



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 356 925**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07D 319/06 (2006.01)

C07D 321/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06710000 .8**

(96) Fecha de presentación : **02.03.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1853254**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

(54) Título: **Moduladores de citocinas que usan glicéridos cíclicos de ácidos grasos poliinsaturados esenciales.**

(30) Prioridad: **02.03.2005 GB 0504362**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.04.2011

(73) Titular/es: **BTG INTERNATIONAL LIMITED**
10 Fleet Place
Limeburner Lane, London EC4M 7S, GB

(72) Inventor/es: **Harbige, Laurence, S.;**
Leach, Michael, J.;
Barraclough, Paul y
Dolan, Anthony Patrick

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 925 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

La presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades y trastornos en los que las citocinas se encuentran en un estado de desequilibrio o son capaces de modularse de cualquier otro modo para proporcionar un beneficio terapéutico. En particular, la invención proporciona el uso de compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratamiento de pacientes que necesitan tratamiento terapéutico para trastornos en los que las citocinas TGF- β 1, TNF- α , IL-1 β , IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13 y γ -IFN no están reguladas o pueden modularse para proporcionar un beneficio terapéutico.

Enfermedades particulares que se pueden tratar son trastornos tales como anomalías del sistema inmunitario, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), alergia, asma, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, pero en particular esclerosis múltiple y también enfermedades neurodegenerativas tales como secuelas de ictus, traumatismo craneal, hemorragias y anomalías crónicas de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Otros trastornos que se pueden tratar previamente tanto de forma profiláctica como terapéutica son cardiopatías coronarias (CHD) de recién nacidos prematuros y septicemia.

Las solicitudes de patente en trámite junto con la presente WO2004/100943 y WO2005/01863 del mismo inventor, incorporadas a la presente como referencia, se refieren al uso de aceites sintéticos, vegetales y fúngicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en particular, esclerosis múltiple, ictus, traumatismo craneal, enfermedad de Alzheimer y Parkinson. El documento WO2004/100943 se refiere a aceites caracterizados por tener elevados porcentajes de ácidos grasos esenciales ácido γ -linolénico (GLA) en la posición sn-2 de sus lípidos, siendo de forma típica más del 40% de los ácidos grasos sn-2 totales en el aceite. El documento WO2005/018632 se refiere a lípidos estructurados que tienen un residuo ácido graso sn-2 seleccionado de ácido γ -linolénico (GLA), ácido dihomo- γ -linolénico (DHGLA) y ácido araquidónico (AA).

Está bien documentado en la bibliografía que los ácidos grasos esenciales (AAE) del modelo de insaturación n-3 y n-6 tienen efectos beneficiosos en una amplia diversidad de trastornos fisiológicos humanos, incluyendo enfermedad autoinmune (documento WO 02/02105). Harbige (1998) Proc. Nut. Soc. 57, 555-562 revisaron la suplementación de la dieta con ácidos n-3 y n-6 en estados de enfermedad autoinmune, y apreciaron en particular evidencias de beneficio de ácidos ricos en ácido γ -linolénico (GLA) y/o ácido linoleico (LA).

Las citocinas están implicadas en la patogénesis de la EM, mostrando muchos estudios un aumento en las citocinas inflamatorias mielínótóxicas (TNF- α , IL-1 β y IFN- γ) que coincide con la fase de recidiva de la enfermedad. Por el contrario, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) de citocinas antiinflamatorias e inmunosupresor parece reducirse durante la fase de recidiva y aumentar cuando los pacientes entran en fase de remisión. Así, el equilibrio entre TGF- β 1 biológicamente activo y TNF- α , IL-1 β y IFN- γ proinflamatorio parece estar sin regular durante la recidiva-remisión de la EM.

Durante la fase de recuperación natural de EAE, los linfocitos T que segregan TGF- β 1 inhiben las células efectoras de EAE, se expresa TGF- β 1 en el SNC y, en la protección inducida por tolerancia oral en EAE, TGF- β y PGE₂ son expresados en el cerebro (Karpus & Swanborg (1991); Khoury et al (1992)). Harbige ((1998) llegó a la conclusión de que los efectos del ácido γ -linolénico ingerido en la dieta sobre los EAE están mediados a través de mecanismos del tipo Th₃ que implican TGF- β 1 y posiblemente actividad antioxidante de superóxido dismutasa.

El aceite de borraja (de forma típica con 20% a 23% de ácido γ -linolénico y 34 a 40% de ácido linoleico por 100% de contenido de ácidos grasos) y el aceite del hongo Mucor javanicus (véase la Figura 1) han demostrado ser eficaces en el modelo animal de EAE usado para identificar candidatos a EM, mientras que nunca se había mostrado que fueran significativamente eficaces en la enfermedad humana. Altos niveles de aceite rico en linoleico que contiene bajos niveles de ácido γ -linolénico (EPO: ácido linoleico : ácido γ -linolénico 7:1) suprimieron parcialmente la incidencia y la gravedad de EAE en la rata (Mertin & Stackpoole, 1978) mientras que el estudio de Naudicelles de Bates al que se ha hecho referencia antes condujo al empeoramiento de los pacientes. A pesar del uso de aceite de borraja y otros aceites que contienen GLA/LA tales como aceite de onagra por pacientes que sufren esclerosis múltiple en los últimos 30 años, la gran mayoría de pacientes no pudo recuperarse de la enfermedad, no mostrando mejora significativa, continuando la enfermedad subyacente su progreso hasta la muerte.

Se ha sugerido el uso, entre otros, de aceite de borraja rico en ácido γ -linolénico y ácido linoleico como medio para proporcionar inmunosupresión en esclerosis múltiple (documento US 4.058.594). De forma crítica, la dosis sugerida es 2,4 gramos de aceite por día y no se proporciona evidencia real de eficacia. Esta es mucho menor que la baja dosis de 5 g/día que se encuentra es ineficaz *in vivo* en el hombre en el estudio del documento WO2004/100943.

Otros tratamientos inmunosupresores más drásticos, incluyendo consumidores y moduladores de linfocitos T tales como ciclofosfamida, también han mostrado ser eficaces en el modelo de EAE, pero

cuando éstos se emplean en esclerosis múltiple en seres humanos los síntomas de enfermedad mejoran, pero la enfermedad subyacente continúa progresando. De hecho, los linfocitos T producen citocinas beneficiosas, tales como TGF- β 1, así como otras perjudiciales en el hombre. David Baker of Institute of Neurology, Reino Unido, recapituló la disparidad entre lo que es eficaz en los EAE y en EM con un artículo titulado "Everything stops EAE, nothing stops MS" en las jornadas de EM en el Reino Unido el 10 de mayo de 2004 de la Sociedad Británica de EM.

En el estudio del documento WO2004/100943 los autores de la presente invención Harbige y Leach, con el coinventor Sharief, determinaron de forma sorprendente que, con un cumplimiento a un tratamiento de "alta dosis" con aceite de triglicéridos que contiene niveles elevados de ácido sn-2 γ -linolénico (siendo más del 40% de los residuos en el sn-2 de ácido γ -linolénico) con un contenido de ácidos grasos concomitante adecuado, se pueden conseguir niveles notables de mejora en casi todos los síntomas de la EM, sin comparación al proporcionado por el actual tratamiento más eficaz. Dicho éxito es particularmente sorprendente a la vista del uso anterior de otras preparaciones que contienen ácido γ -linolénico sin éxito, tales como el estudio de Naudicelle.

