

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 753**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C08G 63/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.1998 E 98911664 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 1017379**

54 Título: **Composiciones terapéuticas que comprenden cuerpos cetónicos y precursores de los mismos**

30 Prioridad:

17.03.1997 US 40858 P

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

05.03.2015

73 Titular/es:

**BTG INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
10 FLEET PLACE
LONDON EC4M 7RD, GB**

72 Inventor/es:

VEECH, RICHARD, L.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 753 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

Composiciones terapéuticas que comprenden cuerpos cetónicos y precursores de los mismos

La presente invención se refiere a composiciones adecuadas para administración a seres humanos y animales que tienen las propiedades de, entre otras, tratar trastornos neurodegenerativos tales como trastornos causados por daño a las células cerebrales, particularmente retardando o previniendo el daño cerebral en zonas del cerebro asociadas a la memoria, tales como el encontrado en enfermedad de Alzheimer y afecciones similares. Estas composiciones pueden tomarse como ayudas nutricionales o para el tratamiento de afecciones médicas, particularmente aquellas asociadas a la pérdida de memoria.

Aparece una elevación anormal del azúcar en sangre no solo en diabetes deficiente en insulina y no insulino dependiente, sino también en una variedad de otras enfermedades. La hiperglucemia de la diabetes es el resultado de la incapacidad de metabolizar y de la sobreproducción de glucosa. Ambos tipos de diabetes se tratan con dieta; la diabetes de tipo I casi siempre requiere insulina adicional, mientras que la diabetes no insulino dependiente, tal como diabetes de inicio senil, puede tratarse con dieta y pérdida de peso, aunque la insulina se usa cada vez más para controlar la hiperglucemia.

Una estimulación simpática aumentada o niveles elevados de glucagón, además de aumentar la glucogenólisis en el hígado, estimulan también la liberación de ácidos grasos libres a partir de adipocitos. Después de infarto de miocardio agudo, o durante insuficiencia cardíaca, una actividad nerviosa simpática aumentada o la administración de simpaticomiméticos acelera la glucogenólisis, reduce la liberación de insulina de células P del páncreas y causa una relativa resistencia a insulina. Aunque la importancia de la dieta, o disponibilidad de sustrato, se da por hecha en el tratamiento de diabetes, los efectos críticos de la elección del sustrato en estados resistentes a insulina no se ha apreciado ni aplicado ampliamente en la práctica clínica. En lugar de ello, el interés actual se ha centrado en la cascada de señalización compleja que sigue a la unión de insulina a su receptor. Esta cascada cada vez más compleja de mensajes que implican proteína tirosina cinasas y fosfatasa, inositol y otros fosfolípidos, aunque mantiene la promesa de una comprensión integral de la diabetes no insulino dependiente, tiene que proporcionar todavía nuevas terapias significativas para diabetes o resistencia a insulina.

Dejando de lado los efectos a más largo plazo de la insulina sobre el crecimiento, se cree que los efectos metabólicos agudos de la insulina se explican por la acción en tres etapas enzimáticas importantes en la conversión de glucosa en CO₂. En primer lugar, la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa Glut4 desde el retículo endoplásmico a las membranas plasmáticas, aumentando por tanto el transporte de glucosa de la fase extracelular a la intracelular (véanse las ref. 1 y 2). En segundo lugar, la insulina aumenta la acumulación de glucógeno. Esto se ha atribuido a la desfosforilación de la glucógeno sintasa (3) por la proteína fosfatasa 1. En tercer lugar, la insulina estimula la actividad del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa mitocondrial (4 y 5) mediante desfosforilación por una proteína fosfatasa intramitocondrial sensible a Ca²⁺ (6).

Es un efecto importante, pero mal entendido, de la insulina su uso en enfermedad cardíaca donde, en combinación con glucosa, cloruro de potasio y GIK, mejoraba las anomalías electrocardiográficas que acompañan al infarto de miocardio (7 y 8), y mejoraban el rendimiento cardíaco después de aturdimiento de bombeo (9). Este tratamiento se ha propuesto últimamente para una serie de otras enfermedades cardíacas graves (10 y 11). Los efectos beneficiosos de la infusión de GIK se han atribuido a su capacidad de reducir la liberación de ácidos grasos libres y mejorar la estabilidad de membrana (12). Sin embargo, otros trabajos más recientes sugieren razones más fundamentales. En células cardíacas que están anóxicas, la glucosa es el único combustible capaz de proporcionar el ATP necesario para mantener la viabilidad (13).

