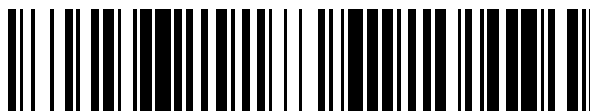


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 738**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20	(2006.01)	C07C 235/06	(2006.01)
A61K 31/23	(2006.01)	C07C 235/08	(2006.01)
A61K 31/255	(2006.01)	C07C 237/22	(2006.01)
A61K 31/7024	(2006.01)	A61K 38/19	(2006.01)
A61P 7/06	(2006.01)	A61K 38/20	(2006.01)
A61K 31/18	(2006.01)	C11C 3/00	(2006.01)
A61K 31/194	(2006.01)	C11C 3/02	(2006.01)
C07H 15/04	(2006.01)		
C07C 233/18	(2006.01)		
C07C 233/47	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2002 E 07116425 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1900364**

54 Título: **Ácidos grasos de longitud de cadena media, glicéridos y análogos como factores de supervivencia y activación de neutrófilos**

30 Prioridad:

18.04.2001 US 284458 P

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

24.01.2014

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES INC. (100.0%)
8168 Montview Mont-Royal
Québec H4P 2L7, CA**

72 Inventor/es:

**GAGNON, LYNE;
BARABE, JEAN;
LAURIN, PIERRE;
PENNEY, CHRISTOPHER y
ZACHARIE, BOULOS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 439 738 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

Ácidos grasos de longitud de cadena media, glicéridos y análogos como factores de supervivencia y activación de neutrófilos

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la prevención y/o al tratamiento de la neutropenia. Esto incluye el tratamiento de la neutropenia asociada al uso de quimioterapia y radioterapia así como también al tratamiento de la neutropenia originada por infecciones, enfermedades hematológicas y deficiencias nutricionales. La presente invención también se refiere generalmente a reducir la toxicidad de los fármacos y aumentar la eficacia de los fármacos. En particular, la presente invención se refiere al uso de ácidos grasos de longitud de cadena media como factor de supervivencia y de activación de neutrófilos o factor de proliferación de las células madre de la médula ósea.

10

15 **Antecedentes de la invención**

El término quimioterapia se refiere al uso de agentes citotóxicos tales como ciclofosfamida, doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, bleomicina, etopósido, topotecán, irinotecán, taxotere, taxol, 5-fluorouracilo, metotrexato, gemcitabina, cisplatino, carboplatino o clorambucilo con el fin de erradicar células cancerosas y tumores. Sin embargo, estos agentes no son específicos y, particularmente a dosis altas, son tóxicos para las células normales y las células en división rápida. A menudo, esto conduce a diversos efectos secundarios en pacientes sometidos a quimioterapia y terapia de radiación. La mielosupresión, una reducción grave de la producción de células sanguíneas en la médula ósea, es uno de tales efectos secundarios. Se caracteriza por leucopenia, neutropenia y trombocitopenia. La neutropenia crónica grave (idiopática, cíclica y congénita) se caracteriza también por una disminución selectiva en el número de neutrófilos circulantes y por una susceptibilidad potenciada a las infecciones bacterianas.

20

25

La esencia del tratamiento del cáncer con fármacos quimioterápicos es combinar un mecanismo de citotoxicidad con un mecanismo de selectividad por las células tumorales altamente proliferantes con respecto a las células del huésped. Sin embargo, es poco frecuente que los fármacos quimioterápicos posean dicha selectividad. La citotoxicidad de los agentes quimioterápicos limita las dosis que pueden administrarse, afecta a los ciclos de tratamiento y pone en peligro gravemente la calidad de vida del paciente oncológico.

30

Aunque otros tejidos normales también puedan verse afectados de manera adversa, la médula ósea es particularmente sensible a los tratamientos específicos de proliferación tales como la quimioterapia o la terapia de radiación. La toxicidad aguda y crónica en la médula ósea es un efecto secundario común de las terapias contra el cáncer que conduce a una disminución en el recuento de células sanguíneas y a anemia, leucopenia, neutropenia, agranulocitosis y trombocitopenia. Una causa de tales efectos es una disminución en el número de células hematopoyéticas (p. ej., células madre pluripotentes y otras células progenitoras) provocada tanto por un efecto letal de los agentes citotóxicos o la radiación sobre estas células como por la diferenciación de las células madre provocada mediante un mecanismo de retroalimentación inducido por el agotamiento de los compartimentos más maduros de la médula. La segunda causa es una reducción de la capacidad de autorrenovación de las células madre, que también está relacionada tanto con efectos directos (mutaciones) como indirectos (envejecimiento de la población de células madre) [Tubiana, M., *et al.*, Radiotherapy and Oncology 29:1-17 (1993)]. Por tanto, el tratamiento del cáncer frecuentemente produce una disminución de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) o neutropenia. Los PMN son la primera línea de defensa contra los patógenos invasores y desempeñan un papel central durante la inflamación aguda, siendo su función primaria fagocitar y destruir los agentes infecciosos. Para cumplir con este papel, los PMN dejan la circulación en respuesta a factores quimiotácticos y penetran en las zonas afectadas para ejercer sus funciones biológicas. En individuos con recuentos normales de células sanguíneas, los neutrófilos comprenden aproximadamente el 60% de los leucocitos totales. [SI Units Conversion Guide, 66-67 (1992), New England Journal of Medical Books]. Sin embargo, hasta uno de cada tres pacientes que reciben tratamiento de quimioterapia contra el cáncer puede padecer neutropenia. Los recuentos de neutrófilos normales medios para adultos humanos sanos son del orden de 4400 células/ μ l, con un intervalo de 1800-7700 células/ μ l. Un recuento de 1.000 a 500 células/ μ l es una neutropenia moderada y un recuento de 500 células/ μ l o inferior es una neutropenia grave. Los pacientes en estados de mielosupresión están predispuestos a las infecciones y frecuentemente padecen trastornos de la coagulación sanguínea, requiriendo hospitalización. La falta de neutrófilos y plaquetas es la causa principal de morbimortalidad tras tratamientos contra el cáncer y contribuye al alto coste de la terapia contra el cáncer. En estos estados mencionados anteriormente, el uso de cualquier agente capaz de inhibir la apoptosis de los neutrófilos o de estimular la activación y movilización de los neutrófilos puede tener valor terapéutico. Los esfuerzos para restablecer el sistema inmunitario del paciente después de la quimioterapia implican el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos para estimular la proliferación y diferenciación de las células madre restantes en células maduras que luchan contra las infecciones.

35

40

45

50

55

60

En el trasplante de médula ósea, también se ha aprovechado un fenómeno conocido como "movilización", para recoger un número superior de células madre/progenitoras de sangre periférica. Este método se utiliza actualmente en los trasplantes de médula ósea autólogos o alogénicos. Se usan factores de crecimiento para aumentar el

número de células madre progenitoras periféricas que van a recogerse antes de la terapia mieloablativa y la infusión de células madre progenitoras.

5 El trasplante de médula ósea después de la terapia también puede contrarrestar la neutropenia, pero necesita 10-15 días de tratamiento, que dejan al paciente vulnerable a las infecciones. Los agentes capaces de estimular las células madre de la médula ósea pueden facilitar y acelerar el injerto de las células madre, acortando así la ventana neutropénica después del trasplante de médula ósea.

10 Aunque los factores de crecimiento hematopoyético tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) pueden ejercer tales acciones, su uso es caro debido a que han de producirse mediante tecnología recombinante. Tales tratamientos de mejora postterapéuticos son innecesarios si los pacientes están "quimioprotégidos" frente a la supresión inmunitaria.

15 Los triglicéridos de cadena media (también denominados en el presente documento como "MCT") consisten en glicerol esterificado con ácidos grasos con longitudes de cadena de carbono de 8 (8C, ácido octanoico o ácido caprílico) y 10 (C10, ácido decanoico o ácido cáprico). Los MCT contienen habitualmente una mezcla de ésteres de glicerol de ácidos grasos C8 y C10. Sin embargo, los MCT también pueden contener pequeñas cantidades ($2 \pm 1\%$ cada uno) de ésteres de glicerol de C6 (ácido hexanoico o ácido caproico) y C12 (ácido dodecanoico o ácido láurico). CROMADOL™ es un MCT disponible comercialmente de Croda Ltd., Toronto (Canadá). Tal como se muestra en el ejemplo 1, CROMADOL™ es un MCT que contiene triésteres de glicerol de ácidos grasos C8 y C10 presentes en proporciones variables. Sin embargo, CROMADOL™ no contiene ningún éster de ácido graso C6 o C12.

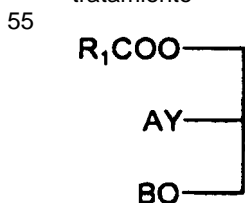
25 Los triglicéridos de cadena larga (también denominados en el presente documento "LCT") consisten en glicerol esterificado con ácidos grasos con longitudes de cadena superiores a 12. Los ácidos grasos típicos presentes en LCT incluyen ácidos palmítico (C16) y esteárico (C18). A diferencia de los MCT, los LCT son el componente principal de las grasas alimenticias. De hecho, los MCT y LCT tienen propiedades biológicas significativamente diferentes. Algunas de las diferencias fisiológicas entre MCT y LCT se describen en Harrison's Principles of Internal Medicine, 8ª edición, 1520-1521 (1977), McGraw Hill Book Company o 15ª edición, 1668-1669 (2001). Por ejemplo, los MCT, al contrario que los LCT, no requieren hidrólisis mediante la lipasa pancreática, puesto que pueden absorberse por las células epiteliales intestinales.

35 D. Waitzberg *et al.*, en Nutrition 13:128-132 (1997), indican que las emulsiones de lípidos (LCT y MCT) sólo disminuyen moderadamente la función bactericida de neutrófilos y no tienen efecto sobre monocitos. De hecho, la única publicación que facilita una vaga indicación de que los MCT pueden influir en la neutropenia describe estudios clínicos en los que se administran MCT junto con LCT y se comparan con LCT solos. No se han acometido estudios con MCT solos y por tanto el efecto sobre la función inmunitaria no es evidente. Sin embargo, los resultados notificados por S. Demirer *et al.* en Clinical Nutrition 19:253-258 (2000), enseñan que los MCT exacerban la neutropenia cuando se combinan con LCT y en relación con LCT solos. Es decir, se sugirió que los MCT inhiben la función y/o la supervivencia de neutrófilos. Apoyando en cierto modo esta sugerencia, el documento WO 95/30413 da a conocer el uso de ácidos grasos como aceleradores de la proliferación de las células madre hematopoyéticas. Sugiere que los ácidos grasos de cadena larga insaturados tales como el ácido linolénico, así como los ácidos grasos de cadena larga (C₁₆ o más larga) saturados, pueden tener la función de potenciar la proliferación de las células madre hematopoyéticas.

45 El documento WO 01/95914 da a conocer el uso de lípidos para modular la respuesta inmunitaria. Los lípidos tienen una estructura principal de glicerol que porta al menos una cadena de arilo o alquilo C₁₀₋₂₂.

Sumario de la invención

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de que determinados glicéridos son agentes quimioprotectores. Según la presente invención, un compuesto para uso en el trasplante de médula ósea o para uso en el tratamiento de un estado seleccionado de mielosupresión, heridas, neutropenia, es un glicérido de la fórmula para uso en el



en la que:

60 A y B son iguales o diferentes y son cada uno H o R₁CO;

R₁ es alquilo C₇ o C₉;

Y es O o NH.