El estudio del documento WO2004/100943 muestra que durante un período de 18 meses, los pacientes que tomaron una alta dosis (15 g/día) de aceite de borraja seleccionado con alto contenido en sn-2 de ácido γ -linolénico presentaron mejoras significativas ($p < 0,001$) y notables en el índice de EDSS, una tasa reducida de recaídas, alivio sintomático de la espasticidad muscular y síntomas sensoriales de dolor y medidas objetivas mejoradas de las funciones cognitivas. Dosis bajas de 5 g/día de este aceite de borraja no tuvieron efecto.

Pacientes que tomaron la dosis más alta de este aceite de borraja mantuvieron su nivel de producción de células mononucleares de sangre periférica (PBMc) de TGF- β 1 durante el período del ensayo, sus citocinas proinflamatorias TNF- α e IL- β se redujeron de forma significativa y notable ($< 70\%$) y mantuvieron o aumentaron los ácidos grasos omega-6 de cadena larga en la membrana de PBMc ácido dihomo- γ -linolénico (DHLA) y ácido araquidónico (AA) en contraste con pacientes que tomaron placebo que demostraron pérdida de estos ácidos grasos durante el curso del período de estudio.

Así, mientras que podría esperarse que la inmunosupresión redujera el aumento de lesiones activas y neurodegeneración, el tratamiento con aceite con alto contenido en sn-2 de GLA aparentemente mantuvo y/o aumentó los componentes lipídicos claves de la membrana que, de otro modo, se pierden de forma específica en la EM, siendo consistente con una corrección de un defecto metabólico no tratado de ningún otra de forma eficaz modo por los actuales tratamientos terapéuticos. El hecho de que la baja dosis (5 gramos/día) no tuviera efecto sobre esto apoya dicha determinación.

Los autores de la presente invención exponen, a la vista de los resultados obtenidos con aceite de borraja con alto contenido en ácido sn-2- γ -linolénico, que de hecho la presencia de un residuo de ácido sn-2- γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico o ácido araquidónico en un monoglicérido, en particular, un monoglicérido sn-2, o uno de sus precursores metabólicos, que aporta eficacia en el tratamiento de desregulación de citocinas. Obsérvese que los propios triglicéridos tienen casi tres veces el peso, y por tanto la dosis, de los homólogos monoglicéridos, han determinado que es posible administrar ácidos grasos esenciales el tipo n-3, n-6 y n-9, en particular del tipo n-6, como precursores metabólicos o análogos de monoglicéridos sn-2 y todavía obtener cambios beneficiosos en las citocinas. En particular, se cree que estos compuestos son más estables que los monoglicéridos menos voluminosos.

Se ha descrito que 2-araquidonil glicerol tiene actividad para disminuir la enfermedad inducida por TNF- α y especies de oxígeno reactivo (véase el documento WO 01/97793), sin embargo, se dice que los compuestos de γ -linolenoilo y palmitoilo correspondientes son inactivos. Un lípido estructurado con sn-2-araquidonilo se ha descrito también por ser activo en "hipofunción cerebral" tal como en el deterioro cognitivo leve (véase el documento EP 1419768).

Las ventajas de la dosis del uso de monoglicéridos sobre triglicéridos pueden verse desplazadas en parte por la inestabilidad posiblemente mayor de ciertas formas al compararse con el grupo acilo saturado sn-1, sn-3 del triglicérido sn-2 EFA ejemplificado en el documento PCT/GB2004/003524. Dicha inestabilidad puede ser debida, por ejemplo, a transesterificación y oxidación. Este problema puede solucionarse produciendo el monoglicérido en una forma más estable, por ejemplo, un sólido o semisólido en lugar de un líquido.

Los presentes inventores han proporcionado ahora otros compuestos, conocidos y nuevos, que pueden ser precursores metabólicos del monoglicérido que se reivindica más adelante que, bien se metabolizan para dar dicha forma *in vivo* o son directamente activos, pero que resisten la transesterificación y otras degradaciones durante su almacenamiento.

Estudios preliminares realizados por los inventores han mostrado que los compuestos seleccionados para el uso de la presente invención son más resistentes a la degradación por al menos algunas lipasas de mamífero que el aceite de borraja, el aceite de onagra y los lípidos estructurales

basados en triglicéridos usados anteriormente, y son más resistentes a la transposición que los monoglicéridos.

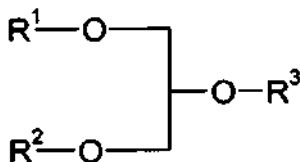
Estos compuestos son en particular glicerol cíclicos que tienen ácidos grasos esenciales, en particular n-3, n-6 y n-9, pero en particular ácidos grasos n-6, en una posición equivalente a la posición sn-2 en el glicerol. Los inventores han determinado que estos compuestos pueden regular citocinas de una forma favorable para la salud de un paciente en base a sus estudios clínicos previos con aceite de borraja y los trabajos *in vivo* e *in vitro* con lípidos estructurales.

Los glicerol cíclicos son conocidos como una clase, por ejemplo véase Chem Abstracts n° 65:8747b y se han usado como intermedios en la síntesis de monoacilglicéridos, por ejemplo, véase Chemical & Pharmaceutical Bulletin (2000), 48(7) 903-907. Recientemente, el documento US2005/0020679 ha propuesto que todos los miembros de esta clase que tienen un grupo acilo graso poliinsaturado, en particular un grupo araquidonilo, se ha propuesto que tienen utilidad como inhibidores del transporte de anandamida, teniendo uso farmacológico en el tratamiento de dolor, dolor periférico, glaucoma, epilepsia, náuseas, desgaste por SIDA, cáncer, neurodegeneración, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y enfermedad de Alzheimer, mejora del apetito, reducción de la fertilidad, trastorno de Tourette y otros trastornos de la función motora, para neuroprotección, vasodilatación periférica y memoria suprimida.

Este documento y su predecesor WO99/64389 (dirigido a analgesia) no proporcionan descripción de los compuestos particulares de la presente invención y describen de forma significativa que una cantidad terapéuticamente eficaz de glicerol cíclico es 10 mg/día a 1000 mg/día. Los estudios de los autores de la presente invención sobre el efecto relativo en animales y sobre células han conducido a los mismos a determinar que dicha dosis no será eficaz en la indicación sobre regulación de citocinas ahora divulgada. La dosis eficaz en el hombre es de esperar que sea mayor que 1000 mg/día, en particular, de 1 g a 10 g por día. Más preferentemente de 2 a 6 g/día, todavía más preferentemente de 2 a 4 g/día.

Sin la regulación de citocinas que dichas dosis proporcionan, el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades desmielinizantes, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer, Parkinson, corea de Huntington y traumatismos e ictus con la idea de detener la destrucción de tejidos en curso por citocinas y células inmunes no se puede conseguir. La simple mejoría de los niveles de anandamina naturales bloqueando la recaptación no puede proporcionar el alivio cuando no hay presente anandamina natural en cantidades eficaces, por ejemplo, en linfocitos T y en lesiones alrededor del SNC.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula general I



en la que R¹ y R² juntos forman un grupo



en el que n y m son números enteros seleccionados independientemente de 0, 1 ó 2

y R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₁₈, alcoxi C₁₋₁₈, hidroxialquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈ y arilo o aralquilo C₆₋₁₈

y R³ es un grupo γ-linolenoilo o γ-dihomolinolenoilo

para el tratamiento de desregulación de citocinas o para la modulación de trastornos de por citocinas.

De preferencia, R¹ y R² se seleccionan de H o un grupo —CR⁴R⁵ en el que R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁₋₆. Más ventajosamente R¹ y R² forman un grupo —CH₂— o —CH₂CH₂—.

Se prefieren de forma particular compuestos que son 5-aciloxi grasos esenciales-1,3-dioxano, más particularmente n-3-aciloxi grasos o n-6 aciloxi graso-1,3-dioxanos, lo más preferentemente 5-γ-linolenoiloxi, 5-dihomo-γ-linolenoiloxi y 5-araquidonoiloxi-1,3-dioxanos. Lo más preferentemente son los 5-γ-linolenoiloxi y 5-dihomo-γ-linolenoiloxi-1,3-dioxanos no inflamatorios.