La administración de glucosa más insulina aumentaría la disponibilidad de la glucosa intracelular, proporcionando una fuente de producción de ATP en ausencia de O₂. Aunque esto explicaría ciertos efectos beneficiosos, no daría cuenta de la corrección de las anomalías del ECG, ni del índice cardíaco mejorado en corazones tratados con GIK debido a que la actividad eléctrica y el trabajo cardíaco requieren células cardíacas de respiración activa, no aquellas que están totalmente anóxicas y por lo tanto sin actividad eléctrica ni la capacidad de efectuar trabajo mecánico.

Comprender los sitios enzimáticos de la acción de la insulina no define, por sí mismo, los efectos de la deficiencia de insulina sobre el metabolismo celular o la función fisiológica. Puede entenderse mejor cómo actúa la insulina a este nivel más amplio observando el modo en que la naturaleza se encarga de la deficiencia de insulina. La compensación natural por insulina reducida durante el ayuno es la conversión hepática acelerada de los ácidos grasos libres en cuerpos cetónicos, elevando el D-β-hidroxiacetato y acetoacetato en sangre a aproximadamente 6 mM. A estos niveles, las cetonas, en lugar de la glucosa, se vuelven el sustrato para la mayoría de órganos, incluyendo incluso el cerebro (14). Aunque una cetosis leve es la respuesta normal a insulina reducida, los facultativos temen a los cuerpos cetónicos porque su sobreproducción masiva puede ser potencialmente mortal en cetoacidosis diabética.

El presente inventor ha comparado anteriormente el efecto de niveles fisiológicos de cuerpos cetónicos con los efectos metabólicos y fisiológicos de la insulina, comparando particularmente el corazón de rata en funcionamiento

deficiente de insulina perfundido con glucosa sola con corazones a los que se ha añadido D-β-hidroxitubirato 4 mM/acetacetato 1 mM, dosis saturantes de insulina o la combinación, y ha mostrado cómo la provisión de sustratos sencillos puede imitar los efectos de la insulina en el cambio de las concentraciones de los intermedios tanto de glucólisis como del ciclo de TCA, y controlar así el flujo de glucosa en este tejido muy especializado. Además, ha determinado que es un efecto primario, pero anteriormente no reconocido, de la insulina o una relación de cetonas alterar los estados redox mitocondriales de tal modo que aumente la $\Delta G_{\text{hidrólisis de ATP}}$ y con ello, los gradientes de iones inorgánicos entre las diversas fases celulares y el rendimiento fisiológico del corazón.

La presente solicitud se enfrenta al problema de las enfermedades neurodegenerativas, particularmente enfermedades en que las neuronas se someten a los efectos neurotóxicos de agentes patogénicos tales como placas de proteína, y proporciona adicionalmente composiciones para uso en el tratamiento de estos trastornos y los anteriormente citados.

La enfermedad de Alzheimer es un grupo genéticamente heterogéneo de enfermedades neurológicas progresivas mortales caracterizadas patológicamente por la acumulación de placas amiloides en el cerebro y clínicamente por la afectación de la memoria reciente, que conduce a demencia y muerte. Además de los casos de enfermedad de Alzheimer ligada a causas genéticas, aparecen también casos esporádicos, sin un historial familiar evidente de la enfermedad. Por ejemplo, aparecen cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer después de traumatismo craneal (73) o después de enfermedades inflamatorias que estimulen la producción de la citocina interleucina 1 (97).

El síntoma temprano de la enfermedad es la pérdida de memoria reciente asociado a la afectación y muerte de células del hipocampo, que da cuenta de la afectación temprana de la memoria reciente. La medida de los volúmenes hipocámpicos usando imagenología por resonancia magnética (IRM) muestra que aparece atrofia del hipocampo antes del inicio clínico de la pérdida de memoria y progresa con una pérdida de volumen de aproximadamente un 8 % al año durante los 2 años desde que los síntomas aparecieron por primera vez (70).

El diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se realiza clínicamente por esta afectación de la memoria reciente, asociado a lesiones en la porción hipocámpica del lóbulo temporal. Neuropatológicamente, el diagnóstico depende del hallazgo de ovillos neurofibrilares en las células, placas amiloides o seniles en el espacio extracelular y la pérdida de neuronas (61). Los ovillos neurofibrilares están compuestos por proteína τ hiperfosforilada emparejada cuya función real en la célula, cuando no está fosforilada, es unirse a y estabilizar tubulina en su formación de microtúbulos en la célula. La hiperfosforilación de la proteína τ se cataliza por la glucógeno sintasa cinasa 3β , entre otras cinasas, y se desfosforila por la proteína fosfatasa 2A-1, 2B o 1 (108).

Sin embargo, no existe necesariamente una división clara y diáfana entre los cambios cerebrales patológicos y los déficit de memoria que aparecen prematuramente en la enfermedad de Alzheimer y los cambios patológicos en la anatomía cerebral y la función de memoria que se encuentran en la población de envejecida "normal". En lugar de ello, la diferencia es cuantitativa y dependiente del índice (94). Dichos cambios en la función de memoria en los ancianos normales están también acompañados por una tolerancia a glucosa reducida, lo que significa la incapacidad de metabolizar glucosa. En dichas situaciones, se esperaría que los tratamientos orientados a rectificar los procesos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer fueran aplicables a la corrección de los efectos metabólicos asociados al envejecimiento normal.

Aunque la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar o esporádico es la demencia principal encontrada en la población anciana, se encuentran también otros tipos de demencia. Estos incluyen, pero sin limitación, degeneración frontotemporal asociada a la enfermedad de Pick, demencia vascular, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, demencia por parkinsonismo con atrofia frontal, parálisis supranuclear progresiva y degeneración corticobasal y enfermedad de Alzheimer asociada al síndrome de Down. Se observa también formación de placa en encefalopatías espongiiformes tales como ECJ, tembladera y EEB. La presente invención está dirigida al tratamiento de dichas enfermedades neurodegenerativas, particularmente aquellas que implican placas de proteína neurotóxica, por ejemplo placas amiloides.

Muchas de estas afecciones aparentemente no relacionadas anteriormente citadas tienen las proteínas τ hiperfosforiladas encontradas en la enfermedad de Alzheimer (69), abriendo la posibilidad a que la misma cinasa que fosforilaba la proteína τ fosforilara también el complejo de PDH, produciendo una deficiencia similar en la producción de energía mitocondrial y la síntesis de acetilcolina a la encontrada en la enfermedad de Alzheimer, pero implicando otras regiones cerebrales. El presente inventor ha determinado que, a este respecto, los tratamientos aplicables a la enfermedad de Alzheimer podrían aplicarse a estas enfermedades también. Además, el inventor ha determinado que dicho tratamiento será también aplicable a enfermedades deteriorantes de neuronas periféricas, tales como miastenia grave y distrofia muscular.

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer. Los esfuerzos de investigación están centrados en definir su causa genética, pero hasta la fecha no ha habido una terapia génica exitosa. Los estudios genéticos han ligado la enfermedad de Alzheimer al síndrome de Down y su forma de inicio temprano al locus del cromosoma 21 que causa la acumulación de proteína precursora de amiloide (APP) (73), una glucoproteína transmembrana que existe en 8 isoformas. Se derivan numerosos fragmentos de esta proteína por proteólisis, y se

ha mostrado que las placas características de la enfermedad de Alzheimer contienen una acumulación del oligómero de proteína β -amiloide ($A\beta_{1-42}$). También se ha relacionado una forma autosómicamente dominante de inicio temprano de la enfermedad de Alzheimer con el locus de presenilina 1 en el cromosoma 14.

5 Una forma de inicio tardío de la enfermedad de Alzheimer está asociada al alelo de tipo 4 de apolipoproteína E (69, 98) en el cromosoma 19, aunque otros investigadores sugieren que esta aparente correlación puede estar relacionada en cambio con un locus de $\alpha 1$ -antiquimotripsina (100). Todos los ratones transgénicos que expresan cantidades aumentadas de proteínas precursora de amiloide de más de 18 meses de edad mostraron degeneración hipocámpica con muchas de las características fisiológicas de la enfermedad de Alzheimer (90).

