

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 820**

51 Int. Cl.:

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/194 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2017 PCT/IB2017/054966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18033856**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2017 E 17758637 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3500311**

54 Título: **Polimerosomas de gradiente de pH transmembrana y su uso en la eliminación del amoníaco y sus análogos metilados**

30 Prioridad:

16.08.2016 EP 16184371

22.11.2016 EP 16200067

13.12.2016 EP 16203817

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

18.03.2021

73 Titular/es:

**ETH ZURICH (100.0%)
Raemistrasse 101/ETH Transfer
8092 Zurich, CH**

72 Inventor/es:

**LEROUX, JEAN-CHRISTOPHE;
MATOORI, SIMON y
SCHMIDT, AARON CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 812 820 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polimerosomas de gradiente de pH transmembrana y su uso en la eliminación del amoníaco y sus análogos metilados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polimerosomas de gradiente de pH transmembrana y su uso en la eliminación de amoníaco y sus análogos metilados (*p. ej.*, trimetilamina (TMA)). Más específicamente, la presente invención se refiere a polimerosomas que comprenden copolímeros en bloque anfífilicos no biodegradables y sus entéricos para uso (*p. ej.*, oral) o tópico en la captación de amoníaco y/o sus análogos metilados (*p. ej.*, TMA) para el tratamiento de *p. ej.*, hiperamonemia, trimetilaminuria, enfermedades cardiovasculares y/o crónicas renales.

Antecedentes de la invención

15 El amoníaco (NH₃) y sus análogos metilados (*p. ej.*, TMA (N (CH₃)₃) poseen propiedades fisicoquímicas similares (*p. ej.*, bajo peso molecular, pKa y logP similares, etc.). Ambos se producen, principalmente, en el tracto gastrointestinal y su presencia en exceso en el cuerpo está asociada con varios trastornos y síntomas del mismo.

20 Amoníaco

El amoníaco (NH₃) es un metabolito endógeno neurotóxico el cual se acumula en pacientes con insuficiencia hepática (*p. ej.*, debido a cirrosis hepática, falla hepática aguda, derivación portosistémica, errores congénitos del metabolismo del amoníaco) (Matoori y Leroux ADDR 2015; 90:55-68).

25 Los altos niveles de amoníaco en la sangre (hiperamonemia) se asocian con la encefalopatía hepática, una afección neuropsiquiátrica con manifestaciones agudas y crónicas graves que potencialmente conducen a la muerte (Vilstrup y otros. *Hepatology* 2014; 60:715-735). La encefalopatía hepática provocó >20 000 hospitalizaciones en 2009 y costos de >7b USD solo en los EE.UU. (Stepanova y otros, *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10:1034-1041.e1; Poordad, *Alim Pharmacol Therap* 2006; 25: 3-9). El costo hospitalario por hospitalización individual debido a la encefalopatía hepática aumentó desde 22'511 USD en el 2004 hasta 37'398 USD en el 2010. (Neff y otros. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2013; 5:143-152).

Una de las fuentes principales de amoníaco en el cuerpo son las bacterias productoras de ureasa en el colon (Matoori y Leroux *supra*). Por lo tanto, las guías de práctica clínica para la encefalopatía hepática recomiendan, como terapia de primera y segunda línea para la encefalopatía hepática, el disacárido no absorbible lactulosa (un laxante de uso común) y el antibiótico rifaximina (*p. ej.*, Xifaxan™) que tratan la generación y absorción de amoníaco colónico de una manera bastante inespecífica (Vilstrup y otros. *supra*). Ambas terapias, disponibles por vía oral, no pueden controlar los síntomas y la progresión de la encefalopatía hepática en una gran fracción de la población de pacientes y muchos pacientes bajo estas terapias sufren reacciones adversas tales como diarrea (Vilstrup y otros. *supra*; Rose *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012; 92: 321-331; Leevy y otros, *Dig Dis Sci* 2007; Mullen y otros. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 1390-1397.e2).

Un adsorbente de carbono esférico administrado por vía oral (AST-120, Kremezin®) se describió también para secuestrar amoníaco y mejorar los síntomas asociados con la hiperamonemia en un modelo animal de encefalopatía hepática (Bosoi y otros. *Hepatology* 2011; 53: 1995-2002). El amoníaco se adsorbe mecánicamente a las micropartículas de AST-120 en el intestino y posteriormente se excreta *a través* de las heces. En un ensayo clínico con pacientes con encefalopatía hepática, el tratamiento con AST-120 no condujo a una mejoría clínica en los síntomas neuropsicológicos, probablemente debido a la unión insuficiente del amoníaco (Bajaj y otros. *J. Hepatol* 2013; 58: S84, Bosoi y otros. *supra*). Se sabe que los adsorbentes de carbono se unen a una variedad de compuestos y presentan el riesgo de interferir con sustancias endógenas o exógenas importantes (Schulman y otros. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 565-577; Neuvonen y Elonen *Eur J Clin Pharmacol* 1980; 17: 51-57; Neuvonen y Olkkola *Med Toxicol* 1988; 3:33-58).

Debido a la naturaleza crónica de la encefalopatía hepática, las estrategias de tratamiento para la eliminación de amoníaco basadas en enfoques extracorporales (*p. ej.*, hemodiálisis) no son ideales porque son invasivos y adecuados principalmente para tratar episodios severos de hiperamonemia aguda.

Un tratamiento ideal para pacientes que sufren de encefalopatía hepática inducida por una hiperamonemia sería un tratamiento enteral (*p. ej.*, oral), potente y selectivo en la absorción de amoníaco y estable en el ambiente hostil del tracto gastrointestinal.

60 Trimetilamina

La Trimetilamina (TMA) (N(CH₃)₃) es una amina terciaria la cual se genera en el intestino por el metabolismo bacteriano de sustancias dietéticas (*p. ej.*, colina, carnitina, lecitina) (Wang Z y otros. (2011) *Nature* 472 (7341), 57-63; Wise PM y otros. (2011) *The American journal of medicine* 124 (11), 1058-1063). La TMA se oxida posteriormente por la flavina monooxigenasa 3 a trimetilamina-N-óxido inodoro (TMAO) en el hígado (Yeung CK y otros. (2007) *Archives of*

biochemistry and biophysics, 464 (2), 251-259). La TMA, y su metabolito TMAO, están involucrados en la etiología de varias enfermedades.

La trimetilaminuria (conocida además como síndrome de olor a pescado) es un trastorno autosómico recesivo relacionado con la deficiencia de flavina monooxigenasa 3 (Yeung y otros, *supra*). Los pacientes que sufren de trimetilaminuria, generalmente, presentan un mal olor (a menudo asociado con pescado podrido) debido a cantidades elevadas de TMA en los fluidos corporales (orina, sudor) y aire expirado (Wise y otros, *supra*). El diagnóstico de trimetilaminuria generalmente se basa en un cambio de la dieta de colina y el posterior análisis de TMA y TMAO en la orina (Wise y otros, *supra*). El olor perceptible proviene, principalmente, de la superficie de la piel y varía según la dieta (Wise y otros, *supra*). Debido a su mal olor, los pacientes con trimetilaminuria a menudo sufren de síntomas psicológicos (*p. ej.*, depresión, tendencias suicidas) y aislamiento social (Todd WA (1979). *The Journal of pediatrics*, 94 (6), 936-937).

Los niveles incrementados de TMAO se asociaron además con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y enfermedad renal crónica (Tang WW y otros. (2013) *New England Journal of Medicine* 368 (17), 1575-1584; Tang WW y otros. (2015) *Circulation research* 116(3), 448-455); y la inhibición de la producción intestinal de TMA microbiana condujo a una reducción de las lesiones ateroscleróticas (Wang Z y otros. (2015) *Cell* 163 (7), 1585-1595).

Además, se encontró que la TMA contribuye al olor desagradable en la vaginosis bacteriana (Blankenstein T y otros. (2015) *Archives of gynecology and obstetrics* 292 (2), 355-362).

Tratamientos de la trimetilaminuria. En el tratamiento de la trimetilaminuria, se recomiendan restricciones dietéticas tales como evitar los vegetales Brassica y los alimentos ricos en carnitina, colina o lecitina para disminuir el mal olor (Cashman JR y otros. (1999) *In-vitro and in-vivo studies inhibition of human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) in the presence of dietary indoles.* *Biochem Pharmacol* 58, 1047-1055; Cashman JR y otros. (2003) *Biochemical and clinical aspects of the human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to trimethylaminuria.* *Current drug metabolism*, 4 (2), 151-170; Danks DM y otros (1976) *Trimethylaminuria: diet does not always control the fishy odor.* *The New England Journal of Medicine*, 295(17), 962-962). Sin embargo, estas medidas restrictivas son complicadas para los pacientes y no siempre resultan en una disminución suficiente de los vapores malolientes del cuerpo (Danks y otros, *supra*). Ciertos antibióticos, aplicados por vía oral (por ejemplo, neomicina, metronidazol), que inhiben el crecimiento y el metabolismo de los microbios generadores de TMA en el intestino, pueden aliviar temporalmente los síntomas (Danks y otros, *supra*; Treacy E y otros (1995) *Journal of inherited metabolic disease*, 18(3), 306-312). Sin embargo, no se observó un efecto beneficioso en todos los pacientes (Treacy y otros, *supra*) y el uso de antibióticos a largo plazo conlleva el riesgo de reacciones gastrointestinales adversas (Levy J (2000). *The American Journal of Gastroenterology*, 95 (1), S8-S10). La eliminación de TMA por adsorción sobre carbón activado administrado por vía oral ha demostrado además ser beneficiosa en ciertos pacientes que sufren de trimetilaminuria (Yamazaki H y otros (2004) *Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients.* *Life sciences*, 74(22), 2739-2747). Además, se recomienda el uso de jabón ácido, ya que la TMA es menos volátil en estado protonado (Wilcken B (1993). *Acid soaps in the fish odor syndrome.* *BMJ: British Medical Journal*, 307 (6917), 1497). Song y otros describen la preparación de polimerosomas resistentes a los surfactantes con membranas ultra gruesas a través de la polimerización en dispersión RAFT. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(27), 17033-17037.

La dimetilamina análogo metilado del amoníaco (DMA) comparte propiedades fisicoquímicas similares a la TMA y al amoníaco y se produce en el tracto gastrointestinal. Es el precursor de un carcinógeno conocido.

La presente descripción se refiere a una serie de documentos, cuyo contenido se incorpora como referencia en su totalidad en la presente descripción.

Resumen de la invención

Esta invención describe la composición, preparación y uso de polimerosomas de gradiente de pH transmembrana, de acuerdo con las reivindicaciones, para la desintoxicación/eliminación de amoníaco y sus análogos metilados (*p.ej.*, TMA) a través de una ruta entérica (*p.ej.*, oral) y una ruta tópica. Como se muestra en la presente descripción, los polimerosomas de la presente invención secuestran fuertemente el amoníaco y sus análogos metilados (*p. ej.*, TMA) en fluidos gastrointestinales simulados y resisten a este ambiente hostil. Además, los polimerosomas de la presente invención secuestran fuertemente el TMA en emulsiones (*p. ej.*, formulaciones tópicas tales como lociones y cremas).

Más particularmente, se demostró que los polimerosomas de la presente invención exhiben sus propiedades secuestrantes cuando se diluyen en un medio que imita las condiciones encontradas en el intestino, en contraposición a los liposomas con gradiente de pH transmembrana, por ejemplo (ver *p.ej.*, Ejemplo 1). La estabilidad y eficacia de los polimerosomas en el ambiente gastrointestinal se demostró en los ejemplos a continuación al mostrar la absorción de amoníaco en condiciones gastrointestinales simuladas variables (altas concentraciones de sales biliares (Ejemplos 6-8 y 13), hipo e hiperosmolaridad (Ejemplo 9), presencia de enzimas digestivas (Ejemplo 10) y altas concentraciones de cationes (Ejemplo 11)). La estabilidad y eficacia de los polimerosomas se demostró además en emulsiones de aceite en agua (*o/w*) correspondientes a *p. ej.*, una formulación tópica (Ejemplo 13).

Esta invención describe, por ejemplo, polimerosomas compuestos de copolímeros en bloque anfífilos no biodegradables (*p. ej.*, poli(estireno)-*b*-poli(óxido de etileno) (PS-*b*-PEO, conocido además como poli(estireno)-*b*-poli(etilenglicol), PS-*b*-PEG)).

5 Más específicamente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un polimerosoma, (a) cuya membrana comprende un copolímero en bloque de un polímero no biodegradable hidrofóbico sin carga y un polímero hidrofílico no biodegradable sin carga como se define en la presente descripción, en donde la relación de peso molecular del polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable / polímero hidrofílico no cargado y no biodegradable, es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) el núcleo de este encierra un ácido.

10 Más específicamente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un polimerosoma que comprende (a) una membrana, que comprende un copolímero en bloque de un polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable y un polímero hidrofílico no cargado no biodegradable como se define en la presente descripción, en donde la relación de peso molecular del polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable / polímero hidrofílico no cargado y no biodegradable es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) un núcleo que encierra un ácido.

15 Más específicamente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un polimerosoma que consiste en (a) una membrana, que comprende un copolímero en bloque de un polímero no biodegradable hidrofóbico sin carga y un polímero hidrofílico no biodegradable sin carga como se define en la presente descripción, en donde la relación de peso molecular del polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable / polímero hidrofílico no cargado y no biodegradable es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (por ejemplo, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) un núcleo que encierra un ácido.

20 De acuerdo con un aspecto más específico de la presente invención, se proporciona un polimerosoma, (a) cuya membrana comprende un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) el núcleo de este encierra un ácido. De acuerdo con un aspecto más específico de la presente invención, se proporciona un polimerosoma que comprende (a) una membrana, que comprende un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) el núcleo de este encierra un ácido. De acuerdo con un aspecto más específico de la presente invención, se proporciona un polimerosoma que consiste en (a) una membrana, que comprende un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) el núcleo de este encierra un ácido. Los polimerosomas de la presente invención pueden estar reticulados o no.

25 En una realización específica, se proporciona un polimerosoma, (a) cuya membrana consiste en un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) el núcleo de este encierra un ácido. En una realización específica, se proporciona un polimerosoma que comprende (a) una membrana, que consiste en un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) un núcleo que encierra un ácido. En una realización específica, se proporciona un polimerosoma que consiste en (a) una membrana, que consiste en un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0 (*p. ej.*, mayor que 1,0 y menor que 3,0); y (b) un núcleo que encierra un ácido.

30 En una realización específica del polimerosoma de la presente invención, el copolímero en bloque es un copolímero dibloque. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el ácido está en una concentración que produce un pH entre 1 y 6, preferiblemente entre 2 y 5, más preferiblemente entre 2 y 4, cuando el polimerosoma está hidratado. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el ácido está dentro de una solución ácida acuosa. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el pH dentro de la solución ácida acuosa está entre 1 y 6, preferiblemente entre 2 y 5, más preferiblemente entre 2 y 4. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el ácido es (i) un hidroxácido tal como ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido tartárico o ácido láctico; (ii) un ácido graso de cadena corta tal como ácido acético; (iii) un ácido de azúcar tal como ácido urónico; (iv) un ácido dicarboxílico tal como ácido malónico; (v) un ácido tricarboxílico tal como ácido propano-1,2,3-tricarboxílico o ácido aconítico; (vi) un ácido tetracarboxílico tal como ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico; (vii) un ácido pentacarboxílico tal como ácido 1,2,3,4,5-pentanopentacarboxílico; (viii) un poli(ácido carboxílico) polimérico tal como poli(ácido acrílico) o poli(ácido metacrílico); (ix) un ácido poliaminocarboxílico tal como ácido etilendiaminotetraacético; o (x) una combinación de al menos dos de los mismos. En una realización más específica, es un hidroxácido y preferiblemente ácido cítrico. En otra realización específica, el polimerosoma de la presente invención se prepara mediante un método que comprende mezclar un disolvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el disolvente orgánico es inmiscible en agua o parcialmente miscible en agua. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el núcleo del polimerosoma encierra además amoníaco. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el núcleo del polimerosoma

contiene también amoníaco o su análogo metilado, y el análogo metilado es preferiblemente TMA. En otra realización específica del polimerosoma de la presente invención, el núcleo del polimerosoma contiene también un análogo metilado de amoníaco (*p. ej.*, TMA).