5

La presente invención proporciona un medio para tratar los efectos mielosupresores de quimioterapia y radioterapia, y cualquier otra situación en la que la estimulación del sistema hematopoyético pueda ser de valor terapéutico tal como trasplante de médula ósea y neutropenia crónica, así como neutropenia que resulta de infecciones, enfermedades hematológicas y deficiencias nutricionales. Esto ayuda al sistema hematopoyético a contrarrestar la mielosupresión, aumentando la supervivencia y activación de neutrófilos, en pacientes que se someten a dichos tratamientos.

10

Descripción de la invención

15

Cuando se utiliza en quimioterapia y radioterapia, una composición que contiene el glicérido se administra antes, durante y/o después del tratamiento, con el fin de acortar la ventana neutropénica y acelerar la reposición del sistema hematopoyético. Además, es posible usar una combinación de glicéridos en múltiples puntos en relación con el tratamiento con quimioterapia y radioterapia. Alternativamente, es posible administrar la combinación simultáneamente, antes, durante y/o después del tratamiento con quimioterapia y radioterapia. En la neutropenia grave, se usa como agente terapéutico una composición que contiene el glicérido. En el trasplante de médula ósea, se usa el glicérido con el fin de aumentar el número de células madre periféricas disponibles para el trasplante después de quimioterapia o radioterapia ablativa. El glicérido también puede usarse después de trasplante de médula ósea, con el fin de estimular las células madre de la médula ósea, acortando así el período de tiempo de recuperación de la neutropenia.

20

Por tanto, la presente invención es útil para estimular la hematopoyesis para tratar la mielosupresión originada por quimioterapia o radioterapia; neutropenia crónica o transitoria; neutropenia inducida por fármacos y neutropenia originada por una enfermedad hematológica, deficiencia nutricional, infección o radioterapia. La neutropenia transitoria puede originarse a partir de estrés debido al transporte de un animal o al viaje de un ser humano o animal. La invención también es útil para estimular la hematopoyesis en la cicatrización de una herida en un paciente y para inducir la movilización de los neutrófilos para facilitar el trasplante de médula ósea en un paciente.

25

Tal como se usa en el presente documento, los términos “un” o “una” pueden significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se usen.

30

Tal como se usa en el presente documento, “composición que contiene el glicérido” se refiere a una composición que comprende dicho principio activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

35

Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sustancia que no interfiere con los efectos fisiológicos del glicérido y que no es tóxico para mamíferos, incluyendo seres humanos.

40

Una composición para uso en la presente invención se formula usando el glicérido y portadores farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ). Estas composiciones incluyen líquidos, aceites, emulsiones, aerosoles, inhaladores, cápsulas, píldoras, parches y supositorios.

45

Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el/los principio(s) activo(s) con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares.

50

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “quimioterapia” se refiere a un procedimiento de destrucción de células proliferantes usando un agente citotóxico. La expresión “durante la quimioterapia” se refiere al período durante el cual dura el efecto de la administración del agente citotóxico. La expresión “después de la quimioterapia” pretende cubrir todas las situaciones en las que se administra una composición después de la administración de un agente citotóxico independientemente de cualquier administración anterior del mismo y también independientemente de la persistencia del efecto del agente citotóxico administrado.

55

Cuando esta invención se aplica a quimioterapia, el glicérido puede administrarse antes de, durante o después de la quimioterapia (es decir, antes de, durante o después de la administración de un agente citotóxico).

60

Por “agente citotóxico” quiere decirse un agente que destruye células altamente proliferantes, por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus o células hematopoyéticas. Los ejemplos de un agente citotóxico que puede usarse en la práctica de la presente invención incluyen ciclofosfamida, doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, bleomicina, etopósido, topotecán, irinotecán, taxotere, taxol, 5-fluorouracilo, metotrexato, gemcitabina, cisplatino, carboplatino o clorambucilo, y un agonista de cualquiera de los compuestos anteriores. Un agente citotóxico también puede ser un agente antiviral, por ejemplo AZT (es decir, 3'-azido-3'-desoxitimidina) o

65

3TC/lamivudina (es decir, 3-tiazicidina).

Tal como se usa en el presente documento, "leucopenia" se refiere a una reducción anómala en el número de leucocitos en la sangre.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "neutropenia" se refiere a la presencia de números anómalamente pequeños de neutrófilos en la sangre.

10 En una realización preferida, la composición farmacéutica se encuentra en forma de cualquier composición adecuada para la administración oral, sublingual o mediante inhalación (pulverización nasal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, para uso en el tratamiento de la neutropenia.

15 Se apreciará que la cantidad de una composición de la presente invención requerida para uso en el tratamiento variará dependiendo de la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose, la edad y el estado del paciente, y estará finalmente a la discreción del médico responsable. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis individual o como dosis divididas tomadas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más dosis diarias.

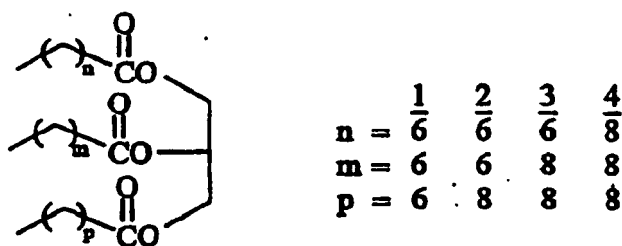
20 Aunque es posible que, para uso en la terapia, pueda administrarse el glicérido como producto químico bruto, es preferible presentar el principio activo como una formulación farmacéutica.

25 En una realización preferida de la presente invención, la cantidad de principio activo administrado es tal que la concentración en la sangre (libre y/o unido a albúmina sérica) es superior a 1 μ M. En una realización particularmente preferida, la concentración en sangre es superior a 1 mM.

30 En otra realización, la composición farmacéutica está en forma de administración oral (incluyendo sublingual) o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea, rectal e intravenosa). Las formulaciones, cuando sea apropiado, pueden presentarse convenientemente en unidades de dosificación diferenciadas y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y entonces, si es necesario, dar forma al producto para dar la formulación deseada. Cuando se desee, pueden emplearse las formulaciones adaptadas descritas anteriormente para proporcionar liberación sostenida del principio activo.

35 El glicérido también puede usarse en combinación con otros agentes terapéuticamente activos tales como agentes anticancerígenos citotóxicos u otros agentes anticancerígenos (fármacos que regulan o modulan el sistema inmunitario o vacunas terapéuticas o fármacos antiangiogénesis, etc.), fármacos inmunosupresores (incluyendo fármacos antiinflamatorios), un factor de crecimiento tal como un factor estimulante de colonias (preferiblemente GM-CSF o G-CSF), una citocina tal como interleucina 2 o interleucina 15, o combinaciones de los mismos. Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse o bien secuencialmente (antes o después) o bien simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas. La combinación a la que se hace referencia anteriormente puede presentarse convenientemente para uso en forma de una formulación farmacéutica y por tanto las formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación tal como se definió anteriormente junto con un portador farmacéuticamente aceptable de las mismas comprenden un aspecto adicional de la invención.

45 En una realización preferida, la composición contiene una mezcla de al menos dos compuestos descritos mediante la fórmula I, que son triglicéridos de cadena media (MCT) en la que A, B y R₁ son iguales y son grupos alquilo C7 y C9 de cadena lineal o ramificados, saturados o insaturados, respectivamente. Alternativamente, la composición contiene una mezcla de dos triglicéridos en la que se describe un primer MCT mediante la fórmula I, en la que A, B y R₁ son CH₃(CH₂)₆, y se describe un segundo MCT mediante la fórmula I, en la que A, B y R₁ son CH₃(CH₂)₈.
50 Alternativamente, la composición contiene además desde el 0,1% hasta el 3% cada uno de un tercer compuesto descrito mediante la fórmula I, en la que A, B y R₁ son CH₃(CH₂)₄, y un cuarto compuesto descrito mediante la fórmula I, en la que A, B y R₁ son CH₃(CH₂)₁₀. Alternativamente, la composición es una mezcla que contiene cuatro isómeros geométricos de triglicéridos de ácido graso C8 y C10 descritos mediante la siguiente fórmula:



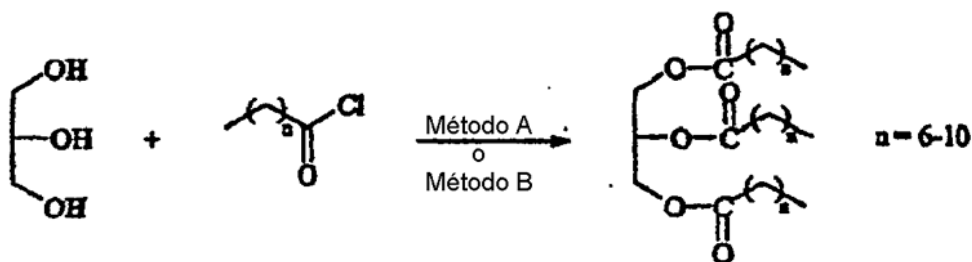
55 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la práctica de la presente invención. Se apreciará que la selección de la dosis de glicéridos que va a administrarse a un paciente individual (ser humano o animal) se encontrará dentro

de la discreción del médico responsable, se prescribirá de manera acorde a las dosificaciones apropiadas y dependerá del estadio de la enfermedad y factores similares únicamente dentro del ámbito del médico responsable.

Ejemplo 1: Análisis de CRODAMOL™ (MCT: triglicérido caprílico/cáprico)

5 Se analizó CRODAMOL™ GTCC, lote n.º T1033-1299 de Croda Ltd. (Toronto, Canadá) mediante cromatografía de gases. Análisis de CG/FID, condiciones del gradiente: 100°C-250°C en 10 minutos, luego 250°C durante 25 minutos; FID 250°C. Se observaron cuatro picos: 22,04 minutos (26%), 25,07 minutos (43%), 29,16 minutos (25%) y 34,75 minutos (5%). Se analizó una muestra de triglicérido caprílico (tricaprilina), obtenido de Sigma-Aldrich lote n.º
10 079H1212, mediante cromatografía de gases. Análisis de CG/FID, condiciones del gradiente: 100°C-250°C en 10 minutos, luego 250°C durante 25 minutos; FID 250°C. Principalmente un pico a los 22,31 minutos (98%).

Ejemplo 2: Acilación de alcohol usando cloruro de ácido y base de piridina



Método A: Piridina, CH₂Cl₂
Método B: DMAP, CH₂Cl₂

Método general A (piridina)

20 Se enfrió una disolución del alcohol (~0,1 M) en CH₂Cl₂ seco y piridina (4:1) hasta 0°C bajo nitrógeno, y se trató con el cloruro de ácido (1,2 equivalentes). Se dejó calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiental y se agitó durante la noche. El análisis de CCF (SiO₂, EtOAc 1:9 hexano) no mostró alcohol restante. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ y se lavó con disolución acuosa saturada de NH₄Cl. Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (x 1) y hexano (x 1), y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución acuosa saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a vacío dando el producto bruto.