10 El estado actual del conocimiento sobre los genes defectivos y productos génicos en la enfermedad de Alzheimer se ha resumido recientemente (Tabla 1 de la ref. 96).

Cromosoma	Defecto génico	Edad de inicio	Fenotipo $A\beta$
21	Mutaciones de β APP	50	Producción de péptidos $A\beta$ totales de $A\beta_{1-42}$
19	Polimorfismo de apoE4	60 o más	Densidad de placas $A\beta$ y depósitos vasculares
14	Mutaciones de presenilina 1	40 y 50	Producción de $A\beta_{1-42}$
1	Mutaciones de presenilina 2	50	Producción de $A\beta_{1-42}$

15 Resulta evidente a partir de la tabla anterior que el fenotipo común asociado a las formas genéticas de la enfermedad de Alzheimer es la acumulación del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ (96). Es este $A\beta_{1-42}$ que inactiva PDH, afectando así a la energía mitocondrial y la producción de citrato en tejido normalmente obligado al consumo de glucosa (95) y al mismo tiempo afectando a la síntesis del neurotransmisor crítico acetilcolina (67, 68). La aplicación de $A\beta_{1-42}$ a células neuronales está asociada a la regulación negativa de la proteína antiapoptótica bcl-1 y aumenta los niveles de bax, una proteína conocida por estar asociada a la muerte celular (92). Además de las placas amiloides compuestas por $A\beta_{1-42}$, los ovillos neurofibrilares compuestos por proteína τ hiperfosforilada y los niveles reducidos de acetilcolina cerebral, la muerte celular es la cuarta característica patológica de la enfermedad de Alzheimer. Estas características patológicas pueden estar relacionadas, al menos en parte, con el exceso de $A\beta_{1-42}$ y su inhibición de PDH.

20 Puede aparecer una mejora clínica modesta de los síntomas mediante tratamiento con inhibidores de acetilcolina esterasa (57), presuntamente al aumentar los efectos colinérgicos originados en los núcleos septales y que atraviesan la banda diagonal de Broca hasta el hipocampo en la porción anterior del sistema límbico del cerebro. Sin embargo, el progreso de la biología molecular de la enfermedad de Alzheimer ha causado que se concentre la búsqueda de nuevas terapias en cuatro áreas principales (96): (i) inhibidores de proteasa que disminuyen parcialmente la actividad de las enzimas (β y γ secretasa) que escinden $A\beta$ (fragmentos de β -amiloide) de β APP (proteínas precursoras de β -amiloide); (ii) compuestos que se unen a $A\beta$ extracelular para prevenir sus efectos citotóxicos; (iii) fármacos antiinflamatorios específicos del cerebro que bloquean la activación microglial (macrófagos cerebrales), la liberación de citocina y la respuesta en fase aguda que aparece en regiones cerebrales afectadas y (iv) compuestos tales como antioxidantes, bloqueantes de canal de calcio neuronal o agentes antiapoptóticos, que interfieren con los mecanismos de neurotoxicidad desencadenada por $A\beta$.

25 La terapia que propone ahora el presente inventor difiere de los cuatro enfoques enumerados anteriormente en que sortea el bloqueo de la producción de energía metabólica resultante de la inhibición de PDH por $A\beta_{1-42}$ mediante la administración de cuerpos cetónicos o sus precursores. Las células neuronales son capaces de metabolizar dichos compuestos incluso en presencia de una deficiencia de glucosa, el sustrato de energía normal para el cerebro (63). Debido a que las cetonas pueden aumentar la ΔG de la hidrólisis de ATP, aumentarán los gradientes tanto de Na^+ como de Ca^{2+} intracelular, previniendo la muerte celular asociada a Ca^{2+} intracelular aumentado. Además, el aumento de la generación de citrato por el ciclo de Krebs proporcionará, cuando se transloca al citoplasma, una fuente de acetyl-CoA citoplasmática necesaria para remediar la deficiencia de acetilcolina característica de los cerebros con Alzheimer.

30 La elevación de las cetonas en sangre necesarias para corregir estos defectos metabólicos puede lograrse mediante medios parenterales, entéricos o dietéticos y no requiere la administración de agentes farmacológicos potencialmente tóxicos.