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende el polimerosoma de la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En otra realización específica de la composición de la presente invención, la composición está en forma líquida o sólida. En otra realización específica de la composición de la presente invención, la composición está en forma líquida, semisólida o sólida.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención, para uso entérico. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención, para uso entérico o uso tópico.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención, para uso tópico.

20 De acuerdo con otro aspecto, el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención es para usar en la eliminación de amoníaco.

De acuerdo con otro aspecto, el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención se usa para eliminar un análogo metilado del amoníaco (*p.ej.*, TMA).

25 El polimerosoma o composición de la presente invención, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con el amoníaco o un análogo metilado del amoníaco o un síntoma de los mismos y preferiblemente hiperamonemia o trimetilaminuria.

30 De acuerdo con otro aspecto, el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención es para usar en el tratamiento de la hiperamonemia.

De acuerdo con otro aspecto, el polimerosoma de la presente invención o la composición de la presente invención es para usar en el tratamiento de trimetilaminuria o un síntoma de la misma o una enfermedad cardiovascular asociada a TMA o un síntoma de la misma o una enfermedad renal asociada a TMA o un síntoma de la misma o vaginosis bacteriana asociada a TMA o un síntoma de la misma, en un sujeto que lo necesite.

40 En una realización específica del polimerosoma para usar, el síntoma de trimetilaminuria y/o síntoma de vaginosis bacteriana es mal olor (*de p. ej.*, piel y/u orina y/o aire expirado y/o vagina).

45 En otro aspecto, se proporciona un polimerosoma o composición para usar en un método de administración (*p. ej.*, entérico o tópico) del polimerosoma o composición a un sujeto que lo necesite. En otro aspecto, se proporciona un uso del polimerosoma de la invención o la composición de la invención para la administración (*p. ej.*, entérica o tópica) a un sujeto que lo necesite. En otro aspecto, se proporciona un uso del polimerosoma de la invención o la composición de la invención como medicamento.

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquiera de las referencias en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico). De acuerdo con otro aspecto, los métodos o usos anteriores son para (o para la fabricación de un medicamento para) la eliminación del amoníaco. De acuerdo con otro aspecto, los métodos o usos anteriores son para (o para la fabricación de un medicamento para) eliminar un análogo metilado del amoníaco (*p. ej.*, TMA) en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con otro aspecto, los métodos o usos anteriores son para (o para la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al amoníaco o análogo metilado de amoníaco, o un síntoma del mismo, y preferiblemente hiperamonemia o trimetilaminuria, más preferiblemente hiperamonemia, en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con otro aspecto, los métodos o usos anteriores son para (o para la fabricación de un medicamento para) el tratamiento de la trimetilaminuria o un síntoma de la misma o una enfermedad cardiovascular asociada a TMA o un síntoma de la misma o una enfermedad renal asociada a TMA o un síntoma de la misma o vaginosis bacteriana asociada a TMA o un síntoma de la misma, en un sujeto que la necesite.

60 En una realización específica de los métodos o usos anteriores, el síntoma de trimetilaminuria y/o el síntoma de vaginosis bacteriana es mal olor (*de p. ej.*, piel y/u orina y/o aire expirado y/o vagina).

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para fabricar el polimerosoma de la presente invención, que comprende: (a) disolver el copolímero en bloque de PS y PEO en un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente orgánico inmiscible en agua o parcialmente miscible en agua, para formar una fase

orgánica que contiene el copolímero; (b) mezclar la fase de disolvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido para formar el polimerosoma; y (c) eliminar el disolvente orgánico.

5 En una realización específica del método de la presente invención, la fase acuosa comprende entre 50 y 700 mM de ácido.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los polimerosomas o composiciones mencionados anteriormente e instrucciones para usar los polimerosomas o composiciones para eliminar el amoníaco en un sujeto que lo necesite.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los polimerosomas o composiciones mencionados anteriormente e instrucciones para usar los polimerosomas o composiciones para tratar la hiperamonemia en un sujeto que lo necesite.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los polimerosomas o composiciones mencionadas anteriormente e instrucciones para usar los polimerosomas o composiciones para eliminar un análogo metilado del amoníaco (*p. ej.*, TMA).

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los polimerosomas o composiciones mencionadas anteriormente e instrucciones para usar los polimerosomas o composiciones para tratar la trimetilaminuria o un síntoma de la misma, o una enfermedad cardiovascular asociada a TMA o un síntoma de la misma, o una enfermedad renal asociada a TMA o un síntoma de la misma, o vaginosis bacteriana asociada a TMA o un síntoma de la misma, en un sujeto que lo necesite.

30 En una realización específica del kit, el síntoma de trimetilaminuria y/o síntoma de vaginosis bacteriana es mal olor (de *p. ej.*, piel y/u orina y/o aire expirado y/o vagina).

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes después de leer las siguientes descripciones no restrictiva de modalidades específicas de esta, dadas a manera de ejemplo solamente con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

35 En las figuras adjuntas:

La Figura 1 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* por liposomas de gradiente de pH transmembrana que se prepararon usando un método de hidratación de película ($n=3$, desviación media y estándar).

40 La Figura 2 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PBD-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PBD/PEO de aproximadamente 1,7 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico ($n=3$, desviación media y estándar).

45 La Figura 3 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA con una relación de Mw promedio en número de PDM/PMOXA de aproximadamente 2,4 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico. ($n=3$, media y desviación estándar).

50 La Figura 4 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 o 2,5 preparados usando un método de hidratación de película ($n=3$, media y desviación estándar).

55 La Figura 5 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares de polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,0 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico ($n=3$, desviación media y estándar).

60 La Figura 6 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 y 2,8 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano o tolueno como disolvente orgánico ($n=3$, media y desviación estándar).

65 La Figura 7 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de

PS/PEO de aproximadamente 3,8 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico (n=3, desviación media y estándar).

5 La Figura 8 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando cloroformo como disolvente orgánico (n=3, desviación media y estándar).

10 La Figura 9 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* en condiciones hipo e hiperosmolares por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 o 2,5 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico (n=3, media y desviación estándar).

15 La Figura 10 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* en presencia de enzimas digestivas por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 2,5 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico (n=3, desviación media y estándar).

20 La Figura 11 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de potasio por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico (n=3, desviación media y estándar).

25 La Figura 12 es un gráfico que muestra la absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico y con concentraciones variables de ácido (n=3-4, desviación media y estándar).

30 La Figura 13 es un gráfico que muestra la absorción *in vitro* de TMA a altas concentraciones de sales biliares y después de la pre-exposición en una emulsión O/W por polimerosomas de gradiente de pH transmembrana PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,4 o 2,0 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico (n=3, desviación media y estándar).

35 Descripción de las modalidades ilustrativas

La presente invención abarca polimerosomas que poseen un gradiente de pH transmembrana para capturar amoníaco y/o sus análogos metilados (por ejemplo, TMA), composiciones que comprenden los polimerosomas, procesos para fabricar los polimerosomas y el uso de estos polimerosomas y composiciones.

Polimerosomas

45 Los polimerosomas son vesículas, cuya membrana bicapa se ensambla a partir de copolímeros sintéticos. Tienen diámetros medios que varían de 50 nm a 100 µm o más, en una realización específica, varían de 100 nm a 40 µm, según lo determinado por difracción láser. Aunque los polimerosomas probados de la presente invención que tienen diámetros medios que varían entre 100 nm y 40 µm pudieron encapsular amoníaco efectivamente, no hay razón para creer que los polimerosomas con un diámetro mayor de 40 µm podrían además ser no efectivos.

50 Los polimerosomas de la presente invención comprenden copolímeros en bloque anfífilicos no biodegradables y se preparan usando un disolvente orgánico.

El mecanismo de acción de la presente invención se basa en el gradiente de pH a través de la membrana del polimerosoma. El agente ácido contenido en el núcleo del polimerosoma acuoso posee un pH diferente (menor que) el pH fisiológico en el intestino y la piel. Por lo tanto, el amoníaco y sus análogos metilados (p. ej., TMA) pueden difundirse a través de la membrana polimérica hidrófoba de los polimerosomas en su estado no cargado y quedar atrapados en su estado protonado (ionizado) (p. ej., amonio en el caso de amoníaco) en el compartimiento interior. Si bien el amoníaco y TMA existen principalmente en su estado protonado al pH del intestino y la piel, siempre hay una pequeña fracción en su estado no ionizado. Esta fracción puede difundirse en los polimerosomas y quedar atrapada en su estado protonado dentro de los polimerosomas, lo que a su vez desplaza el equilibrio, trayendo más amoníaco y TMA hacia el interior de las vesículas.

60 Como se usa en la presente descripción, la propiedad "gradiente de pH transmembrana para capturar amoníaco" y/o "gradiente de pH transmembrana para capturar amoníaco y/o sus análogos metilados" se refiere, por lo tanto, a la capacidad de los polimerosomas de la presente invención para secuestrar amoníaco (y/o sus análogos metilados) cuando se diluyen en un medio que imita las condiciones encontradas en el intestino o en la piel.

Como se usa en la presente descripción, los términos "análogos metilados de amoniaco" se refieren, sin limitarse, a TMA y DMA. En una realización específica, se refiere a TMA.

Copolímeros en bloque

Los "polímeros" son macromoléculas que comprenden unidades monoméricas conectadas. Las unidades monoméricas pueden ser de un solo tipo (homogéneas) o de una variedad de tipos (heterogéneas). Cuando dos o más monómeros diferentes se unen para polimerizarse, su resultado se llama copolímero. Un copolímero hecho de una secuencia de dos o más monómeros de un solo tipo (un bloque) unido covalentemente a dos o más monómeros de otro tipo (otro bloque) se llama copolímero en bloques. Un copolímero hecho de dos tipos de bloques unidos covalentemente se llama dibloque, de tres tipos de bloques, se llama tribloque, etc. Los copolímeros en bloque pueden comprender, como resultado de la síntesis específica utilizada para generarlos, diferentes grupos terminales.

Los polimerosomas de la presente invención comprenden copolímeros en bloque. En una modalidad específica, los copolímeros en bloque de la presente invención son copolímeros dibloque o tribloque. Estos copolímeros en bloque son anfifílicos y están formados por al menos dos polímeros, a saber, un polímero aromático altamente hidrófobo (*p. ej.* poli(estireno)) y un polímero hidrofílico sin carga y no biodegradable. En una realización más específica, el copolímero en bloque es un copolímero dibloque (*p. ej.*, poli(estireno)-*b*-poli(óxido de etileno) (PS-*b*-PEO)), o un copolímero tribloque (*p. ej.*, PEO-*b*-PS-*b*-PEO) (es decir, copolímeros en bloque PS PEO)).

Un copolímero "anfifílico" es uno que contiene grupos hidrófilos (solubles en agua) e hidrófobos (insolubles en agua).

Como se usa en la presente descripción, el término "no biodegradable" significa no hidrolizable en condiciones gastrointestinales (*p. ej.*, resistente a la degradación por enzimas (*p. ej.*, proteasa, lipasa) o degradación por otros medios (*p. ej.*, pH) en el tracto gastrointestinal).

Polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable

En una realización específica, el polímero no biodegradable hidrofóbico sin carga usado en los copolímeros de la presente invención es un poli(etileno) $-(\text{CH}_2\text{-CH}(\text{C}_2\text{H}_5))_n-$, es decir $-(\text{C}_4\text{H}_8)_n-$ o un poli(estireno) $-(\text{CH}_2\text{-CH}(\text{Ph}))_n-$, es decir $-(\text{CH}_2\text{-CH}(\text{C}_6\text{H}_5))_n-$, es decir $-(\text{C}_8\text{H}_8)_n-$. En modalidades específicas, el polímero hidrofóbico no cargado no biodegradable es un poli(estireno). Los poli(estirenos) para su uso en la presente invención pueden incluir monómeros de estireno no sustituidos y/o sustituidos/funcionalizados. A menos que se defina específicamente lo contrario, el término "poli(estireno)" se usa en la presente descripción genéricamente para designar un poli(estireno) que comprende monómeros de estireno exclusivamente no sustituidos, una mezcla de monómeros sustituidos y no sustituidos o monómeros exclusivamente sustituidos. Uno o más sustituyentes en el monómero de estireno pueden incluir sustituyentes en el fenilo y/o en el carbono que está unido al fenilo y/o pueden formar derivados policíclicos con el fenilo (*p. ej.*, bicíclo, triciclo, etc. que comprenden arilo(s) C3-C6 y/o cicloalquilo(s) C3-C6). Los sustituyentes potenciales incluyen alquilo (C1 a C7 (C1, C2, C3, C4, C5, C6 o C7, más específicamente C1, C2 o C3), arilo (C3-C6), cicloalquilo C3-C8, aril-alquilo, acetoxilo, alcoxilo (metoxilo, etoxilo, propanoxilo, butoxilo, etc.), halógeno (Br, Cl, F, etc.), amina, amida, alquilamina, NO₂. Además, el o los sustituyentes, pueden estar sustituidos. Sin estar limitados, el monómero de estireno sustituido incluye acetoxiestireno, bencilrestireno, benciloxi-metoxiestireno, bromoestireno (2-, 3-, 4- o alfa), cloroestireno (2-, 3-, 4- o alfa), fluoroestireno (2-, 3-, 4- o alfa), *terc*-butoxiestireno, *terc*-butilestireno, cloro-metilestireno, dicloroestireno, difluoroestireno, dimetoxiestireno, dimetilestireno, dimetilvinilbencilamina, difenil metil penteno, (difenilfosfina) estireno, etoxiestireno, isopropenilaniolina, isopropenil-*a,a*-dimetilbencil isocianato [iso-dimetilbencilo [*N*-(metilaminoetil) aminometil] estireno, metilestireno, nitroestireno, 4-vinilbenzoato de pentafluorofenilo, pentafluoroestireno, (trifluormetil) estireno (2-, 3- o 4-), trimetilestireno, vinilaniolina (3- o 4-), vinilanol, ácido vinilbenzoico (3-, 4-), cloruro de vinilbencilo, (vinilbencil) trimetilamonio vinilbifenilo, 4-vinilbenzociclobuteno (4-, etc.), vinilantraceno (9-, etc.), 2-vinilnaftaleno, vinil-bifenilo (3-, 4-, etc.), etc. En modalidades particulares, el monómero de estireno sustituido es un alquilestireno (*p. ej.*, metilestireno) o un *terc*-butilestireno. En una modalidad, el PS comprende al menos un monómero de estireno sustituido. Los sustituyentes pueden ser grupos no iónicos (*p. ej.*, grupos metilo o *terc*-butilo). En otra realización específica, los monómeros de estireno en el poli(estireno) no están sustituidos.

Polímero hidrofílico no biodegradable sin carga

El polímero hidrofílico sin carga y no biodegradable que se puede usar con poli(estireno) en el copolímero en bloque de la presente invención incluye poli(óxido de etileno), poli(*N*-vinilpirrolidona), poli(etil oxazolona), poli(metil oxazolona), y polímeros de oligoetilenglicol de alquil acrilato. En modalidades específicas, el polímero hidrofílico sin carga y no biodegradable es poli(óxido de etileno).

El poli(óxido de etileno) (PEO) para uso en la presente invención tiene la fórmula general: $-(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n-$, es decir $-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n-$ e incluye monómeros de óxido de etileno no sustituidos y sustituidos/funcionalizados. A menos que se defina específicamente lo contrario, el término "poli(óxido de etileno)" o PEO se usa en la presente genéricamente para designar un PEO que comprende monómeros de óxido de etileno exclusivamente no sustituidos, una mezcla de monómeros sustituidos y no sustituidos o monómeros exclusivamente sustituidos. En una modalidad, el PEO

comprende al menos un monómero de óxido de etileno sustituido. En otra modalidad, los monómeros de óxido de etileno no están sustituidos.

Proporción de polímeros

5 Los pesos moleculares de los bloques PS y PEO (*p. ej.*, dibloque PS-*b*-PEO o tribloque PEO-*b*-PS-*b*-PEO) pueden variar siempre que se mantenga la estructura y la estabilidad de la bicapa. Los inventores descubrieron que los polimerosomas estables de PS/PEO se forman en una relación de peso molecular promedio en número de PS/PEO mayor que 1,0 y menor que 4 (*ver p. ej.*, Ejemplos 6-13). En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 4. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 4. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 4. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior e inferior a 4. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,9 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,9. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,9. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 3,9. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior e inferior a 3,9. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,8 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,8. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,8. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 3,8. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior e inferior a 3,8. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,7 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,7. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,7. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 3,7. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior e inferior a 3,7. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,6 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,6. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,6. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 3,6. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,5 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,5. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,5. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior e inferior a 3,5. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,4 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,4. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,4. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,3 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,3. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,3. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,2 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,2. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,2. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,1 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,1. En otra realización específica, la relación es aproximadamente 1,2 o superior e inferior a 3,1. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 3,0 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,1 o superior e inferior a 3,0. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,9 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,9 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,9 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,9 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,8 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,8 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,8 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,8 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,7 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,7 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,7 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,7 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,7 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,6 o inferior.

inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,6 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,6 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,6 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,6 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,5 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,5 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,5 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,5 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,5 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,4 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,4 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,4 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,4 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,4 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,3 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,3 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,3 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,3 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,3 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,2 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,2 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,2 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,2 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,2 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,1 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,1 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,1 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,1 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,1 o inferior. En otra realización específica, la relación es superior a 1 y aproximadamente 2,0 o inferior. En otra realización específica, la relación es mayor que aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,0 o inferior. En una realización específica, la relación está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,0 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,3 o superior y aproximadamente 2,0 o inferior. En una realización específica, la relación es aproximadamente 1,4 o superior y aproximadamente 2,0 o inferior.

35 Sin limitar la generalidad de las declaraciones anteriores, la presente invención abarca los PEO que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 400 g/mol hasta 20,000 g/mol. Sin embargo, los solicitantes no tienen ninguna razón para esperar que el PEO de mayor peso molecular no pueda usarse de manera efectiva en las presentes invenciones. Los polímeros de menor peso pueden ser más fáciles de manipular. Típicamente, el peso molecular del PEO está entre 1000 y 5000 g/mol. El peso molecular de PS se selecciona para satisfacer la relación descrita anteriormente. De acuerdo con la presente invención, cuando el PEO tiene un peso molecular de aproximadamente *p. ej.*, 20 000 g/mol, el peso molecular de PS es inferior a aproximadamente 60 000 g/mol.

Propiedades de los polimerosomas hechos de un polímero hidrofóbico sin carga no biodegradable + un polímero hidrofílico no biodegradable sin carga (copolímeros di- o tribloque (*p. ej.*, PS-*b*-PEO o copolímeros PEO-*b*-PS-*b*-PEO))

45 Sin estar limitado por esta hipótesis, se cree que la fuerte interacción del polímero altamente hidrófobo (*p. ej.*, aromático (*p. ej.*, PS) con la capacidad de realizar interacciones de apilamiento pi) en la membrana de la vesícula proporciona resistencia contra fluidos gastrointestinales y excipientes comprendidos en formulaciones tópicas tales como aceites y tensioactivos. De hecho, las vesículas hechas de lípidos (liposomas) u otros copolímeros de dibloque anfífilicos como el poli(butadieno)-*b*-poli(óxido de etileno) (PBD-*b*-PEO, conocido además como poli(butadieno)-*b*-poli(etilenglicol), PBD-*b*-PEG; y poli(2-metiloxazolona)-*b*-poli(dimetilsiloxano)-*b*-poli(2-metiloxazolona), PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA) no pueden captar el amoníaco en amortiguadores simples (ver *p. ej.*, Ejemplo 3), o pueden absorber amoníaco en amortiguadores simples pero pierden sus propiedades secuestrantes en medios que imitan los fluidos intestinales (ver *p. ej.*, Ejemplos 1 y 2).

Método de preparación de polimerosomas.

Preparación de copolímero.

60 Se puede usar cualquier método conocido para hacer copolímeros. Los copolímeros usados en los ejemplos descritos en la presente descripción se compraron en Advanced Polymer Materials Inc (PS-*b*-PEO y PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA) y Polymer Source Inc (PBD-*b*-PEO).

Preparación de polimerosomas

65

El copolímero se disuelve en un disolvente orgánico para formar una fase orgánica, y esta última se mezcla con la solución ácida acuosa (*p. ej.*, ácido cítrico) (fase acuosa). Sin estar limitado, se cree que la mezcla permite una dispersión fina del polímero en la fase acuosa y la formación posterior de polimerosomas estables. La etapa de mezclado puede realizarse a través de diferentes técnicas. Por ejemplo, una emulsión de aceite en agua (o/w) (es decir, la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero (es decir, la fase oleosa) en solución acuosa ácida (es decir, fase acuosa)), una evaporación en fase inversa, una nanoprecipitación o un método de doble emulsión, puede usarse para mezclar la fase orgánica que contiene el polímero y la fase acuosa.

En el método de emulsión o/w, el disolvente orgánico que contiene el polímero se mezcla con la fase ácida acuosa bajo sonicación durante un tiempo y tiempo suficientes para formar una emulsión. En los ejemplos a continuación, la fase acuosa se saturó con el disolvente orgánico bajo agitación durante 30 minutos antes de la adición de la fase del disolvente orgánico que contiene el polímero. Posteriormente, la fase del disolvente orgánico que contiene el polímero se adicionó a la fase acuosa que contiene el ácido bajo sonicación durante 3 minutos en un baño de hielo (para reducir el calor producido por el sonicador), usando los siguientes parámetros específicos de la máquina: amplitud 70, ciclo 0,75 (UP200H, 200W, 24 kHz, y tecnología de ultrasonido Hielscher). Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para crear una emulsión. El uso de la sonicación, así como los parámetros específicos de sonicación y el tiempo apropiado para producir una emulsión dependerán de la técnica de emulsión usada. La emulsión no necesita ser estable en los métodos de preparación de la presente invención.

En el método de evaporación de fase inversa, se sonica un sistema de dos fases que comprende un disolvente orgánico que contiene el polímero y una fase acuosa que contiene el ácido, formando una emulsión de agua en aceite (w/o). La fase externa se evapora a presión reducida hasta que se forma un estado viscoso similar a un gel. Los polimerosomas se forman al colapsar el estado de gel (Szoka y Papahadjopoulos. PNAS 1978; 75:4194-4198)

En el método de nanoprecipitación, los polímeros se disuelven en un disolvente orgánico adecuado, al que se agrega lentamente agua que contiene el ácido.

En el método de doble emulsión, los polimerosomas se forman en una emulsión doble w/o/w que contiene una fase interna acuosa que contiene ácido, un disolvente orgánico total o parcialmente inmisible en agua que contiene el polímero en la fase intermedia y una fase externa acuosa.

El disolvente orgánico se elimina posteriormente del polimerosoma usando cualquier técnica conocida. El disolvente se elimina antes de la administración para evitar la ingestión perjudicial de disolvente o la exposición a la piel por parte del sujeto. Sin estar limitado, se puede usar una aplicación de presión inferior a la ambiente, calor, filtración, filtración de flujo cruzado, diálisis o una combinación de estos métodos para eliminar el disolvente.

Después de la eliminación del disolvente orgánico, los polimerosomas se pueden usar tal cual (con una solución ácida acuosa exterior y en el interior de los polimerosomas), purificarse para cambiar la composición del medio no encapsulado y/o secarse adicionalmente mediante procedimientos convencionales de secado farmacéutico (*p. ej.*, liofilización, secado por pulverización). La etapa de secado permitiría la preparación de una forma de dosificación sólida (polvo o cápsulas o comprimido), la cual es más fácil de almacenar y transportar. Cuando los polimerosomas se destinan para la administración por vía oral, los polimerosomas secos podrían dispersarse nuevamente en un medio acuoso (*p. ej.*, agua, zumo) o tomados como están por el paciente (*p. ej.*, cápsula, comprimido). Cuando los polimerosomas están destinados a administrarse por vía tópica, los polimerosomas pueden dispersarse en cualquier formulación tópica relevante, como una solución acuosa, gel, espuma o una emulsión, como loción o crema. En todas estas formas (como están, purificados y/o secados), el núcleo del polimerosoma contiene el ácido. Este ácido proporciona el gradiente de pH transmembrana al polimerosoma cuando está dentro del tracto gastrointestinal o en la formulación sobre la piel. Los polimerosomas así formados de la presente invención contienen ácido, potencialmente una sal (es decir, ácido parcialmente desprotonado con un contraión tal como sodio, potasio o calcio) que se puede adicionar durante la preparación del polimerosoma para ajustar el pH y/o la osmolaridad en el núcleo, y, en su forma hidratada, los polimerosomas también contienen agua.

Cuando los polimerosomas están hidratados (es decir, que contienen un núcleo ácido acuoso), el pH en su núcleo está generalmente entre aproximadamente 1 y 6 (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 o 6). En una realización específica, está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4,5, y entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5.

Aunque no es necesario para la estabilidad de los polimerosomas de la presente invención, también pueden ser reticulados. Por ejemplo, una reacción de Friedel-Crafts con el agente de reticulación dicloruro de p-xilileno, 1,4-bis-clorometil-difenilo, monoclorodimetiléter, dimetilformal, tris-(clorometil)-mesitileno, o p,p'-bis-clorometil-1,4-difenilbutano puede usarse para reticular el poli(estireno) (Davankov y Tsyurupa, Reactive Polymers 1990; 13: 27-42).

Disolvente

El disolvente usado en la presente invención disuelve el copolímero, y el disolvente que contiene el polímero se mezcla luego con la fase acuosa ácida. Durante la etapa de mezclado (*p. ej.*, emulsión o/w), se forma una fina dispersión del polímero en la fase acuosa. Después de la etapa de mezclado, se elimina el disolvente (*p. ej.*, se evapora) para asegurar que los pacientes/sujetos no lo ingeran.

Se puede usar una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 40 % (v/v) de la relación de la fase disolvente/fase acuosa. En una realización específica, la relación de fase disolvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % hasta 30 % (v/v). En otra realización específica, la relación de fase disolvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % a 20 % (v/v). En otra realización específica, la relación de fase disolvente/fase acuosa es de aproximadamente 5 % a 15 % (v/v). En otra realización específica, la relación de fase disolvente/fase acuosa es de aproximadamente 10 % (v/v). En una realización específica, la relación de fase disolvente/fase acuosa en la emulsión resultante es de aproximadamente 9 % (v/v).

En modalidades específicas, el disolvente es un disolvente orgánico.

Sin estar limitado, el disolvente puede ser un disolvente clorado (*p. ej.*, diclorometano ver *p. ej.*, Ejemplos 5-6, 8-10, 12; o cloroformo, ver *p. ej.*, Ejemplo 7), areno o derivado de areno (*p. ej.*, tolueno, ver *p. ej.*, Ejemplo 6), disolvente alifático o derivado de disolvente alifático (*p. ej.*, hexano, 1-hexanol), cetona o derivado de cetona (*p. ej.*, 2-hexanona), éter o derivado de éter (*p. ej.*, dietiléter) o mezclas de los mismos (*p. ej.*, cuando se usa una técnica de emulsión o/w, doble emulsión w/o/w o de evaporación de fase inversa).

En una realización específica, cuando se usa una emulsión o/w para mezclar la fase orgánica que contiene el polímero y la fase acuosa, los disolventes útiles para la presente invención son disolventes orgánicos inmiscibles en agua o parcialmente inmiscibles en agua. Sin estar limitados, tales disolventes incluyen *p. ej.*, diclorometano ver *p. ej.*, Ejemplos 5-6, 8-10, 12; o cloroformo, ver *p. ej.*, Ejemplo 7), areno o derivado de areno (*p. ej.*, tolueno, ver *p. ej.*, Ejemplo 6), disolvente alifático o derivado de disolvente alifático (*p. ej.*, hexano, 1-hexanol), cetona o derivado de cetona (*p. ej.*, 2-hexanona), éter o derivado de éter (*p. ej.*, dietiléter) o mezclas de los mismos.

Ácido y solución ácida.

La solución ácida en el núcleo del polimerosoma tiene preferiblemente una alta capacidad de amortiguación a un pH bajo para una alta retención de compuestos básicos (*p. ej.*, amoníaco, TMA, DMA). El ácido no es tóxico para los animales y no (o solo débilmente) penetra en la membrana del polimerosoma.

Sin estar limitado, el ácido contenido en el núcleo del polimerosoma es (i) un hidroxiaácido tal como ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido tartárico o ácido láctico; (ii) un ácido graso de cadena corta tal como ácido acético; (iii) un ácido de azúcar tal como ácido urónico; (iv) un ácido dicarboxílico tal como ácido malónico; (v) un ácido tricarboxílico tal como ácido propano-1,2,3-tricarboxílico o ácido aconítico; (vi) un ácido tetracarboxílico tal como ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico; (vii) un ácido pentacarboxílico tal como ácido 1,2,3,4,5-pentanopenotacarboxílico; (viii) un poli(ácido carboxílico) polimérico tal como poli(ácido acrílico) o poli(ácido metacrílico); (ix) un ácido poliaminocarboxílico tal como ácido etilendiaminotetraacético; o (x) una combinación de al menos dos de los mismos. En una realización específica, se usa el ácido cítrico. Aunque algunos de los ácidos enumerados anteriormente pueden tener ciertas actividades farmacológicas, a ciertas dosis, el ácido encapsulado usado en el polimerosoma de la presente invención no está destinado a ejercer una función farmacológica o de formación de imágenes directa, sino que se usa únicamente para crear el gradiente de pH transmembrana. La presente invención abarca el uso de cualquiera de los ácidos citados anteriormente, tengan o no ciertas actividades farmacológicas. Sin embargo, de acuerdo con ciertas modalidades o aspectos de la presente invención, el ácido puede no ser un ácido, que no sea ninguno de los ácidos enumerados anteriormente, que se conoce como antibiótico, fármaco anticancerígeno, fármaco antihipertensivo, fármaco antifúngico, un fármaco ansiolítico, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco inmunomodulador, un fármaco antiviral o un agente hipolipemiente.

En modalidades específicas, la concentración de ácido usada en el método puede variar entre 50 y 700 mM. Cuando se usa ácido cítrico, se usa de manera óptima una solución de ácido cítrico de entre aproximadamente 100 mM y 600 mM con una osmolalidad entre 50 y 800 mOsmol/kg (ver la Figura 12). En otra realización específica, la osmolalidad está entre 100 y 750 mOsmol/kg. En otra realización específica, la osmolalidad está entre 115 y 700 mOsmol/kg. En otra realización específica, la osmolalidad está entre 115 y 700 mOsmol/kg.

El ácido dentro del núcleo está presente en una concentración que produce un pH entre 1 y 6, cuando el polimerosoma se hidrata.

Método de uso

Los polimerosomas de gradiente de pH transmembrana de la presente invención pueden usarse en el tratamiento entérico (por ejemplo, oral, intracolónico, rectal) o tópico de una enfermedad o trastorno relacionado con el amoníaco

o su análogo metilado, o síntomas del mismo (*p. ej.*, hiperamonemia (entérica) o trimetilaminuria (entérica o tópica) en un sujeto que lo necesite.

Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad o trastorno relacionado con amoníaco o análogos metilados de amoníaco, o un síntoma de los mismos" incluye hiperamonemia (*p. ej.*, inducida por insuficiencia hepática), encefalopatía hepática, cirrosis hepática, falla hepática aguda, falla hepática aguda crónica, bypass portosistémico, derivación portosistémica, hiperamonemia inducida por fármacos, deficiencia congénita en el metabolismo hepático del amoníaco (hiperamonemia primaria), deficiencia congénita que afecta el metabolismo hepático del amoníaco (hiperamonemia secundaria), trimetilaminuria, una enfermedad cardiovascular asociada a TMA (*p. ej.*, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, enfermedad coronaria, infarto de miocardio), una enfermedad renal asociada a TMA (*p. ej.*, fibrosis y disfunción tubulointerstitial renal, insuficiencia renal, mortalidad asociada a enfermedad renal crónica) o vaginosis bacteriana asociada a TMA, o un síntoma de las mismas. Como se usa en la presente descripción en relación con la enfermedad asociada al amoníaco o sus análogos metilados, los términos "un síntoma de la misma" incluyen mal olor (de *p. ej.*, piel y/u orina y/o aire expirado y/o vagina).

Los polimerosomas se pueden administrar entéricamente al sujeto en diferentes formas de dosificación *p. ej.*, podría dispersarse en un medio acuoso (*p. ej.*, agua, zumo) o tomado en su forma seca como está por el sujeto (*p. ej.*, cápsula, comprimido). Los polimerosomas serán excretados a través de las heces. Los polimerosomas se pueden además administrar tópicamente al sujeto en diferentes formas de dosificación *p. ej.*, podrían dispersarse en una formulación tópica como una solución acuosa, una espuma, un gel o una emulsión (*p. ej.*, o/w o w/o) (*p. ej.*, loción, crema).

Como se usa en la presente descripción, los términos "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refieren a un sujeto que se beneficiaría de recibir una cantidad efectiva de los polimerosomas o la composición de los mismos de la presente invención. Se refiere a un animal, mamífero y a un humano en una realización específica. Las composiciones de la presente invención se pueden usar además para aplicaciones veterinarias y se pueden usar en mascotas u otros animales (por ejemplo, mascotas como gatos, perros, caballos, etc., y ganado, peces, cerdos, aves de corral, etc.). En una realización específica, el sujeto sufre de hiperamonemia (*p. ej.*, inducida por insuficiencia hepática). En una realización específica, el sujeto sufre de encefalopatía hepática, cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática aguda crónica, derivación portosistémica, operación portosistémica, hiperamonemia inducida por fármacos, deficiencias congénitas en el metabolismo hepático del amoníaco (hiperamonemia primaria) o deficiencias congénitas que afectan el metabolismo hepático del amoníaco (hiperamonemia secundaria), o cualquier síntoma de las mismas. En otra realización específica, el sujeto sufre de trimetilaminuria, una enfermedad cardiovascular asociada a TMA, una enfermedad renal asociada a TMA, una vaginosis bacteriana asociada a TMA o cualquier síntoma de las mismas.

Los polimerosomas de la presente invención pueden almacenarse como un líquido (*p. ej.*, suspensión líquida), un semisólido (*p. ej.*, emulsión como loción o crema) o en forma sólida (*p. ej.*, polvo, cápsula, comprimido, supositorio).

La presente invención se refiere además al uso de los polimerosomas y/o composiciones en la preparación de un medicamento.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden los polimerosomas anteriores de la invención.

Sin estar limitados, los polimerosomas o las composiciones de los mismos de la invención pueden administrarse a través de una ruta entérica (es decir, a través del tracto gastrointestinal) o una ruta tópica. Cuando se usa la ruta oral, por ejemplo, los polimerosomas pueden estar en forma *p. ej.*, de comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas o suspensiones de gelatina dura o blanda. Cuando la ruta rectal/intracolónica, por ejemplo, los polimerosomas pueden estar en forma *p. ej.*, de supositorios o suspensiones. Cuando se usa la ruta tópica, por ejemplo, los polimerosomas pueden estar en forma de una emulsión (*p. ej.*, o/w o w/o) como una loción o crema, geles y espumas, o una solución acuosa.

Las composiciones de la invención pueden contener un vehículo farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, soluciones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen, sin limitación, propilenglicol, polietilenglicol, emulsiones, etc. Los vehículos acuosos incluyen, sin limitación, agua, alcohol, solución salina y soluciones amortiguadoras. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además incluir vehículos acuosos fisiológicamente aceptables (*p. ej.*, soluciones azucaradas, solución salina) u otros vehículos conocidos apropiados para las rutas entéricas o tópicas.

Para la preparación de comprimidos, comprimidos recubiertos o cápsulas de gelatina dura, los polimerosomas de la presente invención pueden mezclarse con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéuticamente inerte, inorgánico u orgánico conocido. Los ejemplos de excipientes/vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco o ácido esteárico o sus sales.

Para la preparación de suspensiones (las formas líquidas son suspensiones porque los polimerosomas no son solubles en agua), los excipientes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido y glucosa.

5 Para la preparación de la emulsión, los polimerosomas de la presente invención pueden mezclarse con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéuticamente inerte, inorgánico u orgánico conocido. Los ejemplos de excipientes/vehículos adecuados incluyen agua, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos, ésteres de sorbitán, laurilsulfato de sodio, etc.), aceites (por ejemplo, aceites minerales o vegetales).

10 Las composiciones de la presente invención pueden contener además agentes conservantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales para la variación de la presión osmótica, amortiguadores o antioxidantes. Además pueden contener otros agentes terapéuticamente activos.

15 Es un requisito previo que todos los excipientes usados en la fabricación de las composiciones de la presente invención, como los vehículos, no sean tóxicos y, en general, sean farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente descripción, "farmacéuticamente aceptable" tal como vehículo, excipiente, etc. farmacéuticamente aceptable, significa farmacológicamente aceptable y sustancialmente no tóxico para el sujeto al que se administra la composición particular de la presente invención.

20 Terapia de combinación

Los polimerosomas de la invención pueden además administrarse en una terapia de combinación, es decir, combinada con al menos otro agente activo o terapia para administración simultánea o secuencial. La terapia de combinación puede incluir un polimerosoma o composición de la presente invención combinada con al menos otro agente o terapia para el tratamiento de la enfermedad o trastorno o síntoma asociado al amoniaco o su análogo metilado.

25 Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un polimerosoma o composición de la presente invención combinada con al menos otro agente o terapia anti-hiperamonemia o con un medicamento o terapia usada para la prevención o el tratamiento de al menos otro síntoma de una enfermedad o afección del sujeto que tiene hiperamonemia. En este contexto, los ejemplos de ingredientes activos o terapias que pueden administrarse en combinación (simultánea o secuencialmente) con los polimerosomas o composiciones de la presente invención incluyen lactulosa, rifaximina, fenilbutirato de glicerol, lactitol, un aminoácido de cadena ramificada, neomicina, metronidazol, un probiótico, un inhibidor de glutaminasa, L-ornitina-L-aspartato, hemodiálisis, diálisis peritoneal, fenilbutirato de sodio, fenilacetato de sodio/benzoato de sodio o ácido carglúmico.

30 Como otro ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un polimerosoma o composición de la presente invención combinada con al menos otro agente o terapia anti-trimetilaminuria o con un medicamento o terapia usada para la prevención o el tratamiento de al menos otro síntoma de una enfermedad o afección del sujeto que tiene trimetilaminuria. En este contexto, los ejemplos de ingredientes activos o terapias que pueden administrarse en combinación (simultánea o secuencialmente) con los polimerosomas o composiciones de la presente invención incluyen ciertos antibióticos aplicados por vía oral (*p. ej.*, neomicina, metronidazol), carbón activado y jabón ácido.

Kits

45 Además dentro del alcance de la invención están los kits que comprenden al menos un tipo de polimerosomas o composiciones de la presente invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional o uno o más tipos adicionales de polimerosomas de la invención. Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura, materiales de inscripción suministrados en o con el kit, o que de otra manera acompaña al kit. El kit puede comprender, además, uno o más recipientes, reactivos, dispositivos de administración.

Dosificación

55 Las dosis en las que se administran los polimerosomas o las composiciones de los mismos de la invención dependerán de muchos factores que incluyen la edad, otros medicamentos tomados por sujeto (por ejemplo, para otras enfermedades o afecciones) y otros factores clínicamente relevantes. Típicamente, la cantidad de los polimerosomas o composiciones de los mismos de la invención contenida dentro de una dosis única será una cantidad que trata efectivamente la enfermedad o trastorno asociado con el amoniaco y su análogo metilado o síntoma de los mismos (por ejemplo, hiperamonemia, trimetilaminuria) sin inducir una toxicidad significativa.

60 La cantidad efectiva de los polimerosomas o composiciones de los mismos de la invención también se puede medir directamente. La cantidad efectiva puede administrarse diaria o semanalmente o fracciones de la misma. Típicamente, la dosis de polimerosomas de la presente invención expresada en términos de masa de copolímero en bloque varía de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por día (*p. ej.*, 1 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg o 250 mg/kg de peso corporal por día). Las dosis se pueden proporcionar en un régimen de dosis única o múltiple. Por ejemplo, en algunas modalidades, la cantidad efectiva puede variar de aproximadamente 250 mg a

aproximadamente 500 mg por día, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg por día, aproximadamente 1 gramo por día, aproximadamente 2-12 gramos por día, de aproximadamente 14 g a aproximadamente 86 gramos de la composición por semana, etc.

5 La presente invención abarca cualquier combinación de los copolímeros en bloque descritos en la presente descripción, o composiciones que los comprenden, en las relaciones descritas en la presente descripción, preparadas usando el disolvente y las soluciones ácidas o ácidos descritas en la presente descripción usando las técnicas de mezclado de la fase orgánica y la fase acuosa descritas anteriormente.

10 El uso de los términos "un", "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o se contradiga evidentemente por el contexto.

15 Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye pero sin limitarse a") a menos que se indique lo contrario.

20 La relación de intervalos de valores en la presente descripción solo pretende servir como un método de escritura rápido para referirse individualmente a cada valor separado comprendido dentro del intervalo, a menos que se indique de otra forma en la presente descripción, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si se indicara individualmente en la presente descripción. Todos los subconjuntos de valores dentro de los intervalos se incorporan además en la descripción como si se mencionaran individualmente en la presente descripción.

25 Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de otra manera.

30 El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representan una limitación en el alcance de la invención al menos que se reivindique de cualquier otra forma.

Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

35 En la presente descripción, el término "aproximadamente" tiene su significado habitual. En las realizaciones, puede significar más o menos 10 % del valor numérico calificado.

40 A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

La presente invención se ilustra en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **EJEMPLO 1: Absorción de amoníaco *in vitro* por liposomas preparados usando un método de hidratación de películas**

50 *Preparación de liposomas.* Liposomas compuestos de (i) 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), (ii) colesterol y (iii) 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanol-amina-N-[metoxi (PEO) -2000] (DSPE-PEO) a 54:45:1 en % moles fueron preparados mediante el método de hidratación de películas. Se prepararon soluciones madre de DPPC 36,7 mg/mL, DSPC 39,5 mg/mL, colesterol 19,3 mg/mL y DSPE-PEO 13,9 mg/mL en cloroformo.

55 Para los liposomas DSPC, se adicionaron 8,2 mg de colesterol, 20,2 mg de DSPC y 1,3 mg de DSPE-PEO como soluciones madre de cloroformo a un vial de vidrio. Para los liposomas DPPC, se adicionaron 19,7 mg de DPPC, 8,7 mg de colesterol y 1,4 mg de DSPE-PEO como soluciones madre de cloroformo a un vial de vidrio. El disolvente orgánico se eliminó posteriormente mediante flujo de nitrógeno durante 2h y se almacenó al vacío durante la noche. La película seca se hidrató con 1 ml de solución de ácido cítrico 250 mM a pH 2,0 a 300 mOsmol/kg (concentración de lípidos = 29,8 mg/mL) mientras se calentaba a 55 °C y se mezclaba lentamente hasta que la película de lípidos ya no fuera visible. Los liposomas encapsulan la solución de ácido cítrico de pH 2. Al final del proceso, hay ácido cítrico dentro y fuera de los liposomas.

60 *Absorción de amoníaco *in vitro*.* El gradiente de pH transmembrana se generó en celdas de difusión horizontales mantenidas a 37 °C por dilución en un amortiguador de fosfato (concentración final 50 mM) con ajuste a pH 6,8 y 300 mOsmol/kg en ausencia y presencia de sales biliares colato de sodio (SC) y desoxicolato de sodio (SDC, ambos de 25 mM). El sistema de doble cámara se separó por una membrana de policarbonato (tamaño de poro = 50 nm), aislando físicamente los liposomas en un lado. Las concentraciones de lípidos y amoníaco dentro de las celdas de

difusión fueron de 1,75 mg/mL y 1,5 mM, respectivamente. En el tiempo asignado, se tomaron alícuotas de 40 μ L del compartimento libre de liposomas y la concentración de amoníaco se determinó mediante la reacción de Berthelot usando cantidades equivolúmetricas de solución alcalina de hipoclorito de sodio y solución de fenol-nitroprusiato. La capacidad de absorción de amoníaco se cuantificó usando la ecuación 1:

$$\text{Capacidad de absorción de amoníaco} = \frac{\text{Amoníaco encapsulado } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total de lípidos [g]}} = \frac{\text{Amoníaco total } [\mu\text{mol}] - \text{Amoníaco libre } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total de lípidos [g]}} \quad \text{Ec. 1}$$

Las formulaciones de liposomas fueron capaces de capturar amoníaco en un amortiguador de fosfato pero no en un medio que contiene sal biliar (n=3). Los resultados se reportan en la Figura 1. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 2: Absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas PBD-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PBD/PEO de aproximadamente (es decir, redondeado a un decimal) 1,7 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico

Preparación de polimerosomas. Los polimerosomas de PBD-*b* PEO se produjeron usando un método de emulsión de aceite en agua (o/w). Más particularmente, sesenta mg de PBD-*b*-PEO (relación de peso molecular promedio en número (Mw) de PBD/PEO de aproximadamente 1,7 (es decir, 2500 g/mol/1500 g/mol), PBD (2500)-*b*-PEO (1500)) se disolvieron en 100 μ L de diclorometano. La solución de polímero en diclorometano (fase de disolvente orgánico que contiene polímero, es decir, fase oleosa) se adicionó gota a gota a 1 ml de solución de ácido cítrico 250 mM a pH 2,0 a 300 mOsmol/kg (fase acuosa ácida), bajo sonicación (amplitud 70, ciclo 0,75, duración 3 minutos) en un baño de hielo durante 3 minutos para formar una emulsión que tiene una relación disolvente/fase acuosa del 9 % (v/v). El disolvente orgánico se evaporó usando un evaporador rotatorio durante al menos 5 minutos a 40 °C. Los polimerosomas encapsulan la solución de ácido cítrico de pH 2. Al final del proceso, hay ácido cítrico dentro y fuera de los polimerosomas.

*Absorción de amoníaco *in vitro*.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió mediante celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 1 con una concentración de polímero de 1,75 mg/mL. La capacidad de absorción de amoníaco se cuantificó usando la ecuación 2:

$$\text{Capacidad de absorción de amoníaco} = \frac{\text{Amoníaco encapsulado } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total de polímero [g]}} = \frac{\text{Amoníaco total } [\mu\text{mol}] - \text{Amoníaco libre } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total de polímero [g]}} \quad \text{Ec. 2}$$

Los polimerosomas de PBD PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un amortiguador de fosfato pero no en medio que contiene una sal biliar (n=3). Los resultados se reportan en la Figura 2. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 3: La absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA con una relación de Mw promedio en número de PDM/PMOXA de aproximadamente 2,4 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico.

Preparación de polimerosomas. Polimerosomas PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA (relación de Mw promedio en número de PDMS/PMOXA de aproximadamente 2,4 (PMOXA (520)-*b*-PDMS (2530) -*b*-PMOXA (520))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

*Absorción de amoníaco *in vitro*.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 2 sin sales biliares (es decir, solo amortiguador de fosfato).

Los polimerosomas PMOXA PDMS PMOXA no fueron capaces de capturar amoníaco en un medio libre de sales biliares (es decir, solo amortiguador de fosfato) (n=3). Los resultados se reportan en la Figura 3. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 4: Absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 o 2,5 preparados usando un método de hidratación de películas.

Preparación de polimerosomas. Los polimerosomas de PS-*b*PEO se produjeron usando un método de hidratación de películas. Más particularmente, 29,8 mg de PS-*b*-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS (2600)-*b*-PEO(2000)) o de aproximadamente 2,5 (PS(5150)-*b*-PEO (2060))) se disolvieron

en 100 μ L de diclorometano y se adicionaron a un vial de vidrio. El disolvente orgánico se eliminó posteriormente mediante flujo de nitrógeno durante 2h y se almacenó al vacío durante la noche. La película seca se hidrató con 1 ml de solución de ácido cítrico 250 mM a pH 2,0 a 300 mOsmol/kg con calentamiento a 65 °C y sonicación durante 1,25 h.

Absorción de amoníaco in vitro. La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 3 (es decir, solo amortiguador de fosfato).