En particular, se tratan anomalías del sistema inmune por citocinas desreguladas, por ejemplo, enfermedades tales como lupus eritematoso sistémico (LES), alergia, asma, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, pero en particular, esclerosis múltiple y también enfermedades neurodegenerativas tales como secuelas de ictus, traumatismo craneal, hemorragias y anomalías crónicas de la enfermedad

de Alzheimer y Parkinson. Otros trastornos que se pueden tratar previamente tanto de forma profiláctica como terapéutica son cardiopatías coronarias (CHD) de recién nacidos prematuros y septicemia

Enfermedades neurodegenerativas tratadas de forma particularmente ventajosa son las que implican desmielinización. El presente procedimiento está específicamente dedicado a detener la neurodegeneración subyacente y restaurar la función neuronal. En particular, el procedimiento normaliza preferentemente la composición de la membrana neuronal y restaura las relaciones de TGF- β 1/TNF α estimulados por PBMC o liberados de forma espontánea y las relaciones de TGF- β 1 con otras citocinas liberadas por PBMC. De forma más ventajosa, el procedimiento detiene la neurodegeneración en esclerosis múltiple de todos los tipos pero en particular de la remitente recidivante, la EM progresiva primaria y progresiva crónica y la restauración, en parte o totalmente, de la función neuronal tal como se mide, por ejemplo, por exploraciones de IRM o TAC o por el índice EDSS. Dicho procedimiento también se puede usar en el tratamiento de deterioro cerebral después de ictus, traumatismo craneal y hemorragia intracraneal en la que se produce desmielinización o lesión neuronal. Otra aplicación se proporciona al tratar otra desmielinización crónica tal como en enfermedad de Alzheimer y de Parkinson.

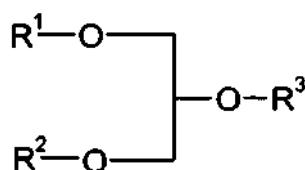
Preferentemente, el compuesto de la presente invención se administra durante un período y en una dosis suficiente para mantener o elevar los niveles de TGF- β 1 en el paciente hasta niveles terapéuticos. Niveles terapéuticos se refiere a niveles al menos consistentes con sujetos sanos. De preferencia, la dosis es tal que produce una relación TGF- β 1/TNF- α liberados de forma espontánea de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria, de 0,4 a 3,0, al menos 0,5, más preferentemente al menos 0,75 y, lo más preferente, al menos 1. Preferentemente, la dosis es tal que produce una relación TGF- β 1/IL-1 β en sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria, de al menos 0,5, más preferentemente al menos 0,75 y, lo más preferente, al menos 1. Preferentemente, dichos niveles se producen después de 12 meses y, más preferentemente, después de 6 meses.

La presente invención proporciona además el compuesto de fórmula I para tratar un paciente que necesita remielinización en una enfermedad desmielinizante.

La cantidad del compuesto administrada diariamente variará de 0,5 a 30 gramos, por vía oral, todavía más preferentemente de 0,75 a 20 gramos y más preferentemente de 1 a 18 gramos, de forma típica de 2 a 5 gramos. Esta dosis puede administrarse como una dosis única o en dos o más dosis que totalicen juntas esta cantidad por día.

Cuando el radical sn-2 es de un residuo ácido γ -linolénico, la dosis puede aproximarse al extremo superior de estos intervalos, pero preferentemente varía de 1 a 10 gramos/día, más preferentemente 2 a 6 gramos/día. Cuando el radical sn-2 es de un residuo ácido dihomó- γ -linolénico, la dosis puede ser menor, mientras que cuando el radical sn-2 es de un residuo ácido araquidónico, la eficacia es mayor, pero la dosificación debería ser más cuidadosa, debido a la posibilidad de efectos secundarios no deseados a mayores niveles y a la naturaleza proinflamatoria de este PUFA.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un nuevo compuesto de fórmula I



en la que R¹ y R² forman juntos un grupo



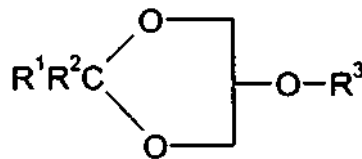
en el que n y m son números enteros seleccionados independientemente de 0, 1 ó 2

y R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₁₈, alcoxi C₁₋₁₈, hidroxialquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈ y aralquilo C₆₋₁₈

y R³ es un grupo γ -linolenoilo o γ -dihomolinolenoilo.

Preferentemente, R¹ y R² forman un grupo -CR⁴R⁵ en el que R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁₋₆. Lo más preferentemente, R¹ y R² forman un grupo -CH₂- o -CH₂CH₂-.

Así, se prefieren compuestos de fórmula formula Ila



en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

Particularmente preferentes son compuestos que son 5-aciloxi-1,3-dioxanos, más particularmente n-3-acilo graso o n-6-aciloxi graso-1,3-dioxanos, lo más preferentemente 5-γ-linoleniloxi y 5-dihomo-γ-linoleniloxi.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula general II que comprende la reacción de un 5-hidroxi-1,3-dioxano con ácido γ-linolénico, ácido γ-dihomolínolénico o sus haluros de ácido.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona composiciones para uso en el procedimiento de la invención que comprenden los compuestos de fórmula I junto con un vehículo, revestimiento, cápsula, diluyente y/o conservante farmacéutica o nutracéuticamente aceptable. Los compuestos para uso en la presente invención se pueden administrar por cualquiera de los vehículos convencionales conocidos en farmacia. Lo más conveniente, éstos se administran como aceites puros o mezclados con alimentos, en forma de cápsulas que contienen tales aceites, o en formas con revestimiento entérico. Otras formas se les ocurrirán a los expertos en la técnica pero en Remington Pharmaceutical Sciences 19th Edition

Conservante se refiere a un antioxidante o inhibidor de transesterificación. Se prefiere de forma particular que la composición no incluya vitamina E o incluya solo niveles de Vitamina E que son iguales o inferiores a 0,05 mg/g, por ejemplo de 0,005 a 0,05 mg/g.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para regular el sistema inmune, en particular, modulando citocinas TGF-β1, TNF-α, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13 y/o γ-IFN que comprende un compuesto de fórmula general I como se ha definido para el procedimiento de tratamiento de la invención.

Composiciones particularmente preferentes son para detener o invertir la neurodegeneración en esclerosis múltiple de todos los tipos pero en particular del tipo recidivante remitente, progresiva primaria y progresiva crónica y la restauración, en parte o totalmente, de la función de integridad neuronal tal como se mide, por ejemplo, por exploración por IRM o TAC o por el índice EDSS. Otras enfermedades sensibles a TGF-β1 pueden ser tratadas como se ha expuesto anteriormente. En particular, se trata desmielinización.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden combinarse otros agentes beneficiosos con los compuestos para uso en la presente invención o formar parte de otro modo de una pauta de tratamiento. Estos podrían ser bloqueantes de los canales iónicos, por ejemplo, bloqueantes del canal de sodio, interferones (α, β o γ), agotadores de linfocitos T, esteroides u otros agentes paliativos. También se apreciará que cuando las respuestas inmune e inflamatoria están siendo moduladas, será necesario realizar tales combinaciones con cuidado, dada la naturaleza compleja de estos sistemas. Sin embargo, dada la posibilidad de una respuesta retardada a los presentes compuestos, podrían ser beneficiosos agentes de acción más corta en los primeros meses de tratamiento antes de que se normalicen los niveles de citocinas, siempre que el tratamiento adicional no impida este proceso de normalización.

La síntesis de compuestos y composiciones para uso en la presente invención se describe a continuación junto con síntesis de ejemplos comparativos. Aunque los Ejemplos ejemplifican compuestos en los que R³ es γ-linolenilo, los análogos dihomο-γ-linolenilo y araquidonoilo y n-3 y n-9 de estos se sintetizan fácilmente a través de materiales de partida análogos.

La presente invención se describirá ahora únicamente a modo de ejemplo por referencia a las siguientes Tablas, Ejemplos y Figuras no limitantes. Otras realizaciones que entren dentro del ámbito de la invención se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la vista de aquellas.

TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Muestra la producción de citocinas en células nucleares de sangre periférica espontánea en pacientes con EM a los 18 meses tratados con placebo y aceite del ensayo WO2004/100943 rico en ácido sn-2 γ-linolénico. La columna de la izquierda en cada caso es el placebo: la derecha

los tratados.

Figura 2: Muestra el efecto del placebo y el aceite de borraja rico en sn-2 GLA en baja dosis (5 g/día) en el índice EDSS de pacientes humanos con EM al compararlos con la alta dosis (15 g/día) mostrado como histograma, con el tratamiento en meses en el eje x.

5 Figura 3: Muestra el efecto de placebo, aceite de borraja sn-2 GLA en baja dosis y en alta dosis sobre la tasa de recaídas media en pacientes con EM (%) como histograma, con los meses en el eje x.

Figura 4: Muestra la síntesis de 2-GLA glicerol formal (aka: 5- γ -linoleniloxy)-1,3-dioxano y 5-(1,3-dioxanil)metil- γ -linolenato)

10 EJEMPLOS

Antecedentes

Ensayo con aceite de borraja rico en sn-2 (WO2004/100943).

Aislamiento y cultivo de PBMC

15 Se diluyo sangre completa heparinizada con un volumen igual de solución salina equilibrada de Hank (Sigma, Reino Unido) y la sangre diluida resultante se estratificó sobre Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega). Después de una centrifugación por densidad a 800 g durante 30 minutos, se separaron los PBMC de la interfase y se diluyeron en solución de Hank. Las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 minutos a 250g. El sedimento final resultante se resuspendió entonces en medio de cultivo que consistía en medio RPMI-1640 (Sigma, Reino Unido) suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 U de penicilina y 100 μ g de estreptomycin (Sigma, Reino Unido) y plasma autólogo al 10%. Se añadieron 2×10^6 por ml de PBMC, >95% viables como se consideró por exclusión con azul de tripano, a tubos de cultivo tisular (Bibby Sterilin Ltd, Stone, Reino Unido) y se incubó durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Se determinaron la concentración de antígeno, densidad celular y tiempo de cultivo en experimentos cinéticos previos para determinar la máxima producción de citocinas (datos no mostrados).
20 También se prepararon preparaciones de centrifugación citológica "Cytospin" de rutina para los posteriores recuentos diferenciales. Después de la incubación, se separaron las células del cultivo por centrifugación a 250g durante 10 minutos, se retiraron los sobrenadantes resultantes, se separaron alícuotas y se almacenaron a -70°C.

Preparación de muestras de plasma

30 Se centrifugaron 10 ml de sangre heparinizada a 250g durante 10 minutos. La capa de plasma resultante se separó a continuación, se separaron alícuotas y se almacenó a -70°C.

Detección de citocinas proinflamatorias

35 Se detectaron TNF- α , IL-1 β y IFN- γ en sobrenadantes de cultivo tisular y plasma usando detección de citocinas que obtiene anticuerpos emparejados disponible de forma comercial en un formato ELISA (R&D systems Ltd, Abingdon, Reino Unido). Las sensibilidades para los ELISA de TNF- α y IFN- γ fueron 15,6-1000 pg/ml y 3,9-250 pg/ml para IL-1 β .

Detección de TGF- β 1 biológicamente activo

40 Se detectó TGF- β 1 en sobrenadantes de cultivo celular y plasma usando el sistema ELISA E_{max} disponible comercialmente con una sensibilidad de 15,6-1000 pg/ml (Promega, Southampton, Reino Unido).

Análisis estadístico

Se compararon las diferencias en la producción de citocinas usando una prueba t de Student y una prueba U de Mann-Whitney y se consideraron significativas cuando los valores p fueron menores que 0,05.

45 RESULTADOS

Véase la Figura 1

Procedimiento experimental

50 Se obtuvieron los espectros de RMN de ¹³C de protón desacoplado con NOE suprimido a 21°C en una sonda de banda ancha de 5 mm en un espectrómetro Joel a 500 MHz que funcionaba a 125,728 MHz. Se eligió el modo de desacoplamiento de Waltz y se cerró solo durante el tiempo de adquisición de

14,89 g. El retardo de relajación se fijó en 30 segundos y el ángulo de pulso fue de 90°. La amplitud espectral usada fue de aproximadamente 35 ppm (de 173,5 a 172,6 ppm) con un desfase de 170 ppm. Los espectros se referenciaron internamente a CDCl_3 a 77,0 ppm. De forma típica, el número aproximado de exploraciones recogidas para adecuar la relación señal - ruido varió de 300 a 1200 exploraciones dependiendo de la concentración y pureza de la muestra. El tiempo total de adquisición para los experimentos varió de 2 a 8 horas, por ejemplo, 1272 exploraciones; puntos de datos 65.536. Se emplearon soluciones concentradas hasta un 20% p/v cuando fue posible para reducir el tiempo de adquisición. Los desplazamientos químicos indicado variaron con la concentración de la solución.

Síntesis de compuestos para uso en la presente invención.

EJEMPLO 1.

1a) Preparación de 2-octa-6Z,9Z,12Z-trienoato de 1,3-O-bencilidenglicerol. (Intermedio y compuestos conocidos para uso en la invención cuando R^4 es H y R^5 es bencilo).

Se añadió cloruro de oxalilo (7,8 ml, 11,3 g, 0,089 mol, 0,95 equivalentes) durante 2-3 minutos a una solución agitada de ácido γ -linolénico (GLA95, 16,7 g, 0,060 mol, 0,64 equivalentes-Scotia) en diclorometano (100 ml) bajo N_2 . La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y luego se concentró a vacío dando un aceite color castaño. Este cloruro de γ -linolenoilo bruto se añadió durante aproximadamente 10 minutos a una solución agitada de 1,3-O-benciliden glicerol (13,0 g, 0,094 mol, 1 equivalente), piridina seca (30 ml, 29,3 g, 0,37 mol, 4 equivalentes) y diclorometano (DCM, 120 ml) a 5°C y la mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró y luego se lavó el filtrado con DCM. El filtrado y las aguas de lavado reunidos se lavaron entonces con agua (2 x 20 ml) y se secó el extracto de DCM sobre MgSO_4 y se concentró a vacío dando un producto bruto como un aceite color castaño (pureza >90% por HPLC). El aceite se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (300 g). La elución con DCM dio el producto como un aceite amarillo (19,2 g (73%), 96,3% de pureza por HPLC).

EJEMPLO 2:

2-GLA glicerol formal (aka: 5- γ -linolenoiloxil)- 1,3-dioxano y 5-(1,3-diozanil)-metil- γ -linolenato)

Para los fines de esta ejemplificación, la síntesis de este éster se llevó a cabo mediante acilación de la mezcla de glicerol formal disponible comercialmente usando cloruro de γ -linolenoilo. Por este procedimiento se forma una mezcla de dos productos y estos se podían separar por cromatografía en columna. El subproducto no deseado eluye primero de la columna; la posterior elución da el acetal-éster deseado. Éste es un aceite amarillo a temperatura ambiente y parece tener propiedades de estabilidad similares a GLA, estable en aire a temperatura ambiente durante cortos períodos (días) pero se almacena mejor a largo plazo en un lugar frío bajo nitrógeno.

Parte experimental

Se añadió cloruro de oxalilo (2,6 ml, 3,78 g, 30 mmol, 1,5 equiv) a una solución de ácido γ -linolénico (GLA, 5,56 g, 20 mmol, 1,0 equiv) en diclorometano (DCM, 40 ml). La solución resultante se agitó bajo N_2 a temperatura ambiente y luego se concentró a vacío. El cloruro de γ -linolenoilo oleoso residual se añadió gota a gota durante 10 minutos a una solución agitada de glicerol formal (2,50 g, 24 mmol, 1,2 equiv) en DCM (40 ml) que contenía piridina (10 ml, 9,78 g, 0,12 mol, 6 equiv) a 5°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se separó por filtración el clorhidrato de piridina precipitado y el filtrado se lavó con agua (2 veces). Después de secar sobre MgSO_4 , se eliminó el disolvente a vacío dando un aceite color castaño claro (6,5 g). Este material se sometió a cromatografía sobre sílice (60 g). La elución con hexano-éter (94:6) dio 5,2 g de un aceite consistente en dos componentes (TLC, HPLC). Estos se separaron en una segunda columna de sílice (60 g). La elución con hexano-éter (98:2 luego 95:5) dio 4-(γ -linolenoiloximetil)-1,3-dioxolano como un aceite amarillo (1,2 g, 98% por HPLC). δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 0,89 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3), 1,24-1,45 (8H, complejo m, 4 x CH_2), 1,65 (2H, p, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CO}$), 2,08 (4H, m, 2 x $\text{CH}_2\text{C=C}$), 2,35 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_2CO), 2,80 (4H, t, $J = 6,0$ Hz, 2 x $\text{C=CCH}_2\text{C=C}$), 3,67 (1H, m, $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 3,97 (1H, m, $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 4,14 (2H, m, $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 4,26 (1H, p, $J = 3,5$ Hz, CHO), 4,89 y 5,02 (2H, 2 x s, OCH_2O), 5,36 (6H, m, 3 x CH=CH). δ_{C} (126,8 MHz, CDCl_3) 14,09 (CH_3), 22,60, 24,51, 25,65, 26,85, 27,23, 29,16, 29,34, 31,53, 33,97, 63,93 (CH_2O), 66,72 (CH_2O), 73,31 (CHO), 95,44 (OCO), [127,60, 128,04, 128,32, 128,41, 129,50, 130,41, C olefínico C], 173,26 (carbonilo).

La posterior elución dio 5-(γ -linolenoiloxil)-1,3-dioxano como un aceite amarillo (1,6 g, 97,8%) por HPLC). δ (500 MHz, CDCl_3) 0,89 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3), 1,24-1,46 (8H, complejo m, 4 x CH_2), 1,67 (2H, p, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C-CO}$), 2,05 (4H, m, 2 x $\text{CH}_2\text{C=C}$), 2,40 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_2CO), 2,81 (4H, t, $J = 6,0$ Hz, 2 x $\text{C=CCH}_2\text{C=C}$), 3,91 (2H, m, OCH_2), 3,99 (2H, m, OCH_2), 4,73 (1H, p, $J = 3,5$ Hz, CHO), 4,80 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{O}$), 4,93 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, $\text{OCH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{O}$), 5,37 (6H, m, 3 x CH=CH). δ_{C} (126,8 MHz, CDCl_3) 14,08 (CH_3), 22,59, 24,53, 25,65, 26,86, 27,22, 29,06, 29,34, 31,52, 34,12, 65,54 (CHO), 68,55

(CH₂O), 93,66 (OCO), [127,60, 128,05, 128,32, 128,42, 129,51, 130,42, C olefínico], 173,12 (carbonilo). Durante la cromatografía se obtuvieron algunas fracciones que contenían ambos compuestos y estos se pudieron reciclar cuando fue necesario para dar más material. El esquema de reacción para esta síntesis se muestra más adelante en las figuras.

5 **EJEMPLO 3.**

Producción de composiciones enriquecidas a partir de lípidos con estructura de CGC sintéticos. Compuesto modelo para metabolito de compuestos de la invención.

1. 2-GLA MG (monoglicérido de ácido γ -linolénico) a partir de CGC (1,3-didecanoato- 2- γ -linolenoato de glicerol)

Se añadió resina acrílica de lipasa de Candida antarctica (Sigma, Novozyme, 0,1 g.) a una solución de CGC (0,25 g) en etanol (0,75 ml). La mezcla se agitó a 35-40 °C y se controló por HPLC. Después de 3 horas, se separó la resina por filtración y se lavó con etanol. El filtrado y las aguas de lavado se concentraron a vacío. El análisis del aceite residual por HPLC indicó la formación de dos productos mayoritarios. Estos se separaron por cromatografía sobre sílice-ácido bórico. La elución con diclorometano (DCM) dio un aceite (fracción A, 160 mg). La posterior elución con DCM-MeOH (9:1) dio un aceite (fracción B, 80 mg). La comparación HPLC con materiales auténticos indicó que B era el producto requerido, es decir, 2-GLA MG (8% se transpuso al isómero 1 también presente). Se encontró que el componente principal (>90%) de la fracción A (por comparación HPLC y RMN) era decanoato de etilo. Se encontró que el componente minoritario (por HPLC y RMN) era γ -linolenoato de etilo. Es de esperar que estos ésteres se formen en las condiciones de reacción a partir de los ácidos correspondientes (C y GLA) y etanol.

ESTUDIO BIOLÓGICOS.

EJEMPLO 4

Se llevó a cabo la solubilización de Sn-2 monoglicérido usando alcohol etílico o DMSO para el tratamiento *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Una tendencia a precipitar a pH ácido podría haber sido la causa de que algunos animales regurgitaran material sólido después de alimentación por sonda nasogástrica lo que sugiere que puede ser preferente la formulación con revestimiento entérico. Se alimentaron ratones SJL con sn-2 GLA del Ejemplo 1 a tres dosis (50, 125 y 250 μ l) durante siete días mediante sonda nasogástrica. Los ratones que recibieron dosis mayores fueron más propensos a la regurgitación. Después de siete días se sacrificaron los animales y se extirparon el cerebro, el hígado y el bazo - el hígado y el cerebro se congelaron a -70°C y se aislaron las células mononucleares de los bazos mediante tamizado y centrifugación por densidad en Lymphoprep (Sigma Chemical Co) y se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en tubos de cultivo de 5 ml a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 en suero bovino fetal al 5% (FCS). Las células se cultivaron con y sin 1 μ g/ml o 25 μ g/ml de concanavalina A (Con A) durante aproximadamente 20 horas y los líquidos sobrenadantes se retiraron y almacenaron a -70°C hasta que fueron necesarios. Se midió el TGF- β 1 de ratón en los sobrenadantes usando un ELISA disponible comercialmente (Promega, Madison WI).

Tabla 1

Producción de TGF- β 1 pg/ml estimulada (Con A) y no estimulada a partir de PBMC de bazo como respuesta a la alimentación de monoglicérido sn-2- γ -linolenoil-glicerol del Ejemplo 3				
	Con A (μ g/ml)	0	1	25
Monoglicérido				
50 μ g		377	409	480
Control		209	228	393
Cambio %		80	79	42

Esto muestra que el metabolito del compuesto de γ -linolenoilo de la fórmula del Ejemplo 2 es activo para elevar el TGF- β 1 de citocinas del mismo modo que el aceite de borraja del ensayo. Esto es consistente con la modulación previamente mostrada de todas las citocinas moduladas de este modo.