35 Ha habido una larga experiencia con las dietas cetogénicas en niños tratados por epilepsia. Sin embargo, dichas dietas son inadecuadas para uso en adultos debido a los efectos adversos sobre el sistema circulatorio. La presente solicitud de la invención de cuerpos cetónicos debería proporcionar todos los efectos terapéuticos de dicha dieta, que de por sí no se ha encontrado que sea tóxica en niños, sin ninguno de los efectos secundarios que la vuelven inutilizable en adultos. Además, el inventor ha determinado que, con la corrección de los defectos metabólicos anteriormente citados, se reducirán las respuestas de citocina y el aumento de péptidos apoptóticos en las células degenerativas debido al aumento del estado de energía neuronal y a la estimulación trófica aumentada resultante de una síntesis de acetilcolina aumentada.

Desde la fecha de prioridad de esta solicitud, se ha publicado el documento EP 0780123 A1, que se refiere al uso de acetoacetato, β -hidroxibutirato, ésteres de alcohol monohidroxílico, dihidroxílico o trihidroxílico de estos u oligómeros de β -hidroxibutirato para suprimir el edema cerebral, proteger la función cerebral, rectificar el metabolismo de energía cerebral y reducir la extensión del infarto cerebral. Sin embargo, debería entenderse que desde 1979 se sabía que el hidroxibutirato de sodio aumenta la circulación cerebral y los reflejos vasomotores regionales en hasta un 40 % (Biull. Eksp. Biol. Med. Vol 88 11, pp555-557). El tratamiento que el presente inventor proporciona ahora va más allá de dichos efectos sobre la circulación, ya que proporciona tratamiento para células que son incapaces de funcionar debido a neurodegeneración, p.ej. causada por agentes neurotóxicos tales como péptidos y proteínas, y anomalías genéticas. El tratamiento implica la acción de cuerpos cetónicos sobre las células mismas y no sobre el flujo de sangre a ellas.

Al reducir esta invención a la práctica, el inventor ha determinado adicionalmente que los cuerpos cetónicos, proporcionados por administración directa o por administración de sus precursores metabólicos en cantidades suficientes para elevar la concentración total de cuerpos cetónicos en sangre a niveles elevados, dan como resultado más que el simple mantenimiento de la viabilidad celular, sino que realmente mejoran la función y crecimiento celulares más allá de los niveles normales, concretamente de control, de una manera no relacionada con el flujo sanguíneo ni la nutrición. A este respecto, la invención proporciona adicionalmente el uso de cuerpos cetónicos como factores de estimulación nerviosa, concretamente factores de crecimiento nervioso y factores capaces de estimular una función neuronal potenciada, tal como aumento de la tasa metabólica y aumento de la extensión de rasgos funcionales tales como axones y dendritas. Este aspecto de la presente invención ofrece un mecanismo para la mejora de la función neuronal así como para el mero retardo de la degradación.

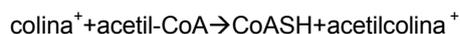
El reciente trabajo de Hoshi y colaboradores (77, 78) sugiere en gran medida que una parte de la proteína amiloide cuya acumulación es el sello de la enfermedad de Alzheimer, $A\beta_{1-42}$, actúa como una histidina proteína cinasa mitocondrial que fosforila e inactiva el complejo multienzimático de piruvato deshidrogenasa. El complejo de PDH es una enzima mitocondrial responsable de la generación de acetil-CoA y NADH a partir del piruvato producido por glucólisis en el citoplasma. La acetil-CoA mitocondrial formada se condensa con oxalacetato iniciando el ciclo de TCA de Krebs que consume completamente el piruvato hasta CO_2 , proporcionando a la mitocondria la potencia reductora que se convierte en el sustrato para el sistema de transporte electrónico a través del cual se genera la energía necesaria para la síntesis de ATP mitocondrial. La PDH se sitúa por tanto en el cruce de dos rutas productoras de energía importantes de la célula, glucólisis y el ciclo de Krebs, y tiene claramente una función crítica en células vivas.