Los polimerosomas de PS PEO no fueron capaces de capturar amoníaco en un medio libre de sales biliares (es decir, solo amortiguador de fosfato) (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 4. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 5: Absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,0 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico.

Preparación de polimerosomas. Polimerosomas de PD-*b*-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,0 (PS(1970)-*b*-PEO (2000))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

Absorción de amoníaco in vitro. La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 2 con una composición de sales biliares modificadas (SC 30 mM, SDC 30 mM, taurocolato de sodio (STC) 30 mM, pH final 6,8 y osmolalidad 300 mOsmol/kg). Esta concentración de sal biliar corresponde al doble de la concentración fisiológica.

Los polimerosomas de PS PEO no fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 5. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 6: Absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas a altas concentraciones de sales biliares de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO entre aproximadamente 1,3 y 2,8 preparadas mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano o tolueno como disolvente orgánico

Preparación de polimerosomas. Polimerosomas PD-*b*-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS (2600)-*b*-PEO(2000)), de aproximadamente 1,6 (PS (3150)-*b*-PEO(2000)), de aproximadamente 1,8 (PS(3570)-*b*-PEO (2000)), de aproximadamente 2,0 (PS(3900) -*b*-PEO(2000)), o de aproximadamente 2,5 (PS(5150)-*b*-PEO(2060))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2. Los polimerosomas PS PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 2,8 (PS(6000) -*b*-PEO(2180))) se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 pero usando tolueno en lugar de diclorometano como disolvente orgánico, y usando una cantidad de polímero menor (veinte mg).

Absorción de amoníaco in vitro. La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5 para los polimerosomas con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 a 2,5. Los polimerosomas PS PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 2,8 (PS(6000)-*b*-PEO(2180))) se evaluaron como se describe en el Ejemplo 5 con una concentración de fosfato modificada (25 mM) a 440 mOsmol/kg y pH 6,8.

Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 6. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

EJEMPLO 7: Absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 3,8 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico.

Síntesis de polímeros. PD-*b*-PEO se sintetizó mediante polimerización por radicales de transferencia atómica (ATRP). Primero, el monometil éter del PEO disponible comercialmente (2150 g mol⁻¹) se hizo reaccionar con bromuro de bromoisobutirilo (5,0 eq) y trietilamina (5,0 eq) en THF, para producir un macroiniciador. En la reacción de polimerización posterior, este macroiniciador (1,0 eq), CuBr (1,6 eq) y 4,4'-dionil-2,2'-dipiridilo (1,4 eq) se transfirieron a un matraz Schlenk y se desgasificaron mediante ciclos de argón al vacío. Se adicionó estireno (70 eq) en un matraz separado y se desgasificó, usando argón, antes de ser transferido al matraz de reacción. La reacción se condujo a 115 °C durante 24 horas. La purificación del producto final se logró haciendo pasar la solución a través de una columna de alúmina básica, seguida de dos precipitaciones en hexano. El peso molecular promedio en número del polímero se

determinó mediante Espectroscopía de ^1H NMR, que compara el valor integral de la cadena de PEG con los picos de poliestireno aromático, lo que da como resultado una composición polimérica de PS(8100)-b-PEO(2150).

5 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosomas de PD-b-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 3,8 (PS(8100)-b-PEO(2150))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

Absorción de amoníaco in vitro. La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5 con una concentración del polímero modificado de 1,24 mg/mL.

10 Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 7. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

15 **EJEMPLO 8: La absorción de amoníaco in vitro a altas concentraciones de sales biliares por polimerosomas de PS-b-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando cloroformo como disolvente orgánico**

20 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosoms de PD-b-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS(2600)-b-PEO(2000))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2 usando cloroformo en lugar de diclorometano como disolvente orgánico.

25 *Absorción de amoníaco in vitro.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5.

Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 8. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

30 **EJEMPLO 9: La absorción de amoníaco in vitro en condiciones hipo e hiperosmolares por polimerosomas PS-b-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 o 2,5 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico**

35 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosomas PD-b-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS(2600)-b-PEO(2000)) o de aproximadamente 2,5 (PS(5150)-b-PEO (2060))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

40 *Absorción de amoníaco in vitro.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió mediante celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5 con amortiguadores modificados a pH 6,8 (condiciones hiposmolares: amortiguador de fosfato 10 mM que contiene SC 25 mM y SDC 25 mM, osmolalidad final 160 mOsmol/kg; condiciones hiperosmolares: amortiguador de fosfato 50 mM que contiene SC 30 mM, SDC 30 mM y STC 30 mM bajo la adición de cloruro de sodio alcanzando una osmolalidad final de 620 mOsmol/kg, es decir, condiciones extremas más drásticas que las encontradas en el tracto GI en condiciones fisiológicas).

45 Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar en condiciones hipo e hiperosmolares (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 9. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

50 **EJEMPLO 10: Absorción de amoníaco in vitro en presencia de enzimas digestivas por polimerosomas de PS-b-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 2,5 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico**

55 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosomas PD-b-PEO (con relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 2,5 (PS(5150)-b-PEO(2060))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

60 *Absorción de amoníaco in vitro.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió mediante celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5 con un amortiguador modificado a pH 6,8 y 300 mOsmol/kg (amortiguador de fosfato 50 mM, SC 12,5 mM, SDC 12,5 mM, tripsina de páncreas porcino 1 mg/mL (aproximadamente 10 000 unidades/mL), α -quimotripsina de páncreas bovino (Tipo II) 1 mg/mL (aproximadamente 40 unidades/mL), lipasa de páncreas porcino (Tipo II) 3 mg/mL (aproximadamente 300 unidades/mL)). La actividad de las enzimas corresponde a la actividad de la proteasa y la lipasa en el fluido intestinal simulado United States Pharmacopeia (USP 39 - NF 34). La concentración de sal biliar más baja que la usada en el Ejemplo 5 se seleccionó para asegurar la actividad enzimática, y la cinética se limitó a cuatro horas para evitar interferencias por productos de degradación de las enzimas digestivas.

65

Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene enzimas digestivas y sal biliar (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 10. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

5 **EJEMPLO 11: Absorción de amoníaco *in vitro* a altas concentraciones de potasio por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico**

10 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosomas de PD-*b*-PEO (relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS(2600)-*b*-PEO(2000))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

15 *Absorción de amoníaco *in vitro*.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 5 con una concentración de potasio de 250 mM (pH final 6,8 y osmolalidad 700 mOsmol/kg).

20 Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio que contiene sal biliar a una concentración de potasio de 250 mM (n=3). Los resultados se presentan en la Figura 11. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3 y las barras de error representan la desviación estándar.

25 **EJEMPLO 12: Absorción de amoníaco *in vitro* por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico y con concentraciones variables de ácido**

30 *Preparación de polimerosomas.* Polimerosomas de PD-*b*-PEO (con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aproximadamente 1,3 (PS(2600)-*b*-PE (2000))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2 usando solución de ácido cítrico 100 mM (115 mOsmol/kg), 200 mM (230 mOsmol/kg), 250 mM (300 mOsmol/kg), 300 mM (340 mOsmol/kg), 400 mM (460 mOsmol/kg), 500 mM (580 mOsmol/kg) o 600 mM (700 mOsmol/kg) a pH 2,0.

35 *Absorción de amoníaco *in vitro*.* La absorción de amoníaco *in vitro* se estudió por medio de celdas de difusión horizontales como se describe en el Ejemplo 3 (es decir, solo amortiguador de fosfato) a pH 6,8 (osmolalidad final: 300 - 400 mOsmol/kg).

40 Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar amoníaco en un medio libre de sales biliares (n= 3-4). Los resultados se presentan en la Figura 12. Cada punto en el gráfico representa el promedio del grupo n=3-4 y las barras de error representan la desviación estándar. La capacidad de absorción de amoníaco en los polimerosomas con gradiente de pH transmembrana (amoníaco capturado por gramo de polímero) fue más de 20 veces mayor que la de las micropartículas adsorbentes de amoníaco hechas de carbón activado AST-120 (amoníaco capturado por gramo de carbón, Bosoi y otros, *supra*)

45 **EJEMPLO 13: Absorción de TMA *in vitro* a altas concentraciones de sal biliar y después de una exposición previa a una emulsión O/W por polimerosomas de PS-*b*-PEO con una relación de Mw promedio en número de PS/PEO entre aproximadamente 1,4 y 2,0 preparados mezclando la fase de disolvente orgánico que contiene el polímero con la fase ácida acuosa usando diclorometano como disolvente orgánico**

50 *Preparación de polimerosomas.* Poliestireno-*b*-poli(óxido de etileno) (relaciones de peso molecular promedio en número (Mw) de PS/PEO aprox. 1,4 (PS(2770)-*b*-PEO(2000)) y aprox. 2,0 (PS(3900)-*b*-PEO(2000))) se produjeron como se describe en el Ejemplo 2.

55 *Absorción de TMA *in vitro*.* El gradiente de pH transmembrana se generó en celdas de difusión horizontales mantenidas a 37 °C por dilución en amortiguador de fosfato 50 mM ajustando a pH 6,8 y 300 mOsmol/L en presencia (relación de Mw promedio en número de PS/PEO aprox. 1,4 y 2,0) o ausencia (relación de Mw promedio en número de PS/PEO aprox. 1,4) de las sales biliares de colato de sodio (SC), desoxicolato de sodio (SDC) y taurocolato de sodio (STC) cada una a 30 mM. En el experimento que implica una exposición previa de los polimerosomas a una emulsión O/W (para imitar la incorporación en una crema o loción), emulsión O/W al 10 % (v/v) (polisorbato 80 al 5 % (m/v), se adicionaron 15 % (v/v) de aceite mineral y solución salina amortiguada con fosfato suficiente para alcanzar el volumen total) a la dispersión de polimerosomas (relación de Mw promedio en número de PS/PEO aprox. 1,4) inmediatamente antes del experimento de absorción.

60 El sistema de doble cámara se separó por una membrana de policarbonato (tamaño de poro = 50 nm), aislando físicamente los polimerosomas en un lado. Las concentraciones de polimerosoma y TMA dentro de las celdas de difusión fueron 1,75 mg/mL y 1,5 mM, respectivamente. En el tiempo asignado, se tomaron alícuotas de 40 µL del compartimento libre de polimerosomas y la concentración de TMA se determinó mediante el PocketChem™ BA PA-4140 (Arkray Inc.) que se calibró con estándares de TMA. La capacidad de absorción de TMA se cuantificó usando la

65

ecuación 3 en la que la concentración total de TMA se refiere a la cantidad de TMA en las celdas a los 10 minutos de incubación:

$$5 \quad \text{Capacidad de absorción de TMA} = \frac{\text{TMA encapsulado } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total del polímero [g]}} = \frac{\text{TMA total } [\mu\text{mol}] - \text{TMA libre } [\mu\text{mol}]}{\text{Masa total del polímero [g]}} \quad \text{Ec. 3}$$

10 Los polimerosomas de PS PEO fueron capaces de capturar TMA en un medio que contiene sal biliar y en una emulsión O/W (n=3). Los datos muestran que los polimerosomas absorbieron eficientemente TMA en condiciones adversas que imitan el ambiente del tracto intestinal o después de la incorporación a una emulsión O/W (*p. ej.*, loción o crema, para administración tópica). Los resultados se presentan en la Figura 13. Cada barra de histograma en el gráfico representa el promedio del grupo (n=3) y las barras de error representan la desviación estándar.

15 REFERENCIAS

Bajaj y otros. *J. Hepatol* 2013; 58:S84.

20 Blankenstein T y otros. (2015). Point-of-care (POC) diagnosis of bacterial vaginosis (BV) using VGTest™ ion mobility spectrometry (IMS) in a routine ambulatory care gynecology clinic. *Archives of gynecology and obstetrics* 292 (2), 355-362.

Bosoi y otros. *Hepatology* 2011; 53:1995-2002.

25 Cashman JR y otros. (1999) In-vitro and in-vivo studies inhibition of human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) in the presence of dietary indoles. *Biochem Pharmacol* 58, 1047-1055.

Cashman JR y otros. (2003). Biochemical and clinical aspects of the human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to trimethylaminuria. *Current drug metabolism*, 4 (2), 151-170.

30 Danks DM y otros. (1976) Trimethylaminuria: diet does not always control the fishy odor. *The New England Journal of Medicine*, 295(17), 962-962

Davankov y Tsyurupa *Reactive Polymers* 1990;13:27-42.

35 Leevy y otros. *Dig Dis Sci* 2007; 52:737-41.

Levy J (2000). The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(1), S8-S10).

40 Matoori y Leroux *ADDR* 2015; 90:55-68.

Mullen y otros. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:1390-1397.e2.

45 Neff y otros. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2013; 5: 143-152

Neuvonen y Elonen *Eur J Clin Pharmacol* 1980; 17:51-57.

Neuvonen y Olkkola *Med Toxicol* 1988; 3:33-58.

50 Poordad *Alim Pharmacol Therap* 2006; 25:3-9.

Rose *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012; 92:321-331.

55 Schulman y otros. *Am J Kidney Dis* 2006; 47:565-577.

Stepanova y otros. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10:1034-1041.e1.

Szoka y Papahadjopoulos. *PNAS* 1978; 75:4194-4198.

60 Tang WW y otros. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine* 368(17), 1575-1584.

65 Tang WW y otros. (2015). Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circulation research* 116(3), 448-455).

- Todd WA (1979). Psychosocial problems as the major complication of an adolescent with trimethylaminuria. *The Journal of pediatrics*, 94(6), 936-937.
- 5 Treacy E y otros. (1995). Trimethylaminuria, fish odour syndrome: a new method of detection and response to treatment with metronidazole. *Journal of inherited metabolic disease*, 18(3), 306-312.
- Vilstrup y otros. *Hepatology* 2014; 60:715-735.
- 10 Yamazaki H y otros. (2004). Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life sciences*, 74(22), 2739-2747.
- Yeung CK y otros. (2007). Functional characterization of genetic variants of human FMO3 associated with trimethylaminuria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464(2), 251-259
- 15 Wang Z y otros (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472(7341), 57-63.
- Wang Z y otros (2015). Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* 163(7), 1585-1595.
- 20 Wilcken B (1993). Acid soaps in the fish odour syndrome. *BMJ: British Medical Journal*, 307(6917), 1497.
- Wise PM y otros. (2011). Individuals reporting idiopathic malodor production: demographics and incidence of trimethylaminuria. *The American journal of medicine* 124(11), 1058-1063.
- 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polimerosoma que comprende (a) una membrana, que comprende un copolímero en bloque de poli(estireno) (PS) y poli(óxido de etileno) (PEO), en donde la relación de peso molecular PS/PEO es mayor que 1,0 y menor que 4,0; y (b) un núcleo que encierra un ácido.
2. El polimerosoma de la reivindicación 1, en donde el copolímero en bloque es un copolímero dibloque.
- 10 3. El polimerosoma de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido está en una concentración que produce un pH entre 1 y 6, cuando el polimerosoma se hidrata.
4. El polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el ácido está dentro de una solución ácida acuosa.
- 15 5. El polimerosoma de la reivindicación 4, en donde el pH dentro de la solución ácida acuosa está entre 1 y 6.
6. El polimerosoma de la reivindicación 3 o 5, en donde el pH está entre 2 y 5, o preferiblemente entre 2 y 4.
- 20 7. El polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ácido es un hidroxíácido, más preferiblemente un ácido cítrico.
8. El polimerosoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preparado por un método que comprende mezclar un disolvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido.
- 25 9. El polimerosoma de la reivindicación 8, en donde el disolvente orgánico es inmisible en agua o parcialmente miscible en agua.
10. El polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, cuyo núcleo encierra además amoníaco o su análogo metilado, y el análogo metilado es preferiblemente TMA.
- 30 11. Una composición que comprende el polimerosoma definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. La composición de la reivindicación 11, en donde la composición está en forma líquida, semisólida o sólida.
13. El polimerosoma de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición de la reivindicación 11 o 12, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados con el amoníaco o análogos metilados del amoníaco, o un síntoma de los mismos, y preferiblemente hiperamonemia o trimetilaminuria.
- 40 14. Un método para fabricar el polimerosoma definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:
 - a. disolver el copolímero en bloque de PS y PEO en un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente orgánico inmisible en agua o parcialmente miscible en agua, para formar una fase orgánica que contiene el copolímero;
 - 45 b. mezclar la fase de disolvente orgánico que contiene el copolímero con una fase acuosa que contiene el ácido para formar el polimerosoma; y
 - c. eliminar el disolvente orgánico.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en donde la fase acuosa comprende entre 50 y 700 mM de ácido.

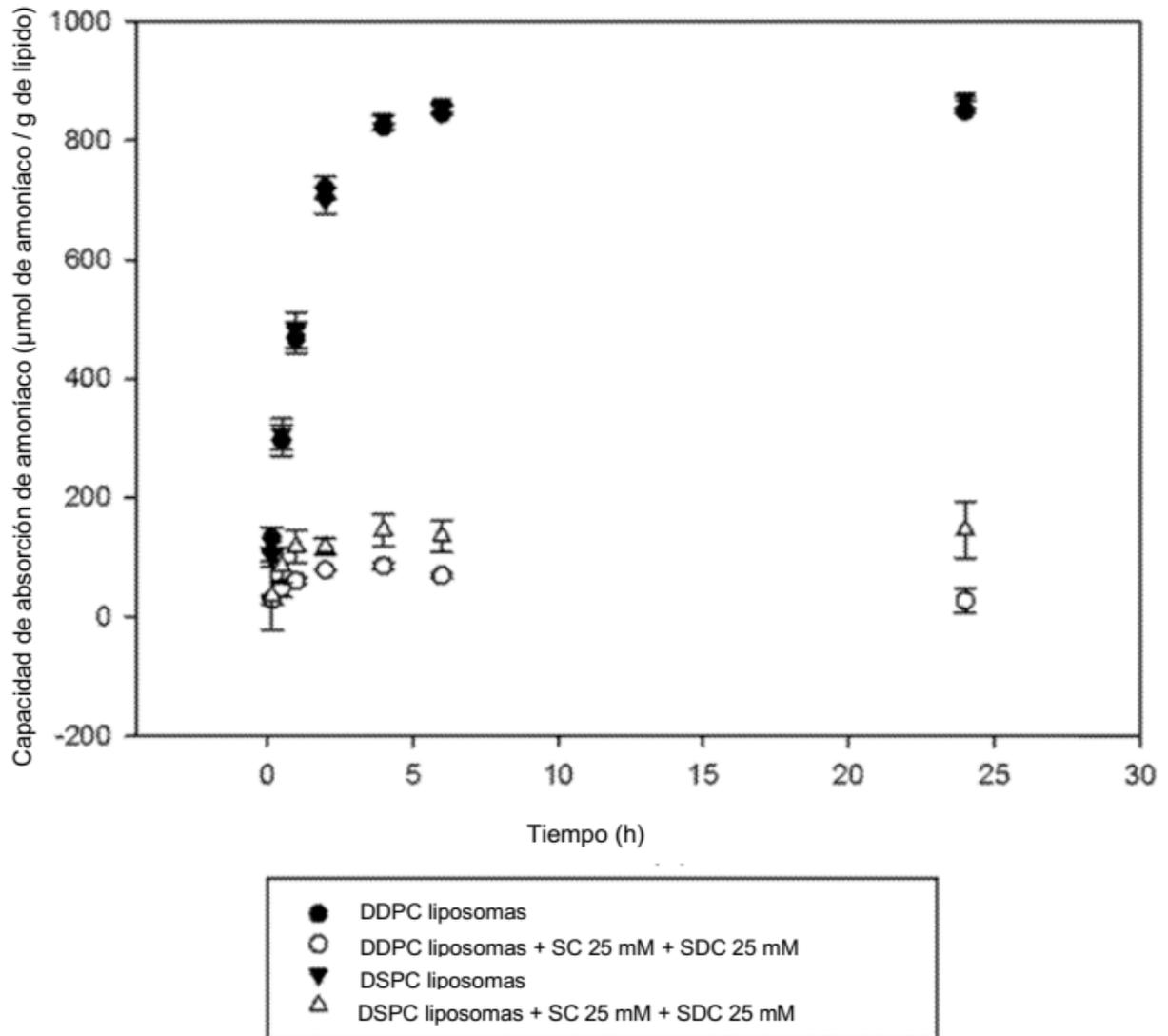


FIGURA 1

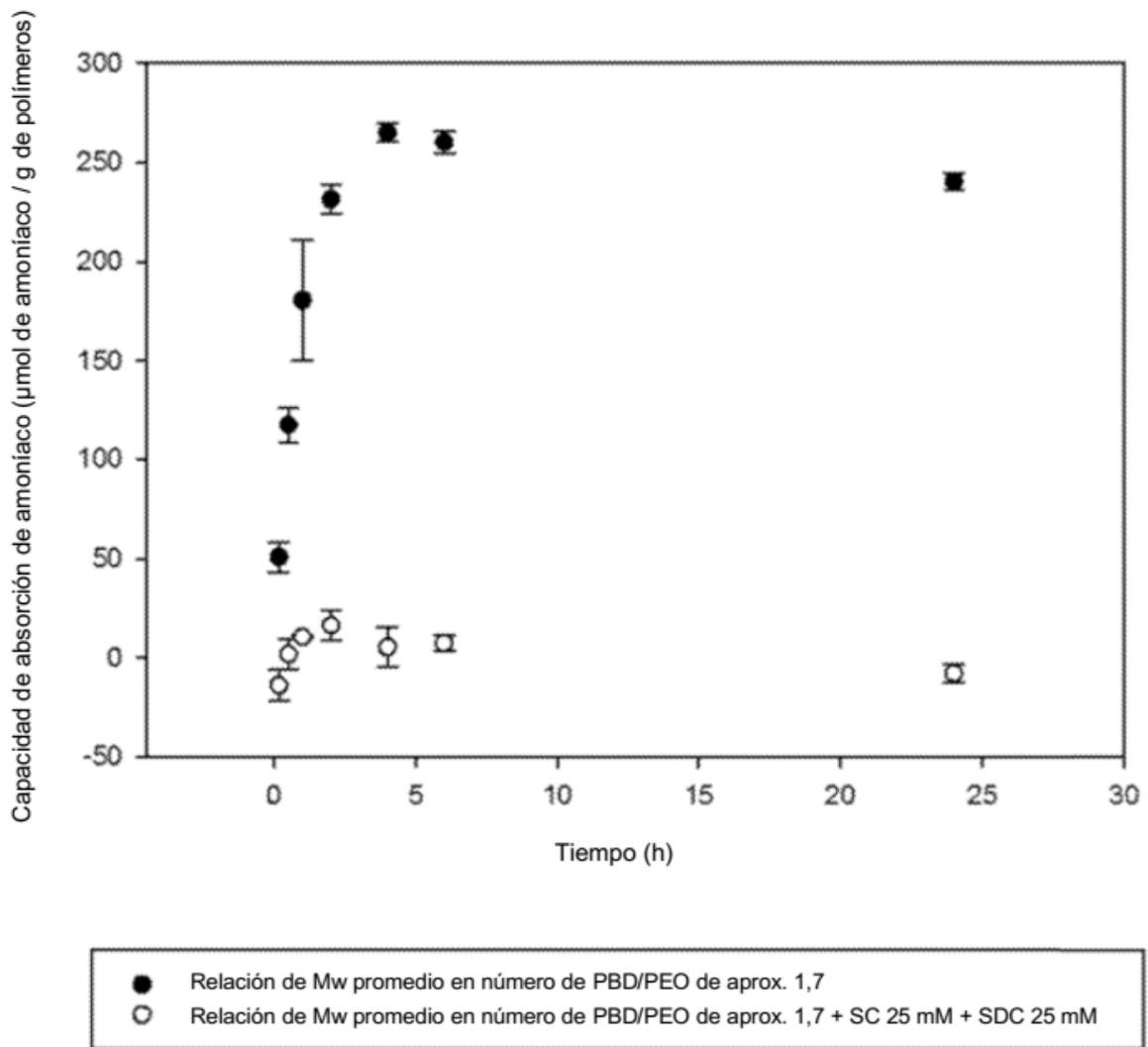


FIGURA 2

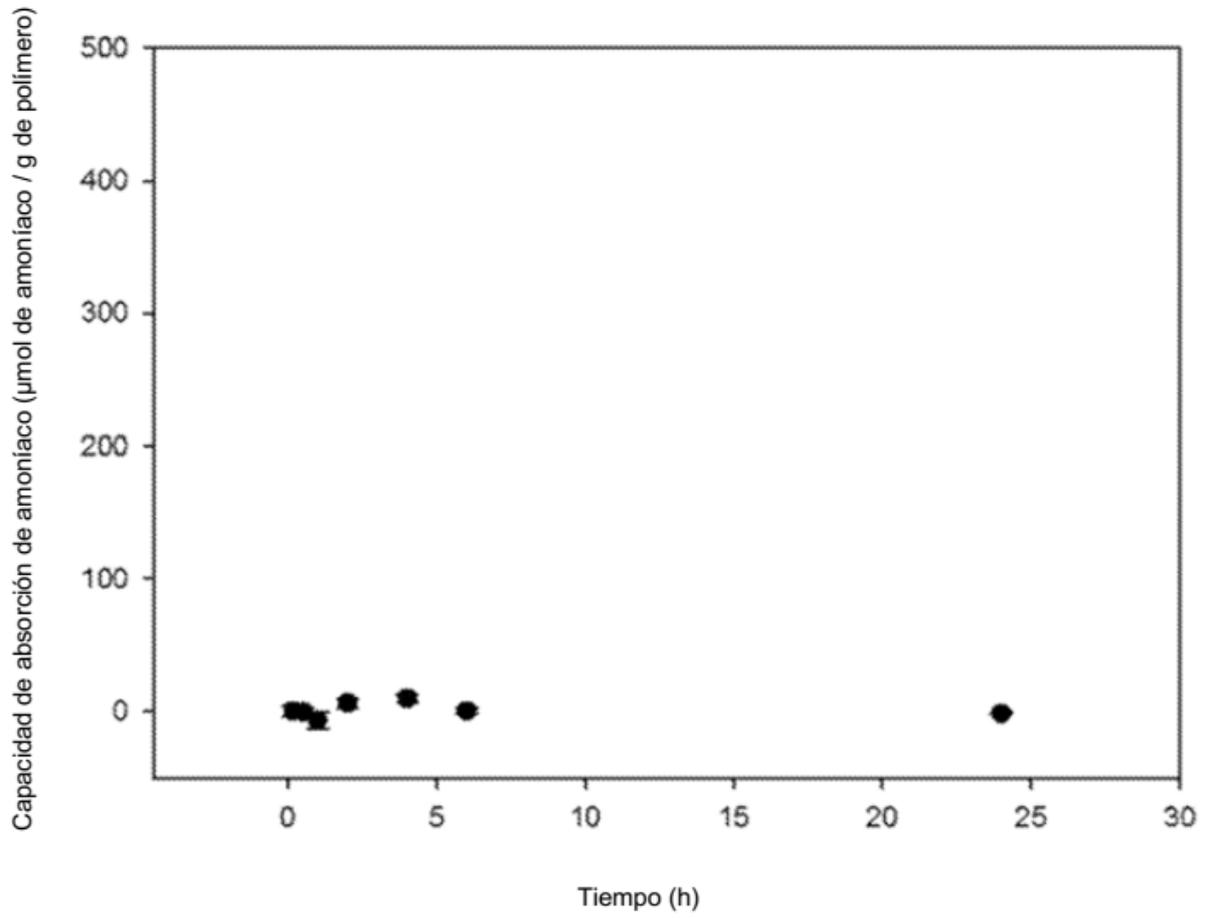
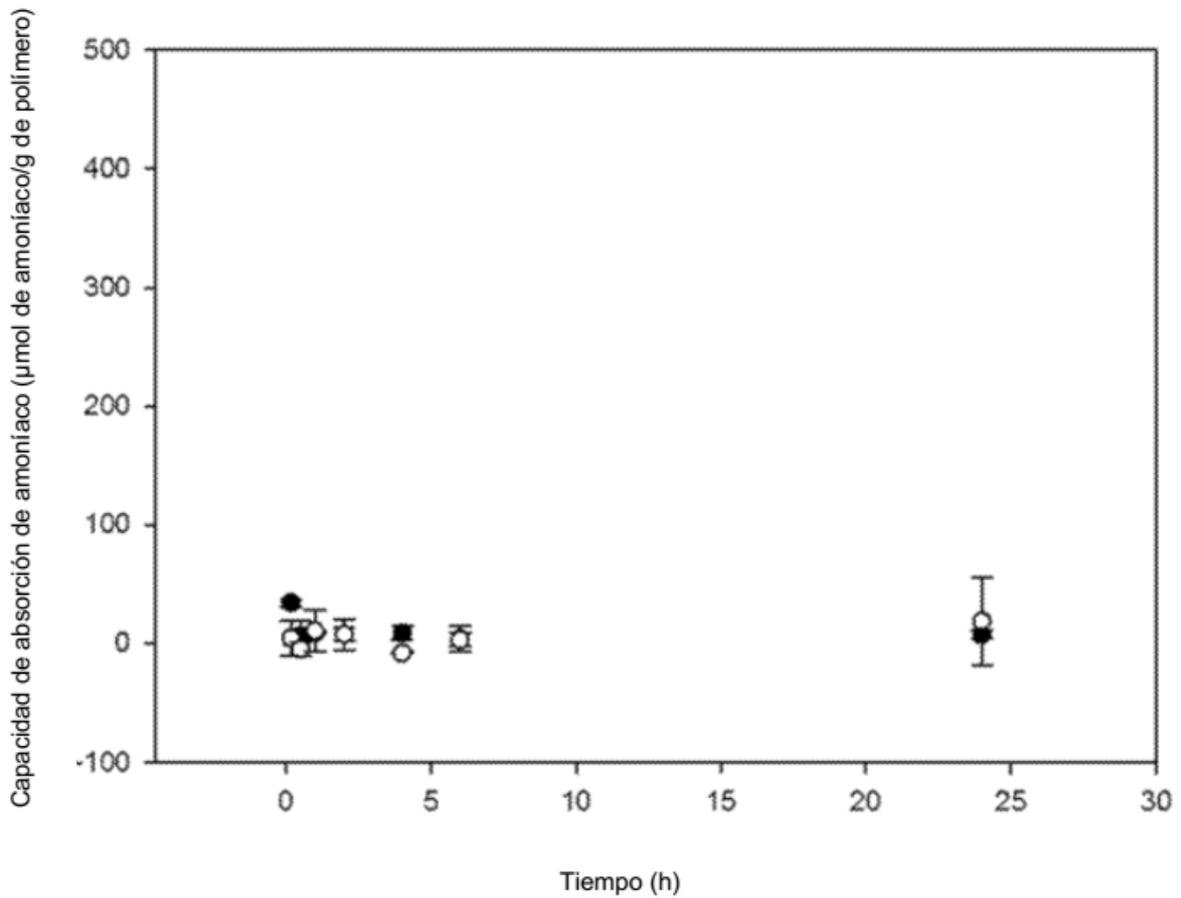


FIGURA 3



- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 preparado mediante hidratación de película
- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 2,5 preparado mediante hidratación de película