Método general B (DMAP)

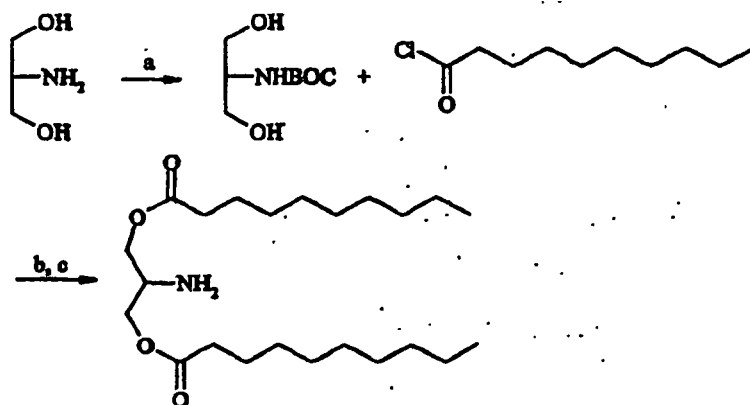
30 Se enfrió una disolución del alcohol (~0,1 M) en CH₂Cl₂ seco hasta 0°C bajo nitrógeno, y se trató con DMAP (1,3 equivalentes) y el cloruro de ácido (1,2 equivalentes). Se dejó calentar la reacción lentamente hasta temperatura ambiental y se agitó durante la noche. El análisis de CCF (SiO₂, EtOAc 1:9 hexano) no mostró alcohol restante. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ y se lavó con disolución acuosa saturada de NH₄Cl. Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (x1) y hexano (x1), y se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución acuosa saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a vacío dando el producto bruto.

Ejemplo 3: Triglicérido de ácido nonanoico

40 Se aciló glicerol (120 mg, 1,30 mmol) con cloruro de nonanoílo (751 µl, 4,16 mmol) según el método general A, ejemplo 2. La purificación mediante cromatografía en columna (Isolute™ SiO₂, eluyendo con el 0-5% de EtOAc en hexano) dio dos fracciones que contenían producto, que se evaporaron a vacío dando el producto deseado como un líquido incoloro, con una pureza del 89% (127 mg, 19%) y del 93% (475 mg, 71%) respectivamente (CG/FID). R_f 0,46 (SiO₂, acetato de etilo al 10% en hexano); ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H = 5,27 (m, 1H), 4,29 (dd, 2H), 4,14 (dd, 2H), 2,31 (m, 6H), 1,61 (m, 6H), 1,27 (m, 30H), 0,88 (t, 9H); MS (FAB⁺) m/z = 510(M-H⁺); análisis de CG/FID, condiciones: gradiente 100°C-250°C en 10 minutos, luego 250°C durante 25 minutos; FID 250°C; 27,25 minutos.

Ejemplo 3: 1,2,3-O,N,O-tridecanoilserinol

50 Se aciló serinol (51 mg, 0,56 mmol) con cloruro de decanoílo (372 µl, 1,76 mmol) según el método general B, ejemplo 2. La purificación mediante MPLC (SiO₂, eluyendo con el 0, después el 10% de EtOAc en hexano) dio el producto deseado como un sólido de color blanco (301 mg, 97%). Pf 54°C; CCF, R_f 0,85 (SiO₂, EtOAc 2:3 hexano); ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0,84 (9H, t), 1,20-1,27 (36H, m), 1,52-1,60 (6H, m), 2,13 (2H, t), 2,28 (4H, t), 4,03 (2H, 2 x A de 2 x ABX), 4,19 (2H, 2 x B de 2 x ABX), 4,41-4,46 (1H, m), 5,70 (1H, d); EMAR m/e cal. para C₃₃H₆₃NO₅ 553,4706 hallado 553,4713. Análisis de CG-FID, condiciones del gradiente: 100°C-250°C en 10 minutos, luego 250°C durante 25 minutos; FID 250°C. Principalmente un pico a 14,80 minutos (98%).

Ejemplo 4: 1,3-O,O-didecanoilserinol

a) BOC-ON, Et₃N; b) DMAP, CH₂Cl₂; c) HCl.

- 5 Se trató una disolución de serinol (1,57 gm, 17,2 mmol) en acetona (17 ml) y agua (17 ml), con trietilamina (3,60 ml, 25,9 mmol) y BOC-ON (4,67 gm, 19,0 mmol), y se agitó la reacción bajo nitrógeno durante la noche. Se evaporó la acetona a vacío y se repartió la mezcla bruta entre BtOAc y agua. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc (x 3), y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a vacío, dando un sólido de color amarillo. La purificación mediante MPLC (SiO₂, eluyendo con del 40 al 80% de EtOAc en hexano) dio el producto intermedio *N*-BOC-diol como un sólido cristalino de color blanco (2,10 gm, 64%). CCF, R_f 0,15 (SiO₂, EtOAc 4:1 hexano); ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 1,40 (9H, s), 3,54-3,56 (5H, m).

- Se aciló el producto intermedio *N*-BOC-diol (50 mg, 0,26 mmol) con cloruro de decanoílo (173 µl, 0,83 mmol) según el ejemplo 2. La purificación mediante MPLC (SiO₂, eluyendo con el 10% de EtOAc en hexano) dio el producto intermedio *N*-BOC-diacilo como un aceite incoloro (115 mg, 88%). CCF, R_f 0,80 (SiO₂, EtOAc 2:3 hexano); ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0,87 (6H, t), 1,23-1,30 (24H, m), 1,44 (9H, s), 1,56-1,70 (4H, m), 2,31 (4H, t), 4,04-4,21 (4H, m), 4,77-4,80 (1H, m), 6,73 (1H, d). Se enfrió una disolución del producto intermedio *N*-BOC-diacilo (76 mg, 0,15 mmol) en CH₂Cl₂ seco (1,5 ml) hasta 0°C, y se trató con una disolución de HCl anhidro 4,0 M en 1,4-dioxano (375 µl, 1,50 mmol; concentración final 0,8 M). Se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 h a la misma temperatura. Se añadió una porción adicional de HCl anhidro 4,0 M en 1,4-dioxano (375 µl, 1,50 mmol) y se agitó la reacción durante 2 h adicionales. La evaporación de los disolventes dio el producto deseado, como un sólido de color blanco (69 mg, 100%). Pf 101°C; CCF, R_f 0,40 (SiO₂, EtOAc 2:3 hexano); ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0,88 (6H, t), 1,20-1,29 (24H, m), 1,55-1,65 (4H, m), 2,45-2,52 (4H, m), 3,72-3,80 (1H, m), 4,30-4,51 (2H, m), 8,6-9,0 (3H, m a); EMAR m/e cal. para (M-HCl), C₂₃H₄₅NO₄ 339,3348 hallado 339,3340; análisis de CG-FID, condiciones del gradiente: 100°C-250°C en 10 minutos, luego 250°C durante 25 minutos; FID 250°C. Principalmente un pico a 17,14 minutos (94%).

Ejemplo 5: Ensayos *in vitro* de apoptosis y supervivencia de neutrófilos

- 30 Se midió la supervivencia de neutrófilos tal como se describe por Lagraoui y Gagnon (Cell. Mol. Biol. 43:313-318, 1997). Se obtuvieron neutrófilos a partir de la sangre periférica de voluntarios sanos. Se sometió la sangre a centrifugación en gradiente con Lympholyte-poly (Cedarlane, Hornby, Canadá) seguido por lisis hipotónica de eritrocitos contaminantes. Se suspendieron las células en RPMI (Gibco, Burlington, Canadá) complementado con FBS al 10% (Hyclone, Logan EE.UU.). Las preparaciones celulares finales consistían en >95% de neutrófilos tal como se determinó mediante tinción con Wright Giemsa. La viabilidad era superior al 97% tal como se determinó mediante exclusión de azul trípango. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) tienen una semivida corta y experimentan rápidamente cambios característicos indicativos de apoptosis. Se evaluó la apoptosis según el método descrito por Nicoletti *et al.*, J. Immunol. Met. 139:271-279 (1991). Brevemente, se incubaron neutrófilos recién aislados durante 24 h a 37°C con diferentes concentraciones de MCT. Tras la incubación, se tiñeron las células con yoduro de propidio (PI, Sigma) y se analizaron para determinar la apoptosis usando un citómetro de flujo XL (Coulter). Entonces se expresaron los datos como el porcentaje de células apoptóticas. La figura 1 representa una compilación de varios experimentos en los que se midió la apoptosis de neutrófilos en ausencia (control) o presencia de diversas concentraciones de MCT. Los resultados indican que en presencia de MCT *in vitro*, se inhibe la apoptosis de neutrófilos hasta un 90% y que la inhibición depende de la dosis. Por tanto, los MCT pueden aumentar la supervivencia de neutrófilos y pueden usarse como factor de supervivencia de neutrófilos.

Ejemplo 6: Ensayos *in vitro* de fagocitosis de PMN

Se incubaron neutrófilos (2 x 10⁶/ml) durante 24 h, a 37°C en un 5% de CO₂ y un 95% de humedad con diversas

concentraciones de MCT. Tras 24 h, se determinó la viabilidad mediante exclusión de azul trípango y se lavaron las células tres veces con PBS que contenía glucosa 2 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM. Entonces se ajustó la concentración de células a 1 x 10⁶ células/ml y entonces se incubaron con microesferas de carboxilato de Fluoresbrite (dilución 1/10). Tras 30 minutos de incubación, se lavaron los neutrófilos y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Se analizaron los neutrófilos fijados para determinar la ingestión de microesferas usando citómetro de flujo XL (Coulter). Entonces se expresaron los datos como el porcentaje de células fagocíticas. La figura 2 representa una compilación de varios experimentos que miden la actividad fagocítica de PMN en ausencia (control) o presencia de diversas concentraciones de MCT. Los resultados indican que los MCT potencian la actividad fagocítica de PMN humanos. La actividad fagocítica se potencia hasta de dos a tres veces a partir de los valores control y el grado de la estimulación depende del estado inmunitario del donante.

Ejemplo 7: Efecto de doxorubicina sobre la apoptosis de neutrófilos

Se aislaron PMN tal como se describe en el ejemplo 5. Se incubaron las células (2 x 10⁶/ml) durante 4 h a 37°C en un 5% de CO₂ y un 95% de humedad en presencia de diversas concentraciones de un agente quimioterápico, doxorubicina. Se evaluaron las células apoptóticas tal como se describe en el ejemplo 10. Se expresan los datos en porcentaje de células apoptóticas. Las figuras 3A y 3B indican que la doxorubicina induce la apoptosis de PMN.

Ejemplo 8: MCT rescata la apoptosis de neutrófilos inducida por doxorubicina

Se aislaron PMN tal como se describe en el ejemplo 5. Se incubaron células (2 x 10⁶/ml) durante 4 h a 37°C en un 5% de CO₂ y un 95% de humedad en presencia de diversas concentraciones de doxorubicina con o sin MCT (al 2,5% y al 5,0%). Se evaluaron las células apoptóticas tal como se describe en el ejemplo 5. Se expresan los datos en porcentaje de células apoptóticas. La tabla 1 representa dos experimentos que miden los efectos quimioprotectores de MCT sobre PMN. Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas tras 4 h de incubación en presencia o ausencia de doxorubicina con o sin MCT. Como en el ejemplo 7, la doxorubicina induce la apoptosis de PMN *in vitro*. Sin embargo, en presencia de MCT, a una concentración del 2,5% y del 5% (v/v), se inhiben los efectos apoptóticos de la doxorubicina. Por tanto, MCT ejercen una acción antiapoptótica sobre PMN. También se estudió la apoptosis usando el método de anexina V-FITC/PI (yoduro de propidio) según las recomendaciones del fabricante, Biosources (kit de apoptosis Apotarget Annexin-VFITC n.º PHN 1018). La anexina V se une a fosfatidilserina que se transfiere desde la membrana interna a la externa en la fase temprana a tardía de la apoptosis. Brevemente, se incuban neutrófilos en presencia o ausencia de concentraciones variables de doxorubicina y MCT. Tras 24 h, se lavan los neutrófilos con PBS y se tiñen con 2 µl de anexina V-FITC y 10 µl de PI (Sigma, 1 mg/ml) durante 20 minutos. Tras la incubación, se fijaron las células teñidas en paraformaldehído (1%) y se analizaron para determinar la apoptosis usando un citómetro de flujo XL (Coulter). Entonces se expresaron los datos como el porcentaje de células apoptóticas. La figura 4A representa la respuesta en un transcurso de tiempo de MCT sobre neutrófilos tratados con doxorubicina. Los MCT rescata la apoptosis inducida por doxorubicina de neutrófilos humanos de manera dependiente de la dosis y del tiempo.