Existen dos consecuencias importantes de la inhibición de PDH. En primer lugar, en tejidos neuronales, que en condiciones metabólicas normales son totalmente dependientes de la glucosa para la producción de energía, la inhibición de PDH da como resultado una eficacia reducida de la producción de energía, una energía de hidrólisis de ATP reducida, una disminución tanto de acetil-CoA como de los metabolitos del primer tercio del ciclo de TCA y una deficiencia de NADH mitocondrial (95). Una disminución en la energía de la hidrólisis de ATP conduce a un aumento de Na^+ y Ca^{2+} intracelular, una pérdida de K^+ celular y por último la muerte celular (86). Las células del hipocampo, críticas para la fijación de los recuerdos recientes, son particularmente sensibles a una serie de formas de lesión, y la muerte de estas células es el sello tanto clínico como patológico de la enfermedad de Alzheimer.

Una segunda consecuencia importante de la inhibición de PDH es una deficiencia de citrato mitocondrial (95). El citrato, o uno de sus metabolitos, se exporta al citoplasma desde las mitocondrias, donde se convierte en acetil-CoA citosólica por la ATP citrato liasa (EC 4.1.3.8) en la reacción:



La acetil-CoA se combina entonces con colina mediante la acción de la colina acetiltransferasa (EC 2.3.1.6), formando acetilcolina en la reacción:



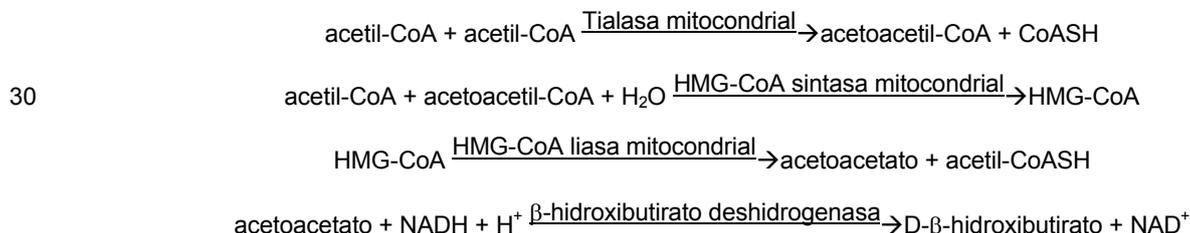
El cultivo neuronal de células septales expuestas a $A\beta_{1-42}$ 1 μM durante 24 horas mostró una disminución de la producción de acetilcolina de más de cinco veces (78) sin disminución de la actividad de colina acetiltransferasa. La causa deducida de esta producción disminuida era una deficiencia de acetil-CoA debido a la inhibición del complejo de PDH causada por la activación de la proteína cinasa TPKI/GSK-3 β y posterior fosforilación de PDH (77).

Como se explica anteriormente, los corazones en funcionamiento aislados perfundidos con glucosa 10 mM sola sin insulina son ineficaces y tienen una producción de energía mitocondrial afectada. Este defecto de la producción de energía celular puede invertirse completamente mediante la provisión de una relación fisiológica de cuerpos cetónicos consistente en D- β -hidroxibutirato 4 mM y acetoacetato 1 mM (95). Se pensaba que el cerebro era capaz de usar solo glucosa como su fuente de energía metabólica y que era insensible a las acciones de la insulina. Sin embargo, en un notable estudio clínico efectuado en 1967, George Cahill y sus colaboradores (47) mostraron que hasta un 60 % de las necesidades de energía metabólica del cerebro podían satisfacerse por cuerpos cetónicos en pacientes obesos que experimentan un ayuno prolongado. Aún más notablemente, Cahill mostró que la administración de insulina a estos pacientes en dosis suficientes para hacer caer su azúcar en sangre de 4 a menos

de 2 mM no estaba asociada a ninguna disminución de las funciones mentales en estos pacientes cuyo D-β-hidroxiacetato era 5,5 mM y acetoacetato 2 mM en sangre (véase la FIG. 3 de la ref. 63). Claramente, cuando están presentes cuerpos cetónicos en la sangre a niveles superiores a 5 mM, son capaces de sustituir la necesidad habitual de glucosa del cerebro y anular los síntomas hipoglucémicos esperados a niveles de glucosa de 1,5 mM.

- 5 La utilización de cuerpos cetónicos en el cerebro está limitada por el transporte, apareciendo menor utilización en los ganglios basales a niveles sanguíneos menores de 1 mM (76). Sin embargo, a niveles de 7,5 mM conseguidos en personas normales por ayuno prolongado, la tasa de entrada de cuerpos cetónicos en el cerebro es suficiente para encargarse de la mayoría de las necesidades de energía cerebral y prevenir los síntomas de hipoglucemia, incluso frente a niveles de azúcar en sangre que normalmente causarían convulsiones o coma (63).
- 10 Es la hipótesis de los inventores que, en la enfermedad de Alzheimer, cuando hay un bloqueo de PDH que evita la producción de energía normal a partir de glucosa, si pueden proporcionarse niveles elevados, por ejemplo de ayuno normal, de cetonas, puede sortearse el bloqueo de PDH en estos pacientes, previniendo así la muerte celular debido a agotamiento de la energía o falta de estimulación colinérgica y por tanto retardando la progresión de la pérdida de memoria y demencia.
- 15 Además, utilizando los efectos de crecimiento/estimulación nerviosos de los cuerpos cetónicos, particularmente el D-β-hidroxiacetato o una relación fisiológica de este con acetoacetato, puede hacerse que células que son aún viables mejoren más allá del estado al que han degenerado y por consiguiente se observe cierta mejora de la función en los pacientes.

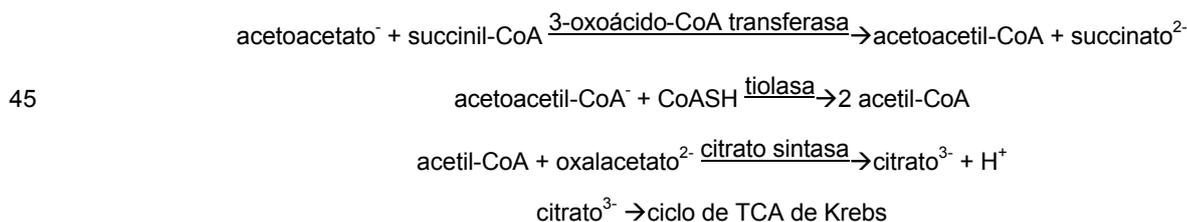
20 En animales y personas alimentados, el contenido de acetoacetato en hígado, que es esencialmente el de la sangre, es muy bajo, de 0,09 mM y el de D-β-hidroxiacetato es de 0,123 mM, pero se eleva después de un ayuno de 48 horas a acetoacetato 0,65 mM y D-β-hidroxiacetato 1,8 mM (84). Los cuerpos cetónicos se elevan con la inanición debido a que la caída de insulina disminuye la reesterificación de los ácidos grasos a triglicéridos en tejido adiposo, causando la liberación de los ácidos grasos libres a la corriente sanguínea. Los ácidos grasos libres pueden captarse entonces y usarse como fuente de energía por músculo, corazón, riñón e hígado en el proceso de β-oxidación. Sin embargo, el hígado tiene la capacidad de convertir los ácidos grasos libres en un combustible metabólico, las cetonas, para uso por órganos extrahepáticos, incluyendo el cerebro, como alternativa a la glucosa durante periodos de ayuno. La síntesis hepática de cuerpos cetónicos aparece a partir de acetil-CoA mitocondrial generada durante la β-oxidación de ácidos grasos por el hígado en el siguiente conjunto de reacciones:



Una vez preparados en el hígado, se transportan los cuerpos cetónicos fuera del hígado a la corriente sanguínea mediante un cotransportador de monocarboxilato H⁻ (20) mediante la siguiente reacción:



40 Los cuerpos cetónicos entran en los tejidos extrahepáticos en el mismo portador, donde otros monocarboxilatos pueden actuar como inhibidores competitivos. Los isómeros no fisiológicos, tales como D-lactato o L-β-hidroxiacetato, pueden actuar también como inhibidores competitivos para el transporte de cuerpos cetónicos. Puesto que el transporte de cuerpos cetónicos a través de la barrera hematoencefálica es el factor limitante para la utilización de cuerpos cetónicos en el cerebro (76), deberían hacerse esfuerzos para mantener la concentración en sangre de esos enantiómeros no fisiológicos a niveles bajos durante la terapia cetogénica. Cuando las concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre se elevan a los niveles encontrados en la inanición, corazón, músculo, riñón y cerebro utilizan cuerpos cetónicos como sustrato de energía preferido:

