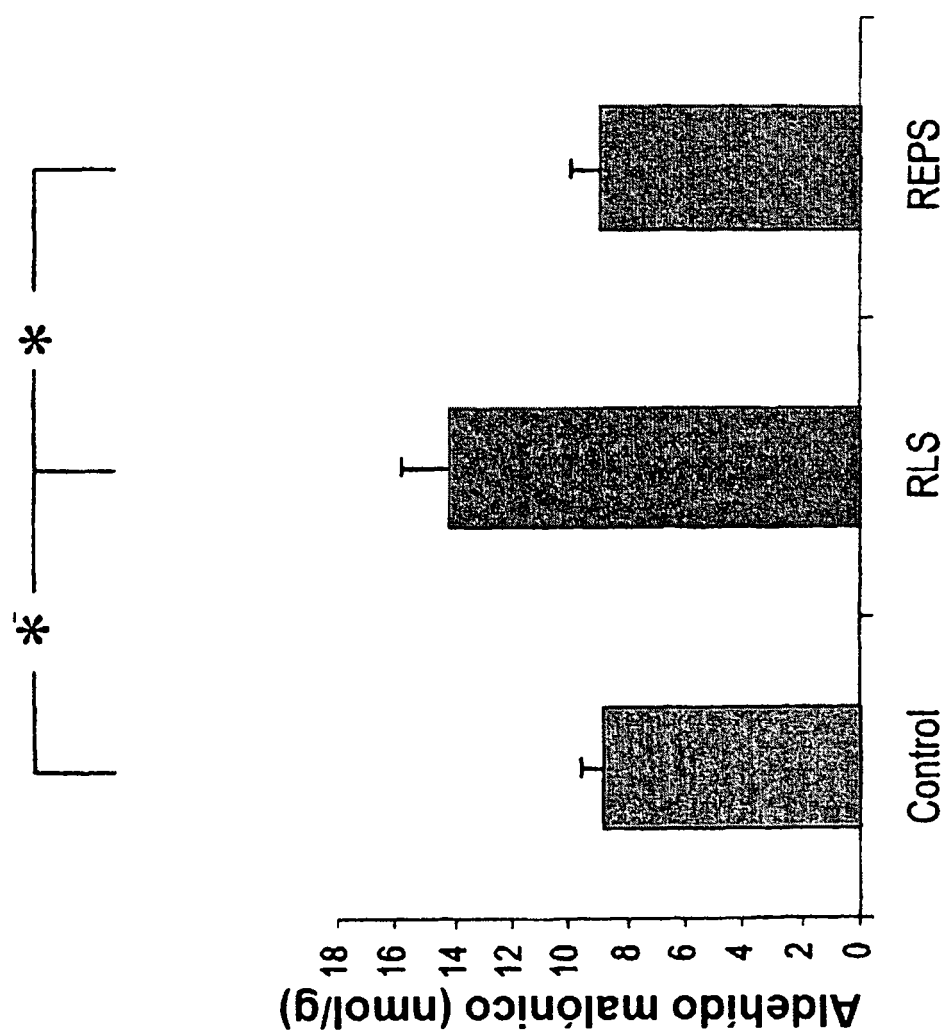


FIG. 2

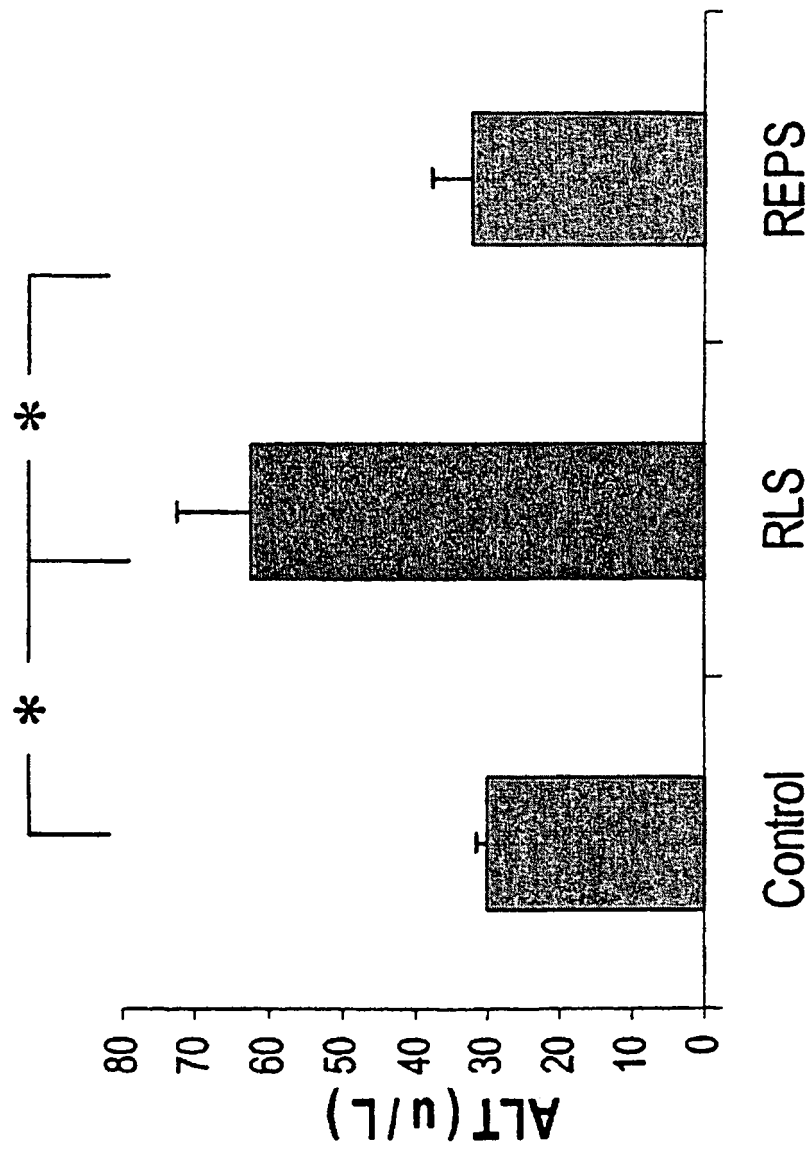


FIG. 3

ES 2 310 755 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Univeristy of Pittsburg of the Commonwealth System of Higher Education Fink, Mitchell P. Yang, Runkuan	
	<120> Método para el tratamiento de la hepatitis alcohólica	
10	<130> 3403.1002004	
	<150> 60/478,637	
	<151> 2003-06-13	
15	<150> 60/499,552	
	<151> 2003-09-02	
20	<160> 10	
	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0	
	<210> 1	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador para iNOS	
	<400> 1	
35	caccacaagg ccacatcgga tt	22
	<210> 2	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador para iNOS	
	<400> 2	
50	ttgttaccgt tgtagtccag cc	22
	<210> 3	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador para TNF	
	<400> 3	
65	ggcaggtcta ctttgagtc attgc	25

ES 2 310 755 T3

	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para TNF	
10	<400> 4	
	ggcttaagtg accteggagc ttaca	25
15	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para IL-6	
25	<400> 5	
	ttccatccag ttgccttctt gg	22
30	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para IL-6	
40	<400> 6	
	gaccctttag cacctttact ctt	23
45	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para 18S ARN ribosomal	
55	<400> 7	
	cccgaggagg tagtgacgaa aaat	24
60	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 310 755 T3

	<220>		
	<223> Cebador para 18S ARN ribosomal		
5	<400> 8		
	catcaaccta gaaccctcgc ccgc		24
10	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Hebra en sentido de los oligonucleótidos NF-KB de hebra doble		
20	<400> 9		
	agttgagggg actttcccag gc		22
25	<210> 10		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Hebra en sentido de oligonucleótido NF-KB de hebra doble		
35	<400> 10		
	gcctgggaaa gtcccctcaa ct		22
40			
45			
50			
55			
60			
65			