La figura 4B representa la respuesta en un transcurso de tiempo de doxorubicina sobre neutrófilos tratados con MCT. Los MCT protegen, de manera dependiente de la dosis, a los neutrófilos frente a la apoptosis inducida por doxorubicina hasta 4 h antes de la introducción del agente tóxico (doxorubicina).

Tabla 1

Efecto protector de MCT sobre la apoptosis de neutrófilos inducida por doxorubicina						
Concentración de doxorubicina	% de apoptosis de neutrófilos (PMN)					
	Experimento 1			Experimento 2		
	Control	MCT al 2,5% (v/v)	MCT al 5% (v/v)	Control	MCT al 2,5% (v/v)	MCT al 5% (v/v)
0	12,4	9,5	12,3	49,6	23,6	4,6
10 ⁻¹⁰ M	9,3	11,7	7,4	60,6	14,7	23,9
10 ⁻⁸ M	18,7	14,2	8,3	59,2	32,5	14,8
10 ⁻⁶ M	23,2	12,7	3,5	55,0	21,6	16,9
10 ⁻⁵ M	23,8	12,3	8,3	66,2	74,7	12,1
10 ⁻⁴ M	27,5	35,2	17,1	53,2	58,6	55,7

Ejemplo 9: MCT rescata la apoptosis de neutrófilos inducida por doxorubicina: Comparación con GM-CSF

La tabla 2 representa el efecto de GM-CSF, MCT y tricaprilina sobre la apoptosis de neutrófilos humanos inducida por doxorubicina. GM-CSF y MCT pueden rescatar o proteger neutrófilos humanos frente a la apoptosis inducida por doxorubicina. La tricaprilina rescata la apoptosis inducida por doxorubicina y potencia además la viabilidad de

neutrófilos humanos en un grado superior al observado en los neutrófilos no tratados (control, ausencia de doxorubicina).

Tabla 2

Efecto protector de MCT y GM-CSF sobre la apoptosis de neutrófilos inducida por doxorubicina	
	% de viabilidad de PMN
Control	35,9 ± 0,71
Doxorubicina (DOX) (10^{-5} M)	6,82 ± 0,5
GM-CSF (10^{-7} M) + DOX	16,75 ± 2,05
GM-CSF (10^{-8} M) + DOX	6,99 ± 0,23
MCT (24 mM) + DOX	14,20 ± 1,98
MCT (12 mM) + DOX	12,37 ± 1,72
Tricaprilina (24 mM) + DOX	12,13 ± 1,25
Tricaprilina (12 mM) + DOX	42,95 ± 6,15

5

Ejemplo 10: MCT y tricaprina aumentan la proliferación de médula ósea murina *in vitro*

Se obtuvieron células de médula ósea a partir del fémur de ratones C57BL/6 hembra (de 6 a 8 semanas de edad). Se enjuagaron las células y se lavaron con PBS. Se centrifugan las células recogidas y se resuspenden a 2×10^6 células/ml. Se incuban 100 μ l de células (2×10^5 células) en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 48 h en presencia o ausencia de MCT o tricaprina. Tras la incubación, se pulsan las células con 1 μ Ci de [3 H]-timidina durante 6 h. Se recogen las placas en un aparato Tomteck y se recuentan en un contador β Microbeta. La incorporación de [3 H]-timidina en el ADN es una indicación directa de la proliferación celular. La figura 5 representa un experimento típico del efecto de MCT y tricaprina sobre la proliferación de médula ósea. MCT y tricaprina aumentan la proliferación de médula ósea en de 3 a 5 veces en relación con el control.

10

15

Ejemplo 11: Estudios de quimioprotección: inducción *in vivo* de proliferación o protección de células inmunitarias mediante MCT

Se sometieron a inmunosupresión ratones C57BL/6 hembra, de 6 a 8 semanas de edad, mediante tratamiento con 80 mg de 5-fluorouracilo (5-FU) o 100-200 mg de ciclofosfamida (CY) o 12 mg de taxotere (TX) administrados por vía intravenosa en el día 0. Para examinar el efecto inmunoprotector de MCT u otros compuestos, se trataron previamente los ratones por vía oral en el día -3, -2 y -1 o se les trató por vía intravenosa en el día 0 con el compuesto de prueba. Se sacrificaron los ratones en el día +5 mediante punción cardiaca y dislocación cervical. Entonces, se prepararon suspensiones de células a partir del timo, el bazo y la médula ósea tal como sigue. Se trituraron los tejidos en tampón PBS buffer y se lisaron los eritrocitos contaminantes en tampón ACK (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 12 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,3) durante 5 minutos. Entonces se recogieron las células mediante centrifugación y se lavaron tres veces en PBS y se resuspendieron en medio de cultivo tisular. Se contaron las células en un hemocitómetro. Los resultados muestran que los MCT aumentan significativamente el número de células en tejido inmunitarios de animales normales e inmunosuprimidos en comparación con el vehículo solo tal como se muestra en las siguientes tablas y figuras. Dependiendo de los experimentos y el estado inmunitario de los ratones, los MCT pueden aumentar los recuentos de células de médula ósea y/o de células de bazo y/o de células de timo. La figura 6 muestra el efecto de MCT sobre el recuento de células de médula ósea en animales inmunosuprimidos. Sólo CY y 5-FU deprimieron el recuento de células de médula ósea en comparación con el control (sin tratamiento citotóxico). En ratón, el tratamiento con taxotere no tiene ningún efecto significativo sobre recuento de células de médula ósea. En médula ósea suprimida, la administración de MCT (6,25 μ moles por ratón) en el día -3, -2 y -1 potenció significativamente el recuento de células de médula ósea.

20

25

30

35

La figura 7 representa el efecto de MCT sobre el recuento de células de bazo en ratones inmunosuprimidos que recibieron el régimen de tratamiento previo de MCT por v.o. Todos los fármacos citotóxicos (CY, 5-FU y TX) reducen significativamente el recuento de células de bazo en comparación con el control. La administración de MCT (6,25 μ moles por ratón) en el día -3, -2 y -1 aumenta significativamente el recuento de células de bazo siendo "P" inferior a 0,0017, 0,009 y 0,0036 para CY, 5-FU y TX respectivamente.

40

Además, MCT potencia significativamente el recuento de células de médula ósea en ratones normales cuando se administra por vía i.v. en el día 0 (tabla 3). Sin embargo, una inyección i.v. de MCT no es suficiente para mejorar el recuento de células de bazo en ratones tanto normales como inmunosuprimidos.

45

Tabla 3

Efecto de ciclofosfamida (CY) y CY + MCT sobre células de médula ósea y bazo (ratones normales)				
	Médula ósea		Bazo	
	n.º de células ($\times 10^6$)	P	n.º de células ($\times 10^6$)	P
Control	16 \pm 3,94		94 \pm 11	
CY	13 \pm 3,92	0,17	60 \pm 12	0,0014
CY + MCT (50 μ moles)	17 \pm 4,28	0,87	53 \pm 10	0,0003
CY + MCT (12,5 μ moles)	17 \pm 6,15	0,95	51 \pm 10	0,0002
MCT (50 μ moles)	41 \pm 6,11	>0,0001	103 \pm 7	0,19
MCT (12,5 μ moles)	27 \pm 4,19	0,0018	101 \pm 11	0,31

Ejemplo 12: Estudios de quimioprotección: respuesta a la dosis *in vivo* de la inducción mediante MCT de la proliferación de células inmunitarias cuando se administra en el día-3, -2 y -1 en ratones normales

5 Se evaluó la respuesta a la dosis *in vivo* de la inducción mediante MCT de la proliferación de células inmunitarias en ratones normales mediante el protocolo descrito en el ejemplo 11. La tabla 4 representa la respuesta a la dosis en el tratamiento de MCT administrado por vía oral en el día -3, -2 y -1 en ratones normales. MCT aumenta significativamente los recuentos de células de médula ósea y bazo.

10

Tabla 4

Efecto de MCT sobre ratones normales				
	Médula ósea		Bazo	
	n.º de células ($\times 10^6$)	P	n.º de células ($\times 10^6$)	P
Control	45 \pm 7,3		120 \pm 12,9	
MCT (3,15 μ moles)	52 \pm 4,3	0,10	144 \pm 15,8	0,018
MCT (6,25 μ moles)	59 \pm 11,3	0,05	134 \pm 13,9	0,129
MCT (12,5 μ moles)	54 \pm 6	0,04	144 \pm 19,8	0,04
MCT (25 μ moles)	56 \pm 3,9	0,01	127 \pm 17,0	0,48

Ejemplo 13: Estudios de quimioprotección: inducción *in vivo* de la proliferación o protección de células inmunitarias: comparación del efecto de MCT frente a GM-CSF

15 Se acometió la comparación *in vivo* de la inducción de la proliferación/regeneración o protección de células inmunitarias siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 11. Se realizaron estudios comparativos de MCT y GM-CSF en animales normales e inmunosuprimidos. En comparación con MCT, GM-CSF no tiene actividad significativa sobre los recuentos de células de médula ósea y bazo en animales inmunosuprimidos. Se observó un efecto significativo de GM-CSF sólo en el peso del timo en ratones normales (figura 8). En este caso, MCT presentó un efecto similar a GM-CSF.

20

Ejemplo 14: Estudios de quimioprotección

25 Se evaluó el efecto de tricaprulina y tricaprina sobre la inducción *in vivo* de proliferación o protección de células inmunitarias mediante el protocolo descrito en el ejemplo 11. La tricaprulina y tricaprina son ambas eficaces en la proliferación o protección de recuentos de células de médula ósea en ratones tratados con CY (tabla 5). No se observó ningún efecto significativo sobre el recuento de células de bazo, en comparación con ratones tratados con ciclofosfamida.

30

Tabla 5

Efecto de ciclofosfamida (CY), CY + tricaprulina y CY + tricaprina sobre células de médula ósea y de bazo						
	Médula ósea			Bazo		
	n.º de células ($\times 10^6$)	P/Control	P/CY	n.º de células ($\times 10^6$)	P/Control	P/CY
Control	55 \pm 9,3			113 \pm 15,9		

CY	22 ± 5,8	0,0001		36 ± 13,6	>0,0001	
CY + tricaprilina	34 ± 7,8	0,0033	0,022	37 ± 12,6	>0,0001	0,8
CY + tricaprina	31 ± 3,8	0,0008	0,012	38 ± 6,8	>0,0001	0,7

Ejemplo 15: Estudios de quimioprotección

5 Se evaluó el efecto de trilaurina y trimiristina sobre la inducción *in vivo* de proliferación o protección de células inmunitarias mediante el protocolo descrito en el ejemplo 11. La trilaurina y trimiristina tienen actividad débil (no significativa) sobre los recuentos de células de médula ósea y bazo en ratones inmunosuprimidos con CY (tabla 6).

Tabla 6

Efecto de ciclofosfamida (CY), CY + trilaurina y CY + trimiristina sobre células de médula ósea y de bazo						
	Médula ósea			Bazo		
	n.º de células (x10 ⁶)	P/Control	P/CY	n.º de células (x10 ⁶)	P/Control	P/CY
Control	49 ± 7,3			105 ± 23		
CY	27 ± 2,8	0,0014		19 ± 6,5	0,0007	
CY + trilaurina (6,25 µM)	31 ± 6,8	0,0028	0,219	28 ± 19,5	0,0004	0,302
CY + trimiristina (6,25 µM)	31 ± 9,9	0,0067	0,402	15 ± 4,6	0,0007	0,314

10 **Ejemplo 16: Estudios de quimioprotección**

Se evaluó el efecto de MCT, caprilato de sodio y caprato de sodio sobre la inducción *in vivo* de proliferación o protección de células inmunitarias mediante el protocolo descrito en el ejemplo 11. Se observó un aumento significativo en la proliferación o protección del recuento de células de médula ósea con tratamiento previo con MCT, caprilato de sodio y caprato de sodio en ratones tratados con CY (figura 9).

Ejemplo 17: Estudios de quimioprotección: regímenes de tratamiento posterior

20 Se realizaron estudios de quimioprotección tal como se describe en el ejemplo 11 excepto porque se trataron (posteriormente) ratones con MCT, caprilato de sodio, caprato de sodio o ácido cáprico por vía v.o. en el día 1, 2, 3 y 4. Se observó un aumento significativo en el recuento de células de médula ósea con el tratamiento posterior de MCT, caprilato de sodio y caprato de sodio en ratones tratados con CY (tabla 7).

Tabla 7

Efecto del tratamiento posterior con ciclofosfamida (CY), CY + MCT, CY + caprilato de sodio y CY + caprato de sodio sobre células de médula ósea y de bazo						
	Médula ósea			Bazo		
	n.º de células (x10 ⁶)	P	P/CY	n.º de células (x10 ⁶)	P	P/CY
Control	52 ± 6,17			110 ± 29,3		
CY	19 ± 4,99	>0,0001		30 ± 9,5	0,0007	
CY + MCT (12,5 µM)	26 ± 3,70	>0,0001	0,0189	38 ± 7,2	0,0014	0,163
CY + caprilato de sodio (12,5 µM)	26 ± 5,33	>0,0001	0,0455	36 ± 12,5	0,0009	0,394
CY + caprato de sodio (12,5 µM)	29 ± 4,45	0,0001	0,0140	28 ± 6,3	0,0007	0,696

25 **Ejemplo 18: Estudios de quimioprotección: ensayo de inmunofenotipado**

Se trataron previamente ratones C57BL/6 hembra, de 6 a 8 semanas de edad, en el día -3, -2 y -1 por vía v.o. o por vía intravenosa el día 0 con diferentes concentraciones de MCT. También se realizó el inmunofenotipado en animales inmunosuprimidos. Se logró la inmunosupresión con 80 mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU) o de 100 a 200 mg/kg de ciclofosfamida (CY) o 12 mg/kg de taxotere (TX) inyectados por vía i.v. en el día 0. Se sacrificaron los ratones en el día 5 mediante punción cardíaca. Se recogieron sangre y bazos y se prepararon suspensiones celulares y se lisaron eritrocitos en tampón ACK (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 12 mM, BDTA 0,1 mM, pH 7,3) durante 5 minutos. Se lavaron las células tres veces en PBS, pH 7,4 y se resuspendieron en medio de cultivo tisular. Entonces se incubaron las células durante 45 minutos en hielo con marcador de superficie celular conjugado con isotiocianato

de fluoresceína (FITC) o ficoeritina (PE) según la recomendación del fabricante (Gibco/BRL, Cedarlane, Boehringer Mannheim). Entonces se lavaron las células en PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron con un citómetro de flujo Coulter XL. Se acometió el análisis de los subconjuntos de células mediante la determinación de marcadores de superficie celular convencionales que eran tal como sigue: TCR (receptor de células T), CD4- (T auxiliar), CD8 (T citotóxico/supresor), CD11b (macrófago), NK (células NK) y Ly5 (células B). Se obtuvieron células de médula ósea tal como se describe en el ejemplo 10. Se tiñeron las células mediante una incubación de 45 minutos de marcador de superficie celular conjugado con FITC o PE según la recomendación del fabricante. Entonces se lavaron las células en PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron con un citómetro de flujo Coulter XL. Se acometió el análisis de los subconjuntos de células mediante la determinación de marcadores de superficie celular convencionales que eran tal como sigue: CD34 (células progenitoras hematopoyéticas), CD41 (plaquetas, megacariocitos), CD 13 (células madre mielomonocíticas, mielocitos, promonocitos) y CD38 (células madre linfoides, pro-B, pre-B). La tabla 8 representa el efecto de MCT sobre el inmunofenotipado de sangre y bazo en ratones normales. En el inmunofenotipado de sangre, los MCT aumentan subconjuntos de células CD8+ y LY5+. En algunos experimentos, MCT aumenta débilmente el subconjunto LY5-TCR- (datos no mostrados). En el inmunofenotipado de bazo, MCT aumenta significativamente el porcentaje relativo de células LY5+TCR+ y CD4+. LY5-TCR- no son células B ni T que pueden representar los neutrófilos. Cuando se administran a ratones inmunosuprimidos, MCT aumenta el porcentaje relativo de células LY5-TCR- (probablemente neutrófilos) y CD11+ (macrófagos) en el inmunofenotipado de sangre y bazo en comparación con ciclofosfamida solo. Estos subconjuntos de células se originan a partir del precursor de células mieloides (tabla 9).

Tabla 8

Efecto de MCT sobre inmunofenotipado de sangre y bazo en ratones normales				
Subconjuntos de células	Control	6,25 μ M	12,5 μ M	50 μ M
Inmunofenotipado de sangre				
CD8+	12,76 \pm 1,23	16,41 \pm 1,16 p \leq 0,0004	-	13,18 \pm 2,08 p = 0,68
LY5+	15,57 \pm 6,91	24,0 \pm 4,92 p < 0,037	-	26,75 \pm 4,11 p < 0,01
Inmunofenotipado de bazo				
LY5-TCR-	13,02 \pm 2,54	-	16,84 \pm 0,83 p < 0,0257	-
CD4+	19,9 \pm 1,09	22,25 \pm 1,64 p \leq 0,013	-	22 \pm 0,47 p < 0,091

Tabla 9

Efecto de MCT sobre inmunofenotipado de sangre y bazo en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (CY, 200 mg/kg)				
Subconjuntos de células	CY	6,25 μ M	12,5 μ M	50 μ M
Inmunofenotipado de sangre				
LY5-TCR-	36,82 \pm 9,93	-	51,67 \pm 11, 10 p \leq 0,05	46,32 \pm 5,63 p = 0,1254
CD11+	26,41 \pm 4,54	-	42,12 p < 0,0119	42,56 \pm 8,62 p < 0,0098
Inmunofenotipado de bazo				
LY5-TCR-	20,02 \pm 4,05	23,92 \pm 1,61 p < 0,07 (débil)	-	-
CD11+	16, 31 \pm 4,85	27,47 \pm 11,48 p \leq 0,06 (débil)	-	-

25 **Ejemplo 19: Estudios de quimioprotección: inmunofenotipado de médula ósea**

Se evaluó el efecto de MCT, caprilato de sodio, caprato de sodio sobre el inmunofenotipado de médula ósea mediante el protocolo descrito en el ejemplo 18. El tratamiento con ciclofosfamida induce un aumento significativo en todos los conjuntos estudiados (CD34+, CD13+, CD41+ y CD38+). La adición de MCT o caprilato de sodio o caprato de sodio amplifica el número del linaje de CD13+ que son células madre mielomonocíticas, mielocitos y promonocitos. Este aumento en el porcentaje relativo de CD13+ es significativo en comparación con ciclofosfamida sola. Los resultados demuestran claramente que MCT y otros compuestos relacionados inducen un aumento significativo en el número de células de médula ósea (tal como se muestra a modo de ejemplo en los ejemplos anteriores) y potencian además el porcentaje relativo de precursor de células fagocíticas (PMN y monocitos). Esto puede dar como resultado una mejor recuperación del tratamiento citotóxico o protección frente a agentes infecciosos (tabla 10).

Tabla 10

Efecto de MCT, caprilato de sodio y caprato de sodio sobre el inmunofenotipado de médula ósea en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (CY, 200 mg/kg)				
% de células	CD34+	CD13+	CD41+	CD38+
Control	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	29,8 ± 6,5
Ciclofosfamida (CY)	10 ± 1,0	32 ± 0,5	4,2 ± 0,6	39,6 ± 13,6
CY+MCT	11,2 ± 1,3	4,5 ± 0,5 p<0,001	4,5 ± 0,4	42 ± 15,7
CY + Caprilato de sodio	11,2 ± 1,3	4,9 ± 1,2 p<0,017	4,6 ± 1,3	36 ± 9,7
CY + Caprato de sodio	9,1 ± 3,1	4,7 ± 1,7 p<0,06	3,7 ± 0,7	44,3 ± 22,8

Ejemplo 20: Estudios de quimioprotección

- 5 Se evaluó el efecto de tridecanoilserinol y didecanoilserinol sobre la inducción *in vivo* de la proliferación o protección de células inmunitarias mediante el protocolo descrito en el ejemplo 11. Tal como se muestra en la tabla 11, el tridecanoilserinol potencia significativamente los recuentos de células de bazo. No se demostró ningún efecto significativo sobre los recuentos de células de médula ósea.

10 Tabla 11

Efecto de ciclofosfamida (CY), CY+tridecanoilserinol y CY+didecanoilserinol sobre células de médula ósea y bazo						
	Médula ósea			Bazo		
	n.º de células (x10 ⁶)	P/Control	P/CY	n.º de células (x10 ⁶)	P/Control	P/CY
Control	53 ± 4,8			113 ± 15,5		
CY	28 ± 3,4	>0,0001		29 ± 9,2	>0,0001	
CY + tridecanoilserinol	28 ± 4,6	>0,0001	0,95	42 ± 8,4	>0,0001	0,035
CY + didecanoilserinol	30 ± 3,8	>0,0001	0,54	36 ± 9,9	>0,0001	0,27

Ejemplo 21: Actividad antitumoral

- 15 Se inyectaron por vía intravenosa a ratones C57BL/6 hembra de 6-8-semanas de edad en el día 0 1×10^5 células de melanoma B 16F 10 de la ATCC (fuente del cultivo celular, Dr. L J. Fidler). Entonces se les inyectó a los animales por vía i.v. con o sin MCT (25 μ moles/ratón) en el día 7, 9, 14 y 16 y doxorubicina 10 mg/kg en el día 10 y 17. Se sacrificaron los ratones en el día 22. Se registró el peso corporal y el volumen tumoral. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4 (a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Se realizó este experimento para verificar si los
- 20 MCT no exacerban o protegen las células cancerosas en vez de las células inmunitarias. La figura 10 representa el efecto quimioprotector y la eficacia antitumoral de MCT en combinación con una concentración subterapéutica de doxorubicina en el modelo de melanoma B16F10. MCT induce una reducción débil (T/C de aproximadamente el 20%) del volumen tumoral cercano a la concentración subterapéutica de doxorubicina (reducción de aproximadamente el 25% de T/C) cuando se usa sola. Se observa un efecto aditivo cuando se usa MCT en
- 25 combinación con doxorubicina (T/C de aproximadamente el 45 al 50%). Estos resultados indican que es posible lograr la actividad terapéutica cuando se combina MCT con una concentración subterapéutica de fármacos citotóxicos.