EJEMPLO 5**Actividad in vivo de monoglicérido formal (Compuesto del Ejemplo 2).**

Se dosificaron ratones C57/BL por vía oral con 2 GLA MG formal en dos dosis de 50 y 150 μ l durante ocho días. El compuesto se administró en 8 tubos separados que se almacenaron a 4°C antes de la dosificación pero que se calentaron hasta 25°C antes de usar. Después de ocho días, los animales se sacrificaron y se extirparon el cerebro, el hígado y el bazo. El hígado y el cerebro se congelaron a -70°C y se aislaron células mononucleares de los bazos por tamizado y centrifugación por densidad en Lymphoprep (Sigma Chemical Co) y se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en tubos de cultivo de 5 ml a una densidad celular de 2×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 en suero bovino fetal al 5% (FCS). Las células se cultivaron con y sin 1 μ g/ml o 25 μ g/ml de concanavalina A (Con A) durante aproximadamente 20 horas y los líquidos sobrenadantes se separaron y almacenaron a -70°C hasta que fueron necesarios. Se midió el TGF- β 1 de ratón en los sobrenadantes usando un sistema ELISA disponible comercialmente (Promega, Madison, WI).

Resultados:

La Concanavalina A no estimuló de forma significativa la producción de TGF- β 1 en este estudio. Los datos se combinaron por tanto a efectos de análisis estadístico (n=9/grupo). Los datos se analizaron usando Graphpad Instat.

Tabla 2

<i>Producción de TGFβ en células mononucleares de bazo (pg/ml)</i>		
Controles	77,9 \pm 4,1	
GLA 2-MG-F 50 μ l	90,9 \pm 5,2	P=0,0702
GLA2-MG-F 150 μ l	158,6 \pm 7,5	P<0,0001 \uparrow 103%
[Datos analizados usando una prueba t no emparejada; los datos son la media \pm SEM]		

Referencias:

Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. J Immunol. 1994 Nov 15;153(10):4349-56.

Beck J, Rondot P, Catinot L et al. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? Acta Neurol Scand 1988; 78: 318-23.

Bertolotto A, Capobianco M, Malucchi S et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA level correlates with magnetic resonance imaging disease activity in multiple sclerosis patients. Neurosci Lett 1999; 263:21-4.

Bertolotto A, Malucchi S, Capobianco M et al. Quantitative PCR reveals increased levels of tumor necrosis factor-alpha mRNA in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients during relapses. J Interferon Cytokine Res 1999; 19:575-81.

Brosnan CF., Selmaj K and Raine CS. Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1988;18,87-94.

Brosnan CF and Raine CS. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. Brain Pathol. 1996;6,243-257.

Burns J, Bartholomew B, Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. Ann Neurol 1999; 45:33-9.

Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. Ann Neurol 1995; 37:424-35.

Chou YK, Bourdette DN, Offner H et al. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and

myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; 38:105-14.

De Stefano N., Narayanan S., Francis GS., Arnaoutelis R., Tartaglia MC., Antel JP., Matthews PM and Arnold DL. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001; 58(1), 65-70.

Ewing C, Bernard CC. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 1998; 76:47-54. Fazakerly JK. Molecular biology of multiple sclerosis. Wiley and Sons Ltd. 1997,255-273.

Fredrikson S, Soderstrom M, Hillert J et al. Multiple sclerosis: occurrence of myelin basic protein peptide-reactive T cells in healthy family members. *Acta Neurol Scand* 1994; 89:184-9.

Genain CP., Cannella B., hauser SL and Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med* 1999;5,170-175.

Gross CE, Bednar MM, Howard DB and Sporn MB (1993) Transforming growth factor beta I reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* 24,558-562.

Harbige LS, Crawford MA, Jones J, Preece AW and Forti A. Dietary intervention studies on the phosphoglyceride fatty acids and electrophoretic mobility of erythrocytes in multiple sclerosis. *Prog. Lipid Res* 1986;25,243-248. Harbige LS. Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. (1996) *Nutr Health*, 10 (4):285-312.

Harbige LS (1998) Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 57, 555-562.

Harbige LS, Yeatman N, Amor S & Crawford MA (1995) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel source of γ -linolenic acid. *British Journal of Nutrition* 74,701-715.

Harbige LS., Layward L., Morris-Downes MM., Dumonde DC and Amor S. The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PGE2) production. *Clin Exp Immunol* 2000;122,445-452.

Henrich Noack P, Prehn JH, and Kriegstein J. (1996) TGF-beta I protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischaemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke*, 27, 1609-1614.

Hirsch RL, Panitch HS, Johnson KP. Lymphocytes from multiple sclerosis patients produce elevated levels of gamma interferon in vitro. *J Clin Immunol* 1985; 5:386-9.

Hollifield RD, Harbige LS, PhM-Dinh D, Sharief M. Evidence for cytokine Dysregulation in Multiple Sclerosis: Peripherally Blood Mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity*, 2003 36(3):133-141.

Imamura K, Suzumura A, Hayashi F et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 1993; 87:281-5.

Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI et al. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* 1996; 69:103-15.

Johns LD, Sriram S. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. *J Neuroimmunol* 1993; 47:1-7.

Kerlero de Rosbo N, Hoffman M, Mendel I et al. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur Immunol* 1997; 27:3059-69.

Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB et al. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 1993; 92:2602-8. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1:1255-63.

Krupinski J, Kumar P, Kumar S, and Kaluza J. (1996) Increased expression of TGF-beta I in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 27, 852-857.

Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol* 1991; 34:159-64. Lu CZ, Jensen MA, Arnason BG.

Interferon gamma- and interleukin-4-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1993; 46:123-8.

Maimone D, Reder AT, Gregory S. T cell lymphokine-induced secretion of cytokines by monocytes from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol* 1993; 146:96-106.

5 Martino G, Hartung H-P. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 309-21.

McCarron RM, Wang L, Racke MK et al. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 1993; 43:23-30.

10 McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul;50(1):121-7.

Merrill JE, Strom SR, Ellison GW et al. In vitro study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 1989; 9:84-96.

15 Merrill JE, Zimmerman RP. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. *Glia* 1991; 4:327-31.

Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C et al. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988; 263:6407-15.

20 Mokhtarian F, Shi Y, Shirazian D et al. Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. *J Immunol* 1994;152:6003-10.

Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; 45:322-33. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999;399(6738 Suppl), A40-47.

25 Ota K, Matsui M, Milford EL et al. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990; 346:183-7.

Perkin GD, Wolinsky JS. Fast facts-Multiple Sclerosis, 1st Edn. Oxford, UK: Health Press, 2000. Philippe J, Debruyne J, Leroux-Roels G et al. In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 1996; 98:286-90.

30 Phylactos AC, Ghebremeskel K, Costeloe K, Leaf AA, Harbige LS, Crawford MA. (1994) Polyunsaturated fatty acids and antioxidants in early development. Possible prevention of oxygen-induced disorders. *Eur J Clin Nutr*. 48Suppl 2:S17-23.

35 Prehn JH, Peruche B, Unsicker K and Kriegstein J. (1993) Isoform-specific effects of transforming growth factor-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J. Neurochem*. 60,1665-1672.

Rack MK, Sriram S, Calrimi J, Cannella B, Raine CS & McFarim DE (1993) Long-term treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-p2. *Journal of Neuroimmunology*, 46, 175-183.

40 Racke MK, Cannella B, Albert P et al. Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 1992; 4:615-20.

Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B et al. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44:1523-6.

45 Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B et al. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1995; 37:82-8.

Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM et al. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1990; 172:1193-200.

50 Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, Ruddle NH, Palladino MA, Gold LI & Thorbecke GJ (1993) Studies on the mechanisms by which Transforming Growth Factor-p protects against allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 151,1116-1127.

Schiefer HB, Hancock DS, Loew FM. Long-term effects of partially hydrogenated herring oil on the rat

myocardium. *Drug Nutr Interact.* 1982;1(2):89-102.

Schluesener HJ, Lider O. Transforming growth factors beta 1 and beta 2: cytokines with identical immunosuppressive effects and a potential role in the regulation of autoimmune T cell function. *J Neuroimmunol* 1989; 24:249-58. Selmaj K, Raine CS, Cannella B et al. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991; 87:949-54.

Selmaj K, Raine CS, Farooq M et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lympho-toxin. *J Immunol* 1991; 147:1522-9.

Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; 38:27-33.

Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM et al. Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 2001; 31:907-17.

Vartanian T, Li Y, Zhao M et al. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the patho-genesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995; 1:732-43.

Vivien D, Bemaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET and Nouvelot A.(1998) Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 70,2296-2304.

Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994; 179:973-84.

Japanese Patent 6172263 (1994) Y. Kosugi et al, Agency of Industrial Science & Technology High-purity arachidonic acid triglyceride and its production.

US Patent 4,888,324 (1989) N. Catsimpoalas et al, Angio-Medical Corporation Method for enhancing angiogenesis with lipid containing molecules.Y. Kosugi and N. Azuma, *J Amer. Oil Chem. Soc.*, 71, 1397-1403 (1994). Synthesis of Triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized ipase.

J. W. Hageman et al, *J. Amer, Oil Chem.Soc.*, 49, 118-xxx (1972) Preparation of glycerin and their uses.

E. S. Lutton and A. J. Fehl, *Lipids*, 5, 90-99 (1970). The polymorphism of odd and even saturated single acid triglycerides, C8-C22. D. Horrobin, A. McMordie, M. S. Manku (Scotia Holdings PLC UK) *Eur. Pat. Appl EP 609078* 3 Aug 1994. Phospholipids containing two different unsaturated fatty acids for use in therapy, nutrition, and cosmetics. Y.-S. Huan g, X. Lin, P. R. Redden and D. F. Horrobin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72,625-631,(1995). In vitro Hydrolysis of Natural and Synthetic γ -Linolenic acid-Containing Triacylglycerols by Pancreatic Lipase.

K. Osada, K. Takahashi, M. Hatano and M. Hosokawa, *Nippon Suisan Gakkaishi.*, 57, 119-125 (1991). *Chem. Abstr.*, 115:278299 Molecular Species of Enzymically-synthesized Polyunsaturated Fatty acid-rich Triglycerides.

J.-W. Liu, S. DeMichele, M. Bergana, E.. Bobik, Jr., C. Hastilow, Lu-Te Chuan g, P. Mukerji and J.-S. Huang., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 489-493 (2001) Characterization of Oil Exhibiting High γ -Linolenic acid from a Genetically transformed Canola Strain.

D. R. Kodali, D. Atkinson, T. G. Redgrave and D. Small, *J. Lipid Res.*, 28, 403-413 (1987).Structure and polymorphism of 18-Carbon Fatty Acid Triacylglycerols: Effect of Unsaturation and Substitution in the 2-Position P. H. Bentley and W. McCrae, *J. Org. Chem.* 35, 2082-2083 (1970) An Efficient Synthesis of Symmetrical 1,3-Diglycerides.

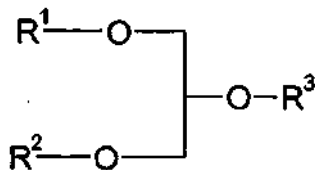
M. Berger, K. Laumen and M. P. Schneider, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69, 955-959,(1992). Enzymatic Esterification of Glycerol 1. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn-Diacylglycerols.

A. P. J. Mank, J. P. Ward and D. A. van Dorp, *Chem. Physics Lipids*, 16, 107-114 (1976). A versatile, flexible synthesis of 1,3-diglycerides and triglycerides.

L. Hartman, *Chem. Rev.*, 58, 845-867 (1958) and references therein. Advances in the Synthesis of Glycerides of Fatty Acids

REIVINDICACIONES

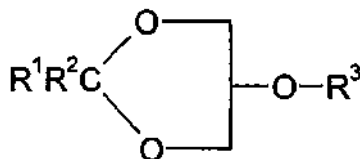
1. Un compuesto de fórmula I



en la que R^1 y R^2 forman juntos un grupo

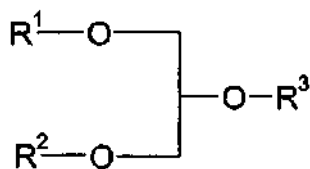


- 5 n y m se seleccionan independientemente de los números enteros 0, 1 ó 2;
- R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de H, alquilo C_{1-18} , alcoxi C_{1-18} , hidroxialquilo C_{1-18} , alquenoilo C_{2-18} y arilo o aralquilo C_{6-18}
- y R^3 es un grupo γ -linolenoilo o γ -dihomolínolenoilo para el tratamiento de desregulación de citocinas o para la modulación de trastornos por citocinas.
- 10 2. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R^1 y R^2 forman un grupo $-CR^4R^5$ en el que R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de H y alquilo C_{1-6} .
3. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R^1 y R^2 forman un grupo $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$.
4. Un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto tiene la fórmula



- 15 en la que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-6} .
5. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I se selecciona de 5- γ -linolenoiloxi-1,3-dioxanos y, 5-dihomo- γ -linolenoiloxi-1,3-dioxanos.
- 20 6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las citocinas moduladas son una o más de TGF- β 1, TNF- α , IL-1 β , IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13 y γ -IFN.
7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento es para anomalías del sistema inmune.
- 25 8. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para una afección seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), alergia, asma, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, secuelas de ictus, traumatismo craneal, hemorragias y anomalías crónicas de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, anomalías por cardiopatías coronarias (CHD) de recién nacidos prematuros y septicemia.
- 30 9. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para enfermedades neurodegenerativas.
10. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para detener y revertir neurodegeneración en esclerosis múltiple.
11. Un compuesto según la reivindicación 10, en el que la enfermedad neurodegenerativa implica desmielinización.
- 35 12. Un compuesto según la reivindicación 10, en el que el tratamiento detiene de forma específica la neurodegeneración subyacente y restaura la función neuronal.

13. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para normalizar la composición de la membrana neuronal con respecto al contenido en ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico y lípidos del ácido araquidónico.
- 5 14. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para restaurar las relaciones saludables de TGF- β 1/TNF α medidas de la liberación espontánea de células mononucleares de sangre periférica.
15. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para esclerosis múltiple recidivante remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria o esclerosis múltiple progresiva crónica.
- 10 16. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es para deterioro cerebral después de un ictus, traumatismo craneal y hemorragia intracraneal, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson, en las que se produzca desmielinización o lesión neuronal.
- 15 17. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento administra el compuesto durante un período y en una dosis suficiente para mantener o elevar los niveles de TGF- β 1 en el paciente hasta niveles terapéuticos.
- 20 18. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento administra un compuesto durante un período y en una dosis suficiente para mantener o elevar los niveles de TGF- β 1 en el paciente hasta una relación de TGF- β 1/TNF- α liberada espontáneamente de células mononucleares de sangre periférica aisladas de la sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria de 0,4 a 3,0.
19. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento administra el compuesto en una dosis tal que produce una relación TGF- β 1/IL-1 β en PBMC aisladas de sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria, de al menos 0,75.
- 25 20. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento administra el compuesto en una dosis de 0,5 a 30 gramos, de forma típica, de 3 a 5 gramos, por día.
21. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tratamiento administra el compuesto en una dosis de 1 a 10 gramos/día.
22. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el tratamiento administra el compuesto en una dosis de 2 a 10 gramos/día.
- 30 23. Un compuesto de fórmula I



en la que R¹ y R² forman juntos un grupo



en el que n y m son números enteros seleccionados independientemente de 0, 1 ó 2

35 y R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₁₈, alcoxi C₁₋₁₈, hidroxialquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈ y aralquilo C₆₋₁₈

y R³ es un grupo γ -linolenoilo o γ -dihomolinolenoilo.

24. Un compuesto según la reivindicación 23, en el que R¹ y R² forman un grupo -CR⁴R⁵ en el que R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁₋₆.
- 40 25. Un compuesto según la reivindicación 23 ó 24, en el que R¹ y R² forman un grupo -CH₂- o -CH₂CH₂-.
26. Un compuesto según la reivindicación 23 que es un 5-aciloxi-1,3-dioxano.
27. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 que es un 5- γ -linoleniloxi-1,3-dioxano o 5-dihomo- γ -linoleniloxi-1,3-dioxano.

28. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 para uso en terapia.
29. Una composición que comprende un compuesto de fórmula I como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28 junto con un vehículo, revestimiento, cápsula, diluyente y/o conservante farmacéutica o nutracéuticamente aceptable.
- 5 30. Una composición según la reivindicación 29 que comprende un conservante que es un antioxidante o inhibidor de transesterificación.
31. Una composición según la reivindicación 30 que comprende 0,05 mg/g o menos de Vitamina E.

FIGURA 1
Producción de citocinas de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple tratados con placebo y con aceite a los 18 meses

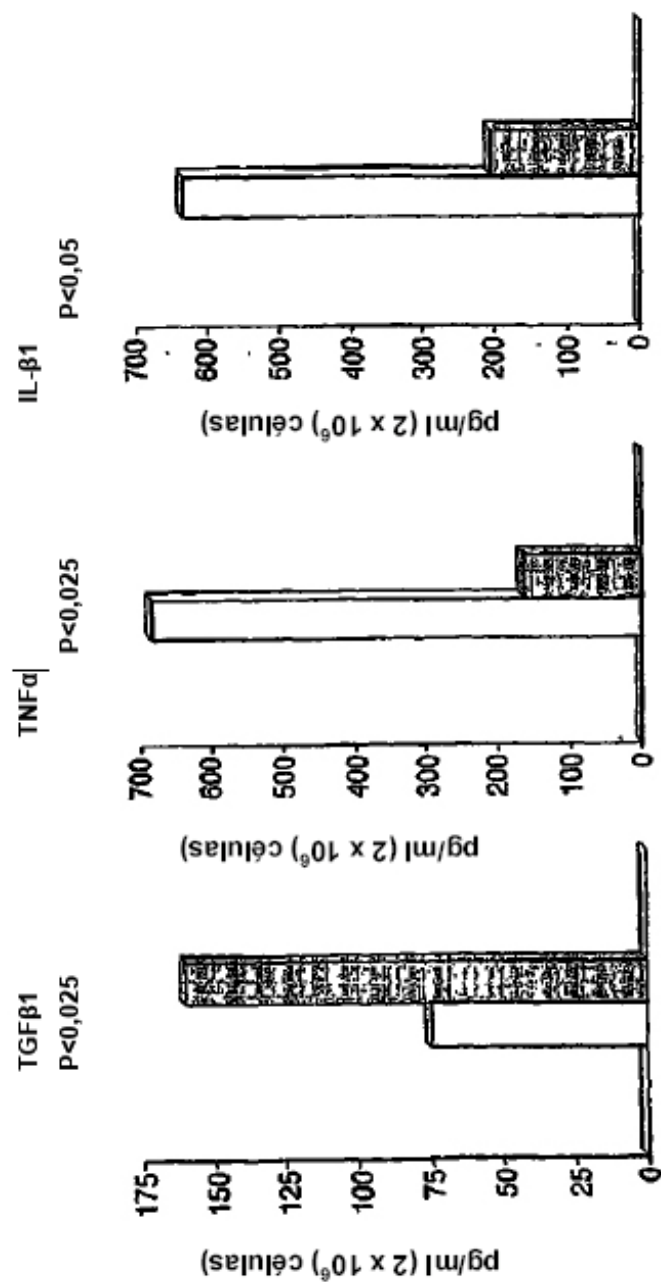


FIGURA 2 Y FIGURA 3

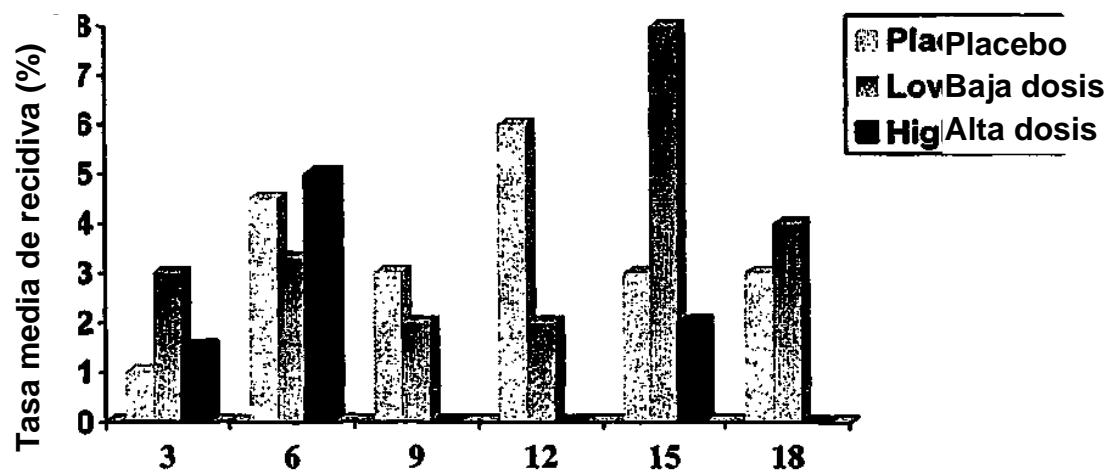
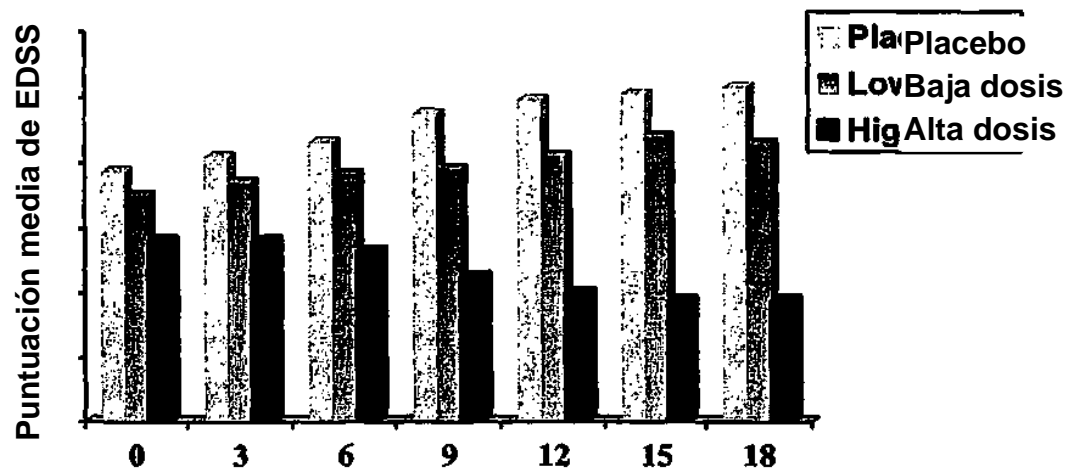


FIGURA 4

2- γ -Linolenoil glicerol formal (2-GLA MGF)