FIGURA 4

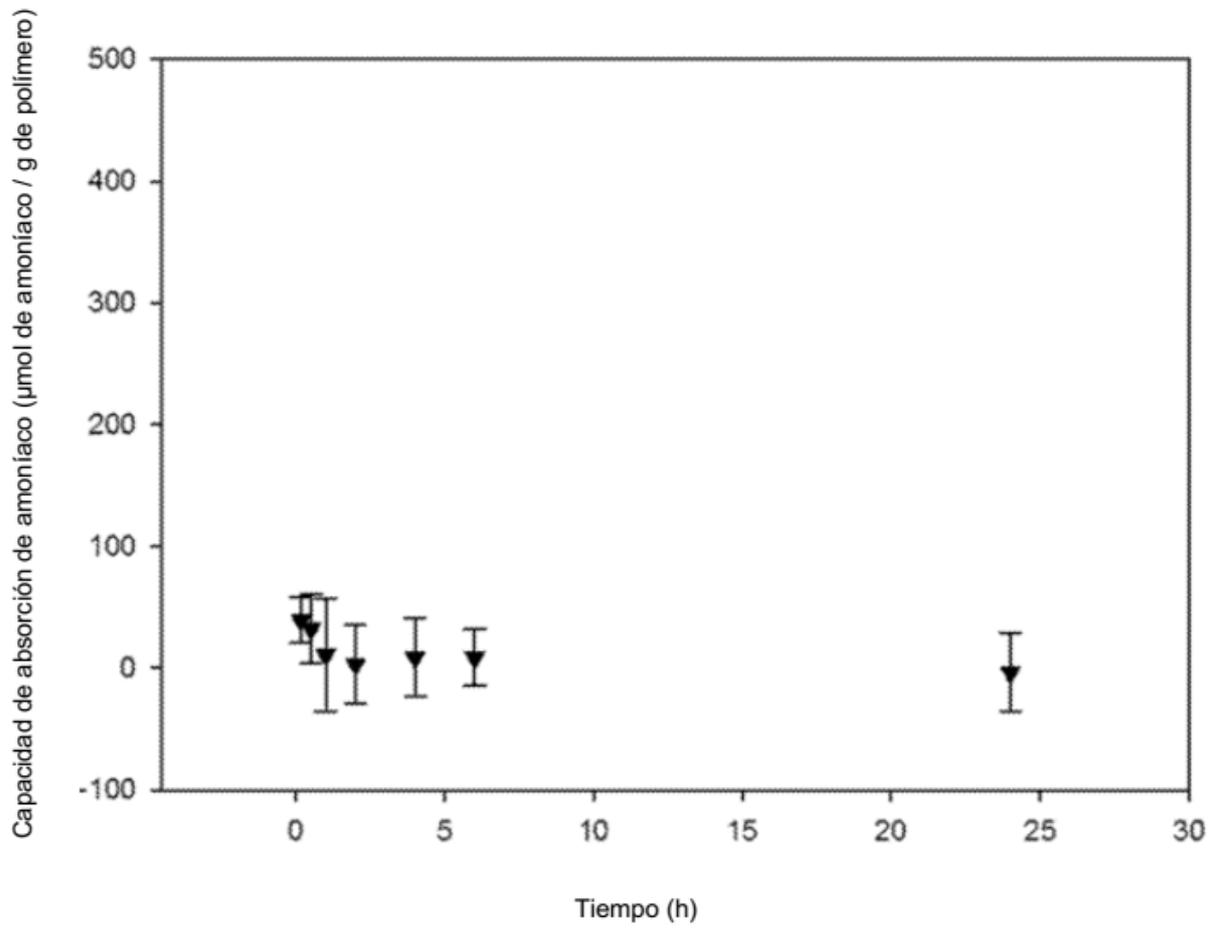


FIGURA 5

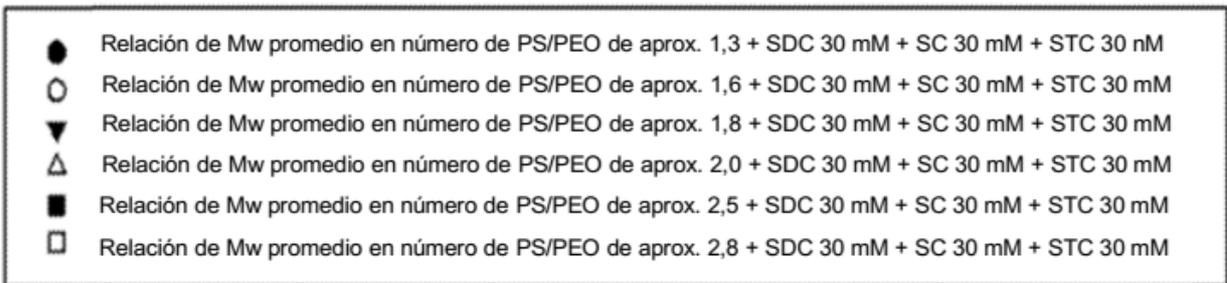
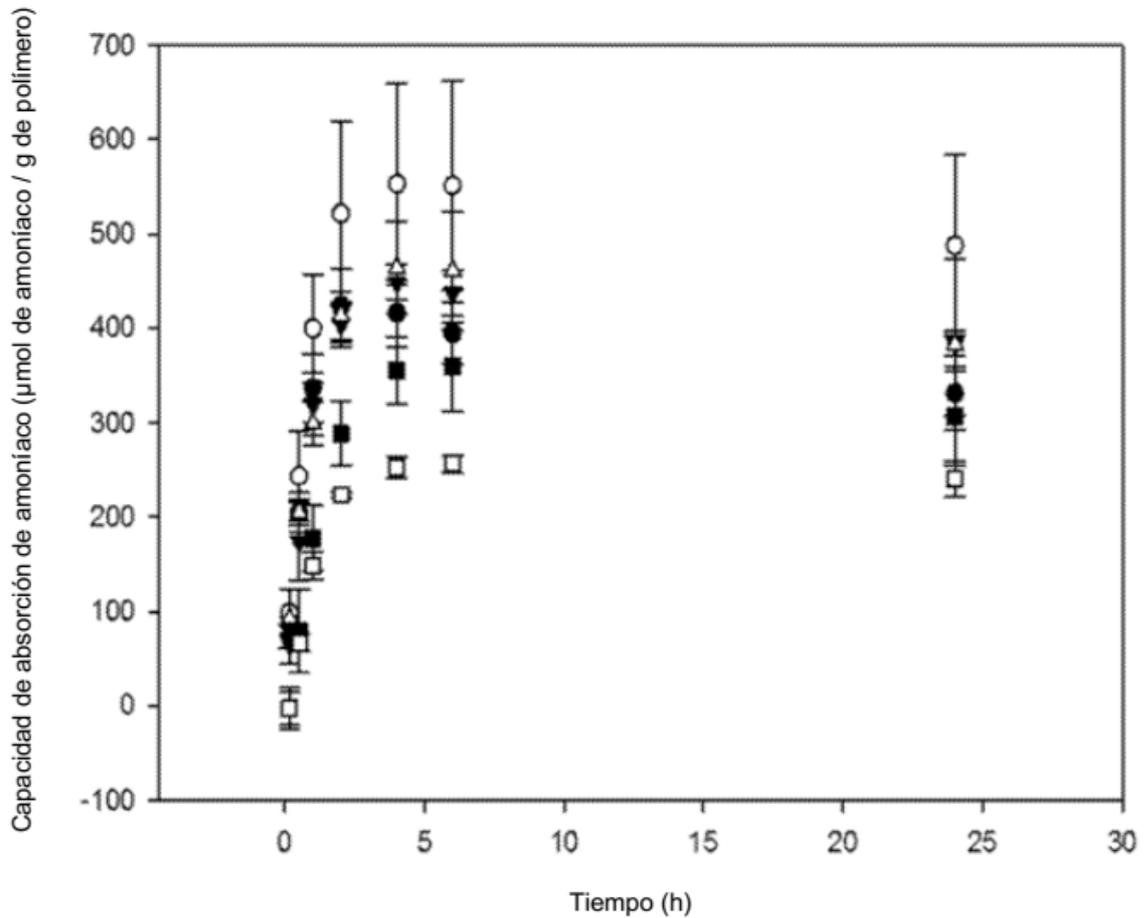


FIGURA 6

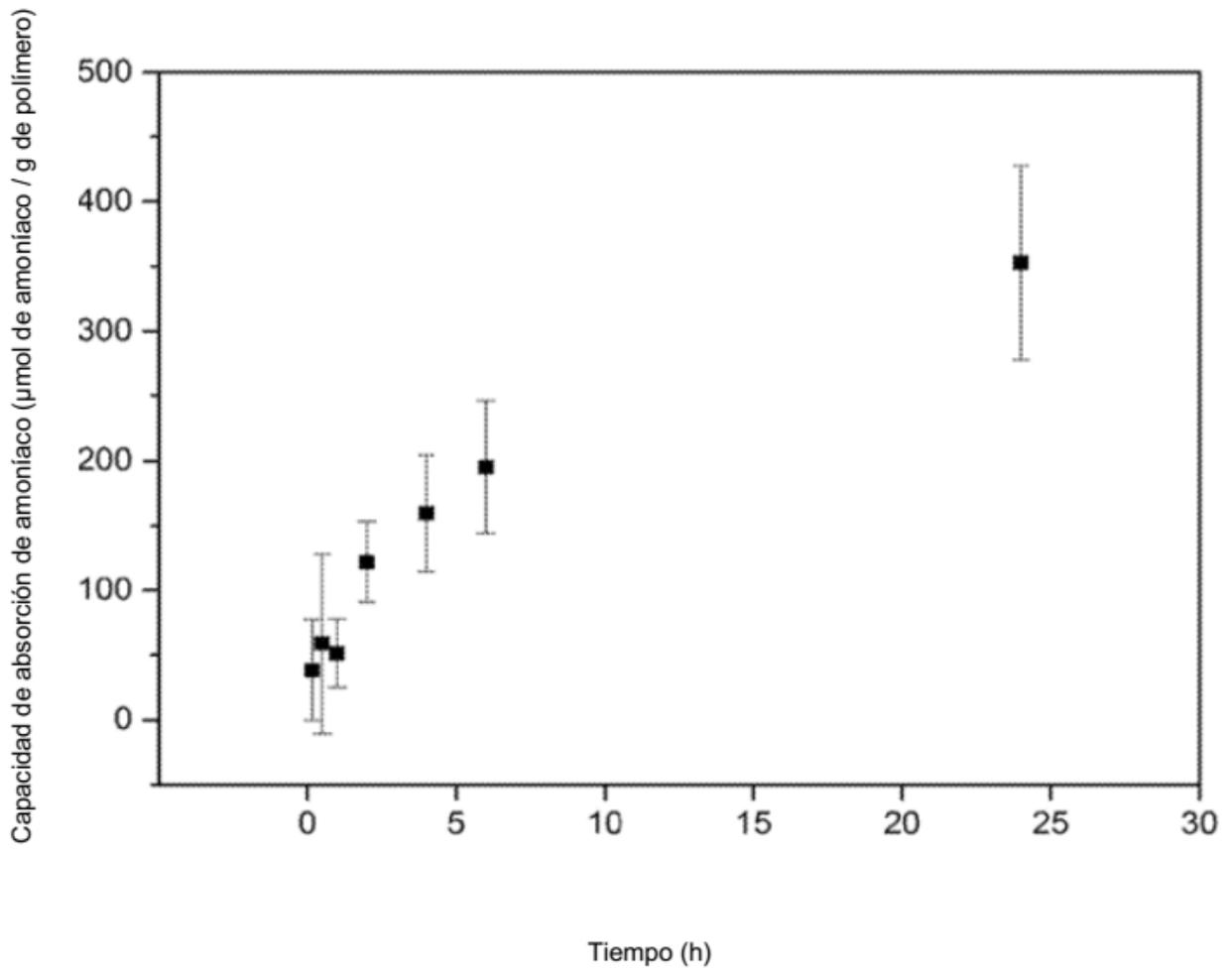


FIGURA 7

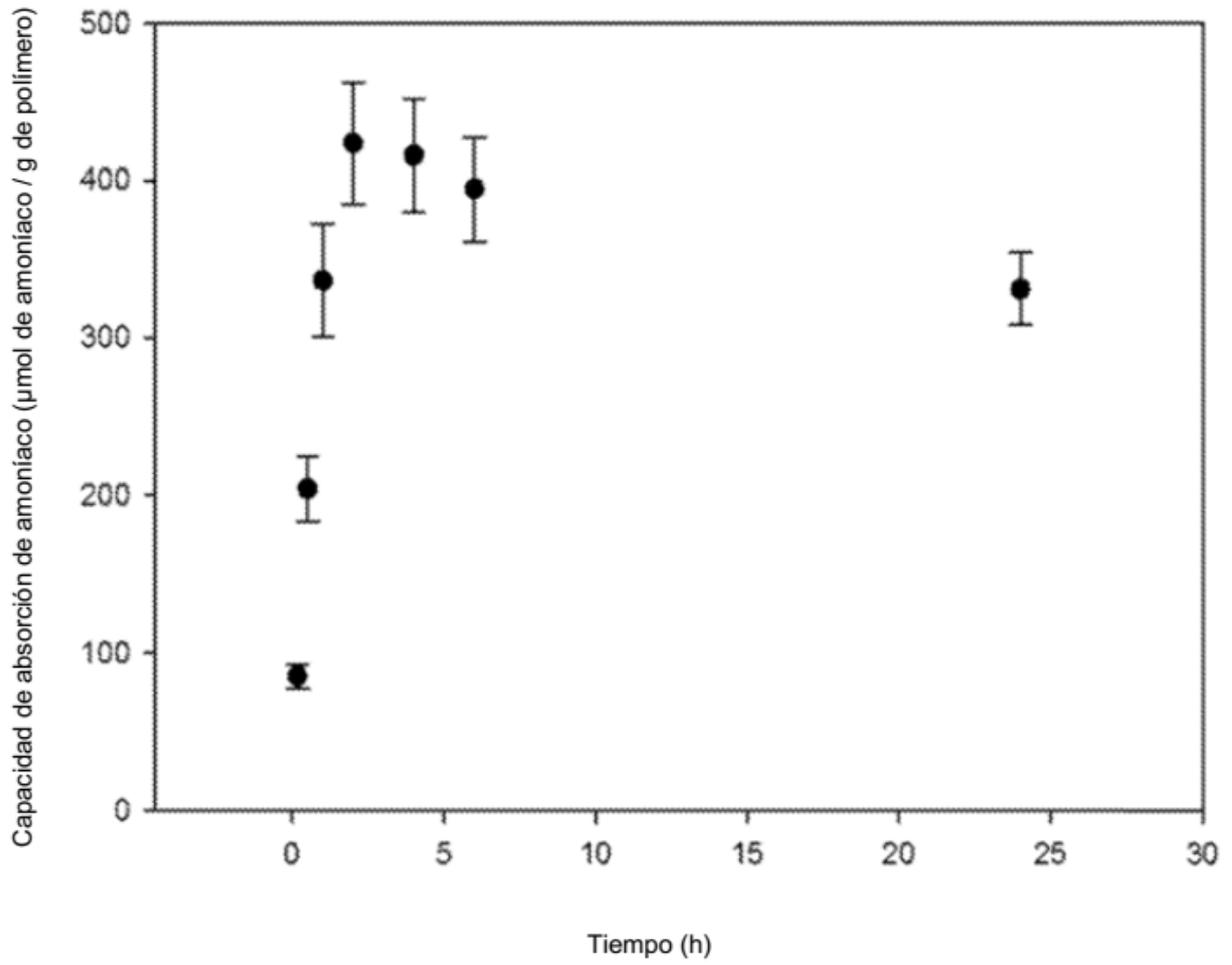
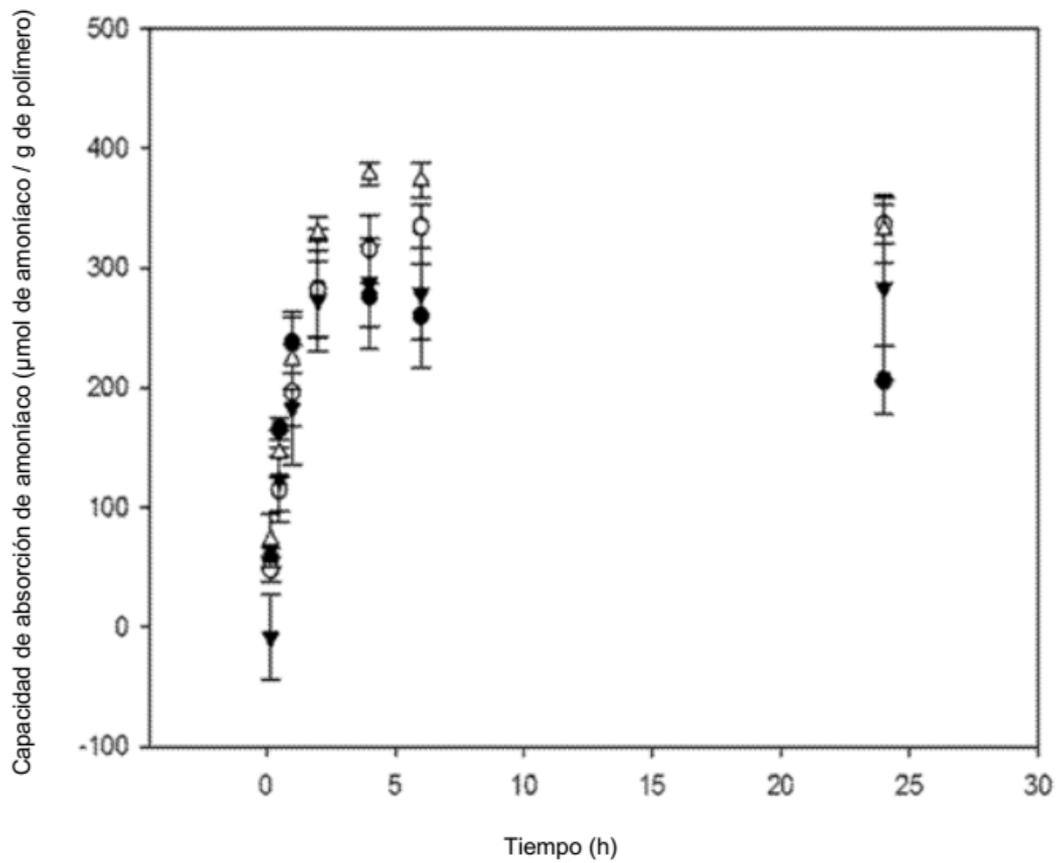


FIGURA 8



- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 + SDC 25 mM + SC 25 mM (160 mOsm/L)
- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 + SDC 30 mM + SC 30 mM + STC 30 mM (620)
- ▼ Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 2,5 + SDC 25 mM + SC 25 mM
- △ Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 2,5 + SDC 30 mM + SC 30 mM + STC 30 mM (620)

FIGURA 9

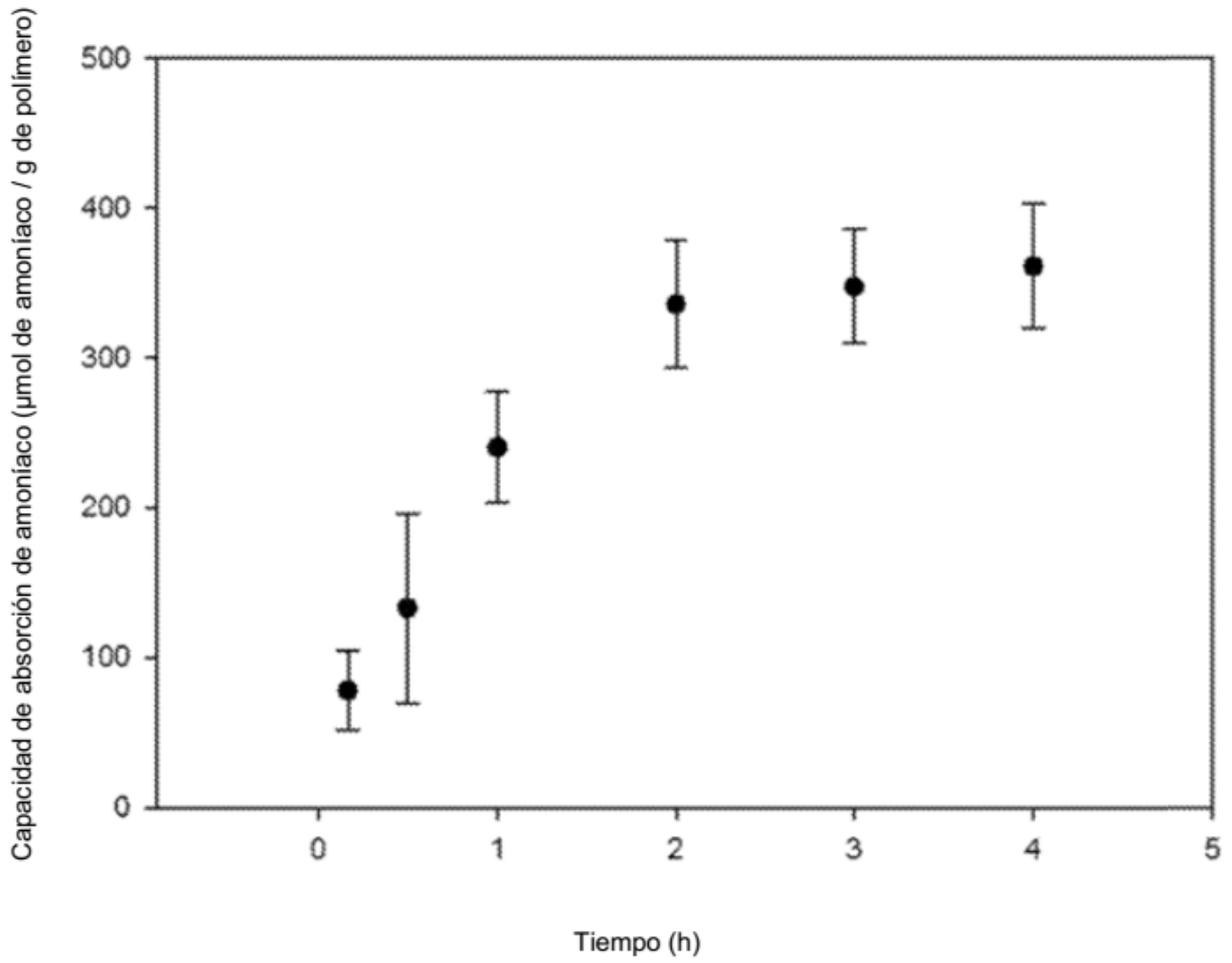


FIGURA 10

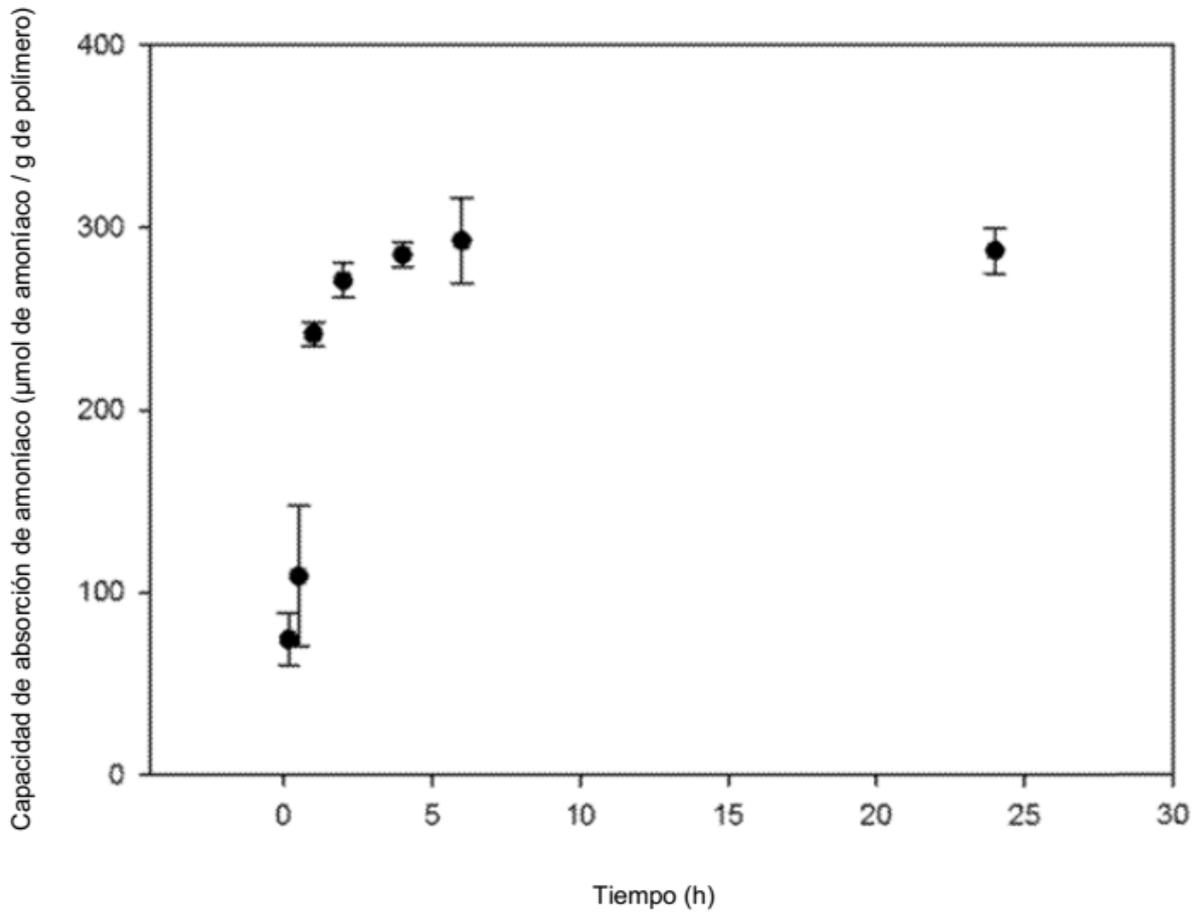
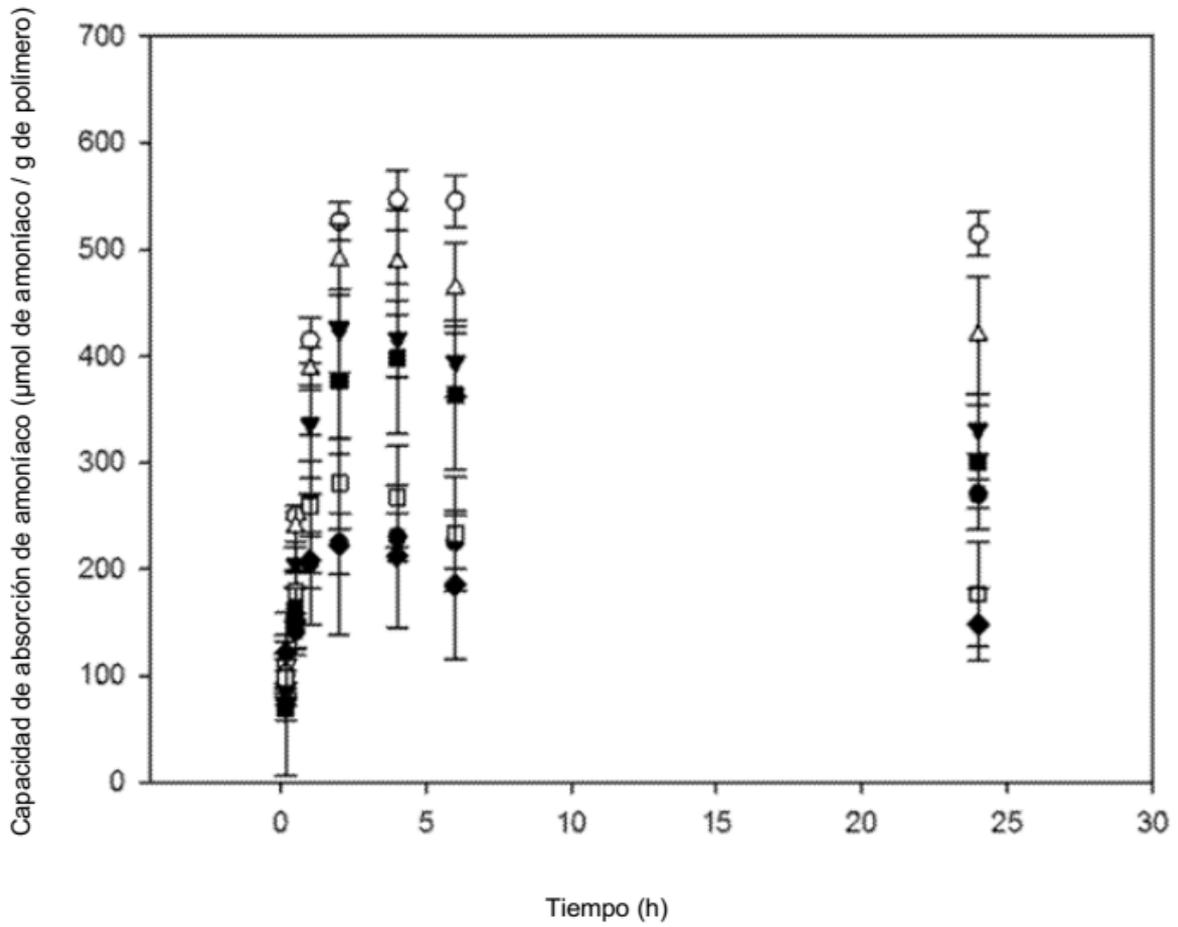


FIGURA 11



- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 100 mM
- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 200 mM
- ▼ Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 250 mM
- △ Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 300 mM
- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 400 mM
- Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 500 mM
- ◆ Relación de Mw promedio en número de PS/PEO de aprox. 1,3 con solución de ácido cítrico 600 mM

FIGURA 12

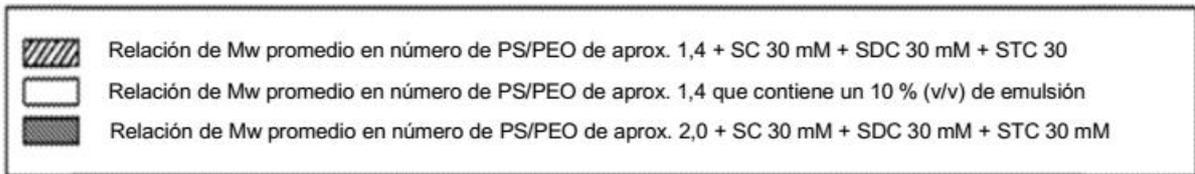
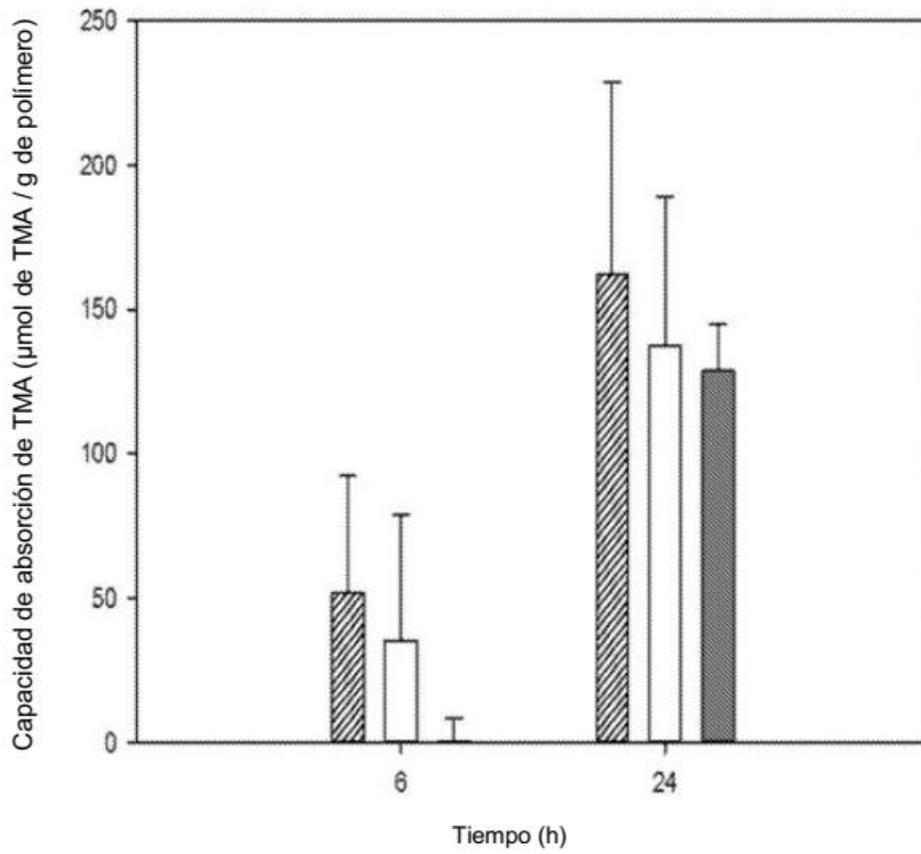


FIGURA 13