Ejemplo 22: Actividad antitumoral

- 30 Se originó el tumor singénico DMBA3 (DA-3, modelo de carcinoma de mama) a partir de una lesión preneoplásica tratada con 7,12-dimetilbenzantraceno en ratones BALB/c hembra. Se hicieron crecer células DA-3 como cultivos en monocapa en frascos de plástico en RPMI-1640 que contenía aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 0,1 μ M, L-glutamina 2 mM y sulfato de gentamicina 100 μ g/ml. Se complementó adicionalmente esto con 2-
- 35 mercaptoetanol 50 μ M y suero bovino fetal al 10%. Se hicieron pases en serie de los tumores DA-3 *in vivo* mediante inoculación s.c. de 5×10^5 células tumorales viables para producir tumores localizados en ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Entonces se monitorizaron en serie los animales mediante palpación manual para detectar pruebas de tumor. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4 (a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular
- 40 menor. Los tumores eran palpables, en general, 7-10 días tras la inoculación. Se usaron dos regímenes de tratamiento para la evaluación de la eficacia y protección antitumoral de MCT en combinación con ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) y taxotere (TX, 20 mg/kg) en el modelo de tumor DA-3. Se inyectaron a ratones BALB/c células

tumorales en el día 0. Se realizó el tratamiento con MCT por vía v.o. en el día 6, 7 y 8; día 13, 14 y 15; día 20, 21 y 23 seguido por tratamiento con CY o TX administrados por vía i.v. como inyección en bolo individual en el día 9 y 16. Se monitorizaron los pesos corporales y los volúmenes tumorales desde el día 4 hasta el día 23. En el día 23, se sacrificaron todos los animales. Se calculó el % de T/C (tratamiento con respecto a control) como la razón de volúmenes tumorales en la fecha de terminación en el grupo de tratamiento divididos entre los respectivos volúmenes en el grupo control multiplicados por 100. Mediante los criterios de NCI, el producto se considera eficaz si el % de T/C es $\leq 40\%$. Se realizó este experimento para verificar si MCT no exacerbaba o protegía las células cancerosas en vez de las células inmunitarias. La figura 11 muestra el efecto quimioprotector y la eficacia antitumoral de MCT en combinación con una concentración subterapéutica de CY y TX en el modelo de carcinoma de mama DA-3. MCT induce una reducción débil (TC de aproximadamente el 18%) del volumen tumoral en comparación con el control. Cuando se usa MCT en combinación con CY o TX, no se observa exacerbación del volumen tumoral. Sin embargo, cuando se usa en combinación con CY, se observa una respuesta terapéutica (T/C = 39,4%). Estos resultados indican que puede lograrse actividad terapéutica cuando se combina MCT con una concentración subterapéutica de CY. Este efecto puede deberse a un aumento global en la eficacia de células inmunitarias en animales tratados con MCT (figura 11 y tabla 12).

Tabla 12

Efecto de MCT sobre el volumen tumoral en combinación con una concentración subterapéutica de ciclofosfamida (CY, 100 mg/kg) y taxotere (TX, 20 mg/kg)		
	Volumen tumoral	Tratado/Control (%)
Control	58,8 ± 60,1	
CY	27,5 ± 15,9	46,8
TX	37,9 ± 41,5	64,5
CY+MCT	23,2 ± 13,1	39,4
TX+MCT	38,8 ± 31,0	66,1
MCT	48,5 ± 35,2	82,5

Ejemplo 23: Actividad antitumoral

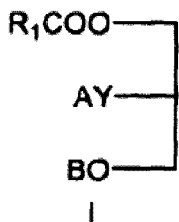
Se evaluaron la eficacia antitumoral y quimioprotección mediante el protocolo descrito en el ejemplo 30, con la excepción de que se usó una concentración terapéutica de fármacos citotóxicos (ciclofosfamida, 200 mg/kg; taxotere, 30 mg/kg). Se realizó este experimento para verificar si MCT no exacerbaba o protegía las células cancerosas en vez de las células inmunitarias. La figura 12 muestra el efecto quimioprotector y la eficacia antitumoral de MCT en combinación con la concentración terapéutica de CY y TX en el modelo de carcinoma de mama DA-3. MCT induce una reducción débil del volumen tumoral en comparación con el control. Cuando se usa MCT en combinación con CY o TX, no se observa exacerbación del volumen tumoral. Cuando se tratan con CY o CY+MCT, se observa una reducción significativa del volumen tumoral. Además, se logra una respuesta significativa en la reducción del volumen tumoral con el tratamiento de MCT en combinación con TX ($p < 0,0327$) en comparación con TX solo, que no es significativa en comparación con los ratones control ($p = 0,1211$) (tabla 13). Estos resultados indican que puede lograrse una actividad terapéutica cuando se combina MCT con una concentración terapéutica no significativa de TX. Este efecto puede deberse a un aumento global en la eficacia de células inmunitarias en animales tratados con MCT.

Tabla 13

Efecto de MCT sobre el volumen tumoral en combinación con una concentración terapéutica de ciclofosfamida (CY, 200 mg/kg) y taxotere (TX, 30 mg/kg)				
Tratamiento	T/C (%)	P/Control	P/CY	P/TX
Control				
MCT		0,4299		
CY	18,8	0,0337		
CY-MCT	22,1	0,0022	0,2928	
TX	64,7	0,1211		
TX-MCT	46,7	0,0327		0,5468

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I



5

en la que:

A y B son iguales o diferentes y son cada uno H o R₁CO,

10

R₁ es alquilo C₇ o C₉,

Y es O o NH;

15 para uso en el trasplante de médula ósea o para uso en el tratamiento de un estado seleccionado de neutropenia, heridas y mielosupresión originada por quimioterapia o radioterapia.

20 2. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es mielosupresión originada por quimioterapia.

3. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es mielosupresión originada por radioterapia.

25 4. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia crónica.

5. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es una neutropenia transitoria.

30 6. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia originada por una enfermedad hematológica.

7. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia inducida por fármacos.

35 8. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia originada por una deficiencia nutricional.

40 9. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia originada por una infección.

10. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es neutropenia originada por radioterapia.

45 11. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estado es una herida.

50 12. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, para el trasplante de médula ósea.

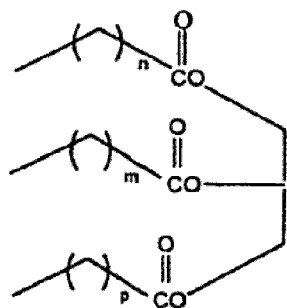
13. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es triglicérido de ácido caprílico.

55 14. Compuesto según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es triglicérido de ácido cáprico.

15. Mezcla de dos compuestos según la reivindicación 1 para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que A = B = R₁CO y R₁ es alquilo C₇ y C₉, respectivamente.

16. Mezcla según la reivindicación 15 para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que R₁ es CH₃(CH₂)₆- y CH₃(CH₂)₈- respectivamente.

5 17. Mezcla de compuestos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende cuatro isómeros geométricos de triglicéridos de ácidos grasos C₈ y C₁₀ descritos en la siguiente fórmula:



	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
n =	6	6	6	8
m =	6	6	8	8
p =	6	8	8	8

10 18. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o mezcla según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el sujeto de la administración está sometiéndose a administración separada o simultánea de un factor estimulante de colonias humano.

15 19. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o mezcla según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el factor estimulante de colonias es G-CSF o GM-CSF.

20 20. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o mezcla según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el sujeto de la administración está sometiéndose a administración simultánea de una citocina humana.

21. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o mezcla según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la citocina es interleucina 2 o

25 interleucina 15.

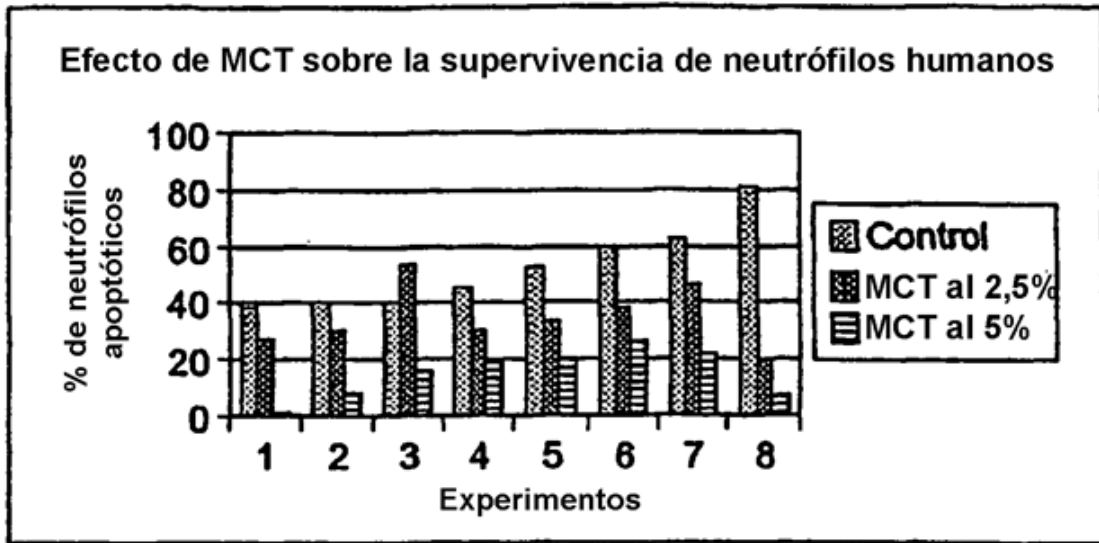


Figura 1

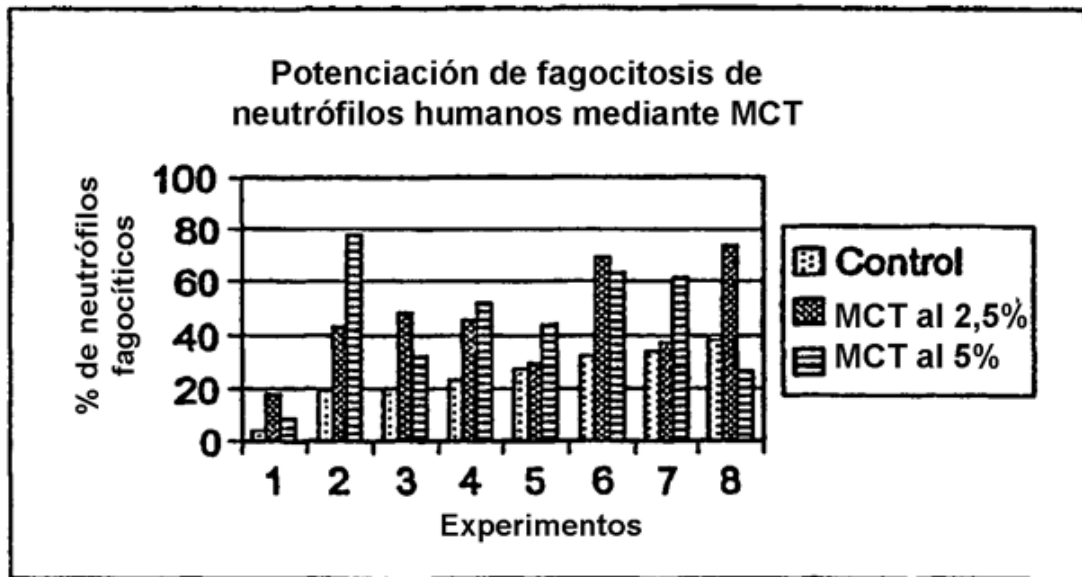


Figura 2

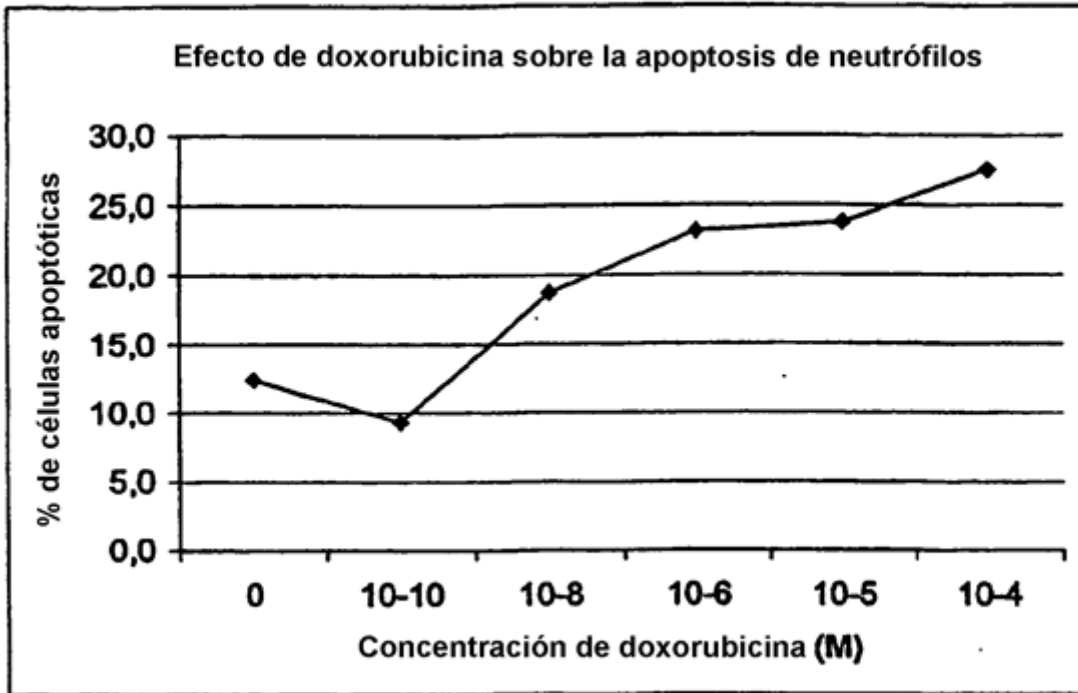


Figura 3A

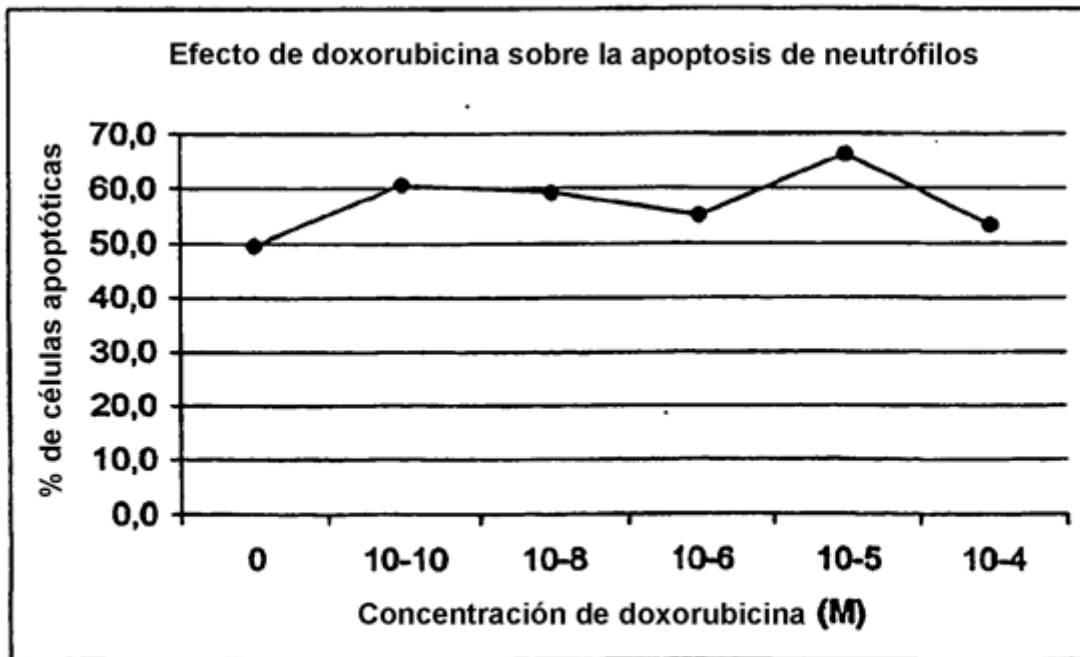


Figura3B

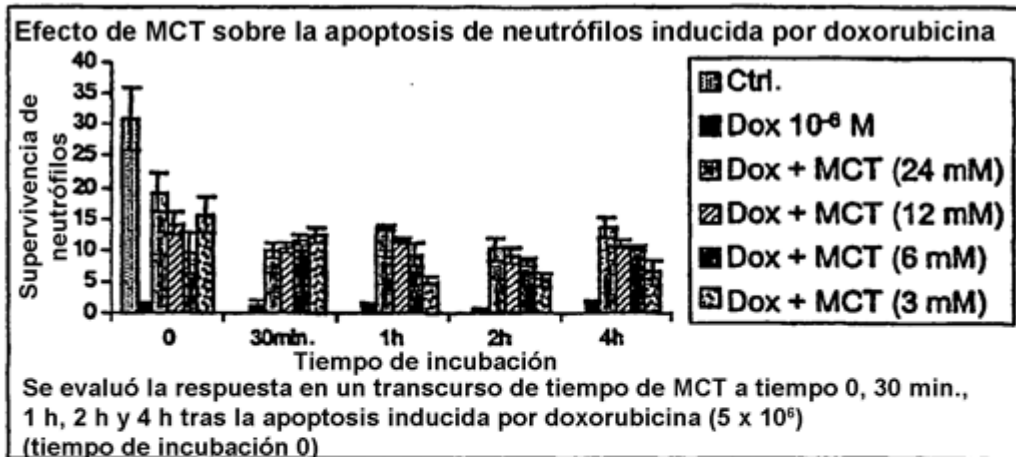


Figura 4A

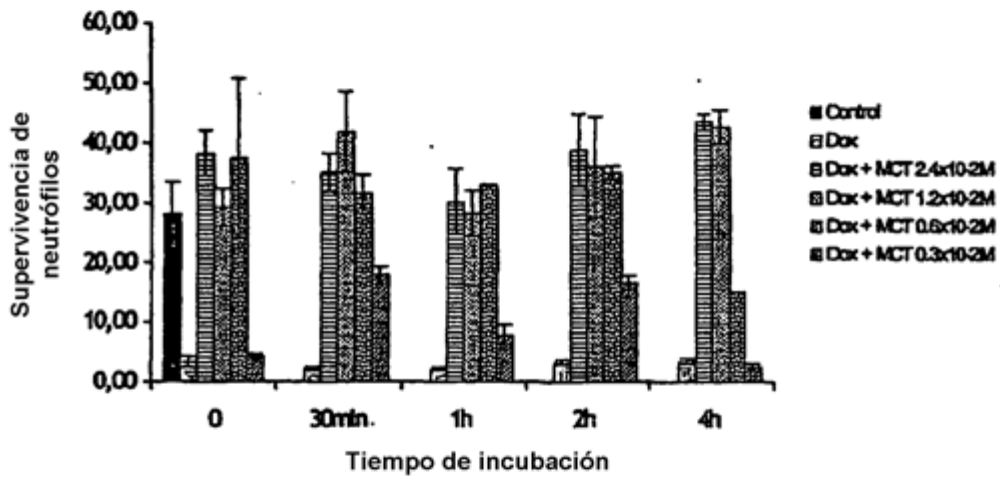


Figura 4B

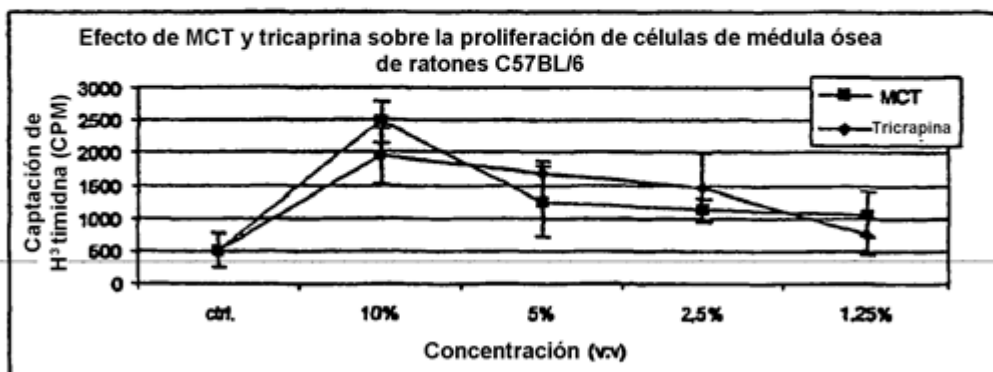


Figura 5

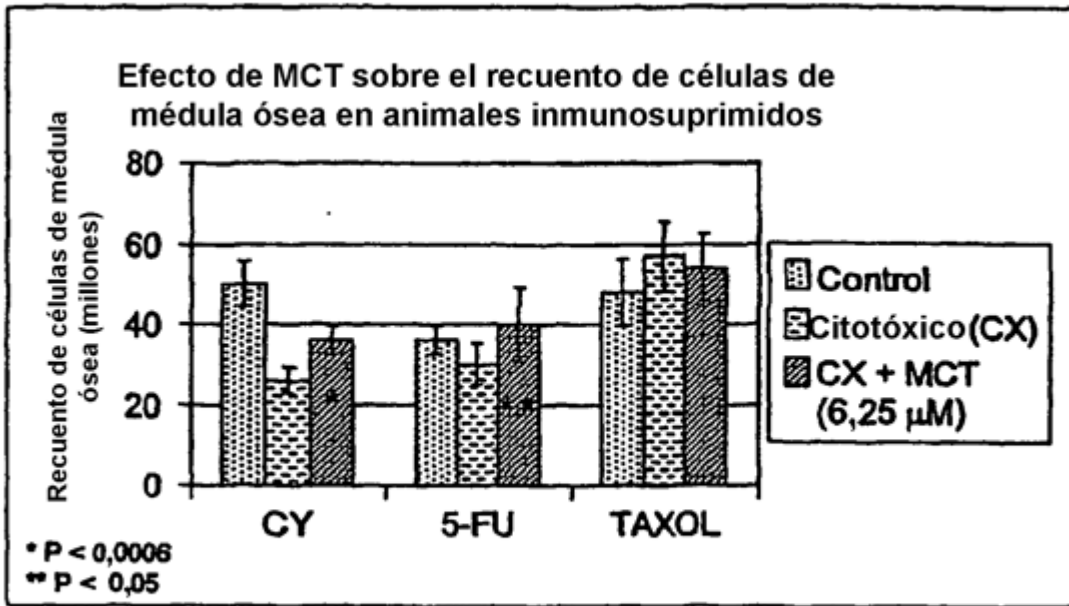


Figura 6

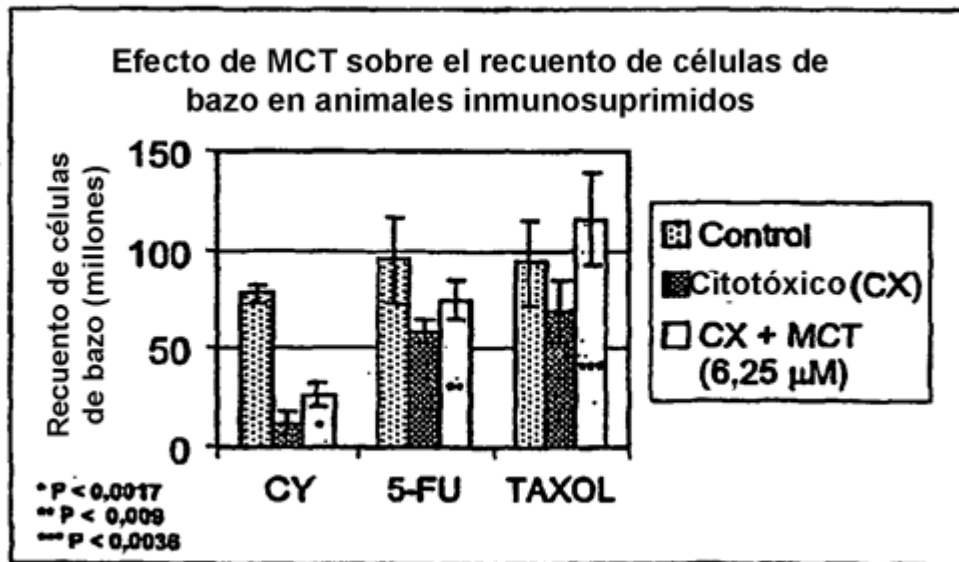


Figura 7

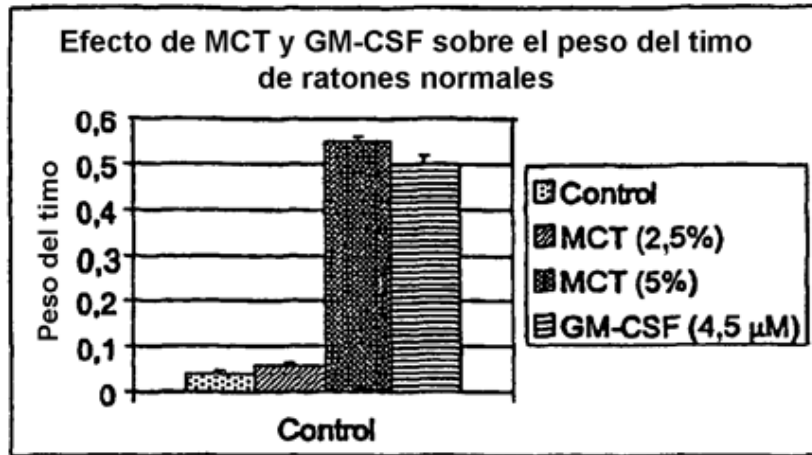


Figura 8

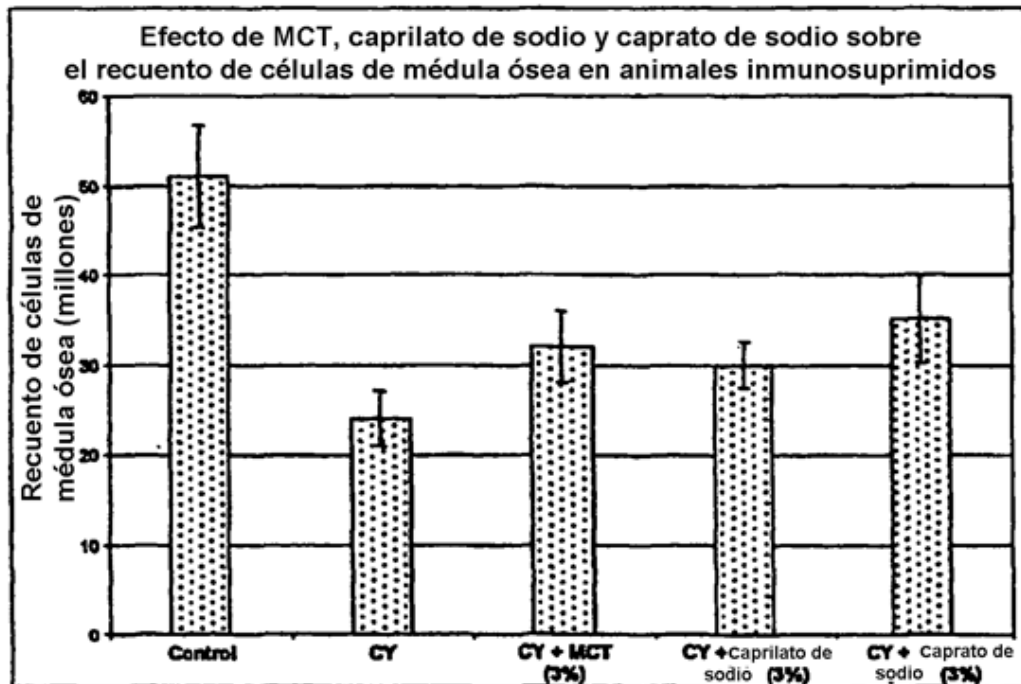


Figura 9

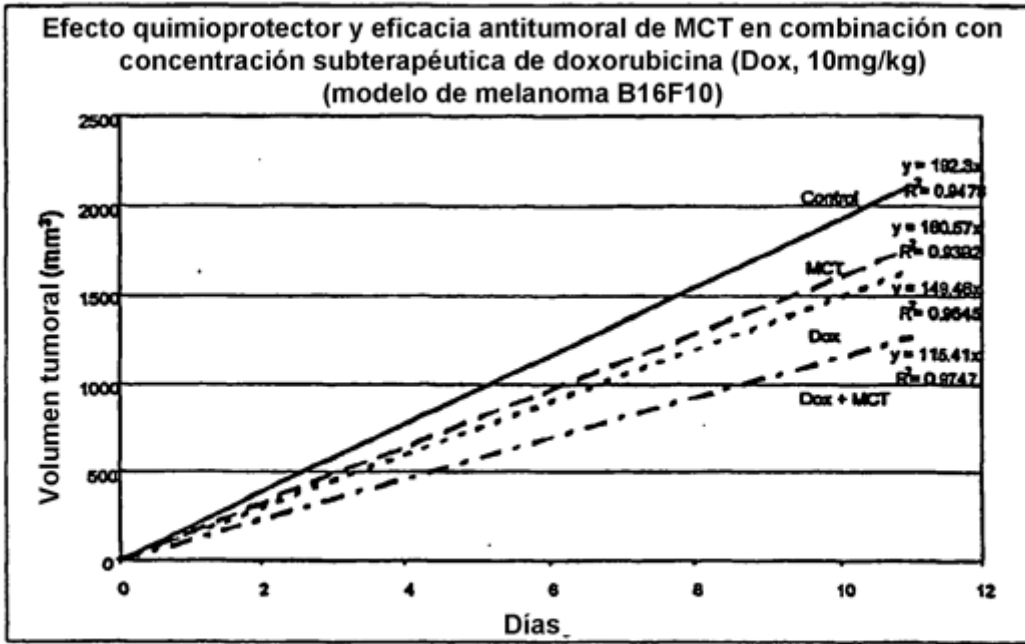


Figura 10

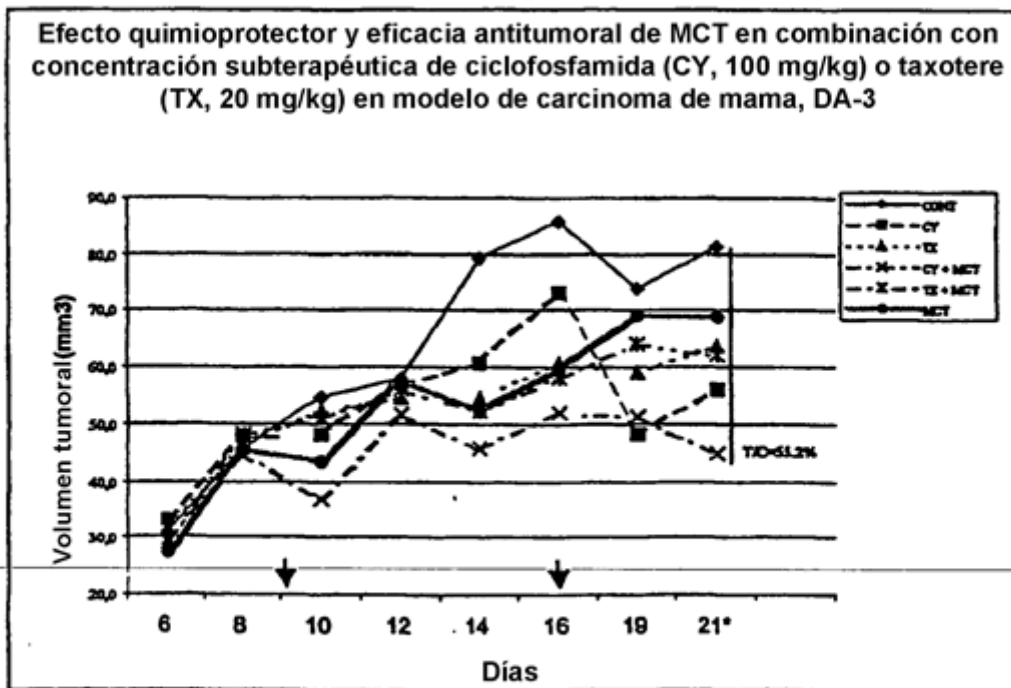


Figura 11

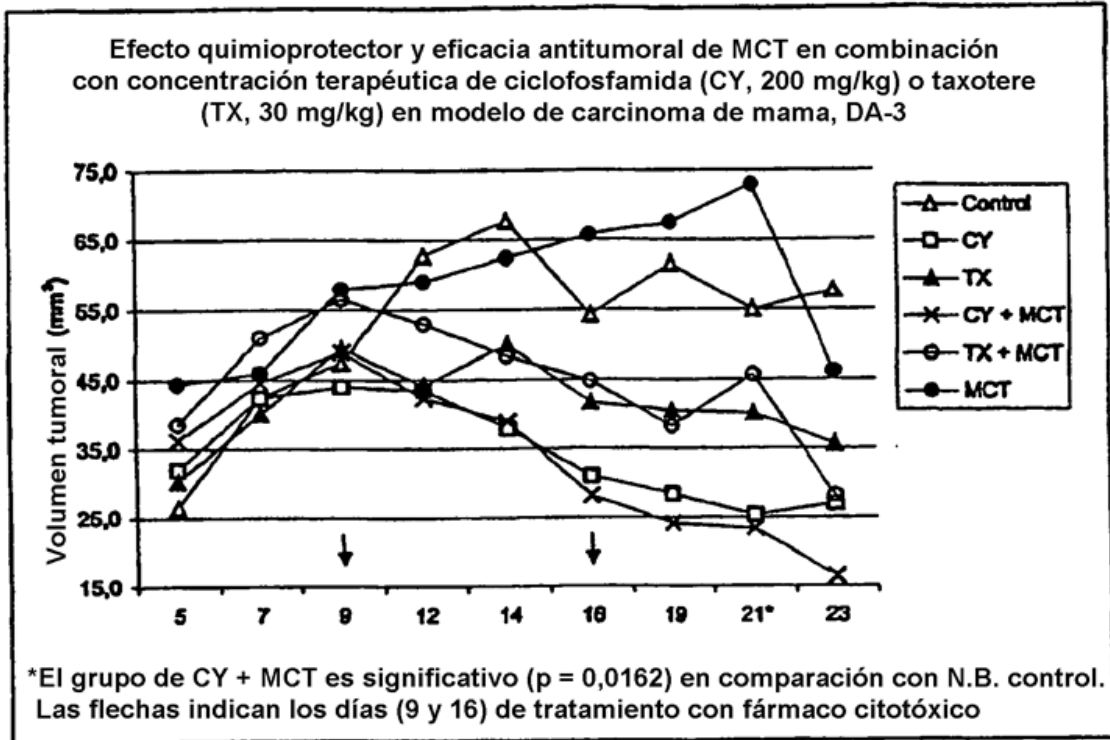


Figura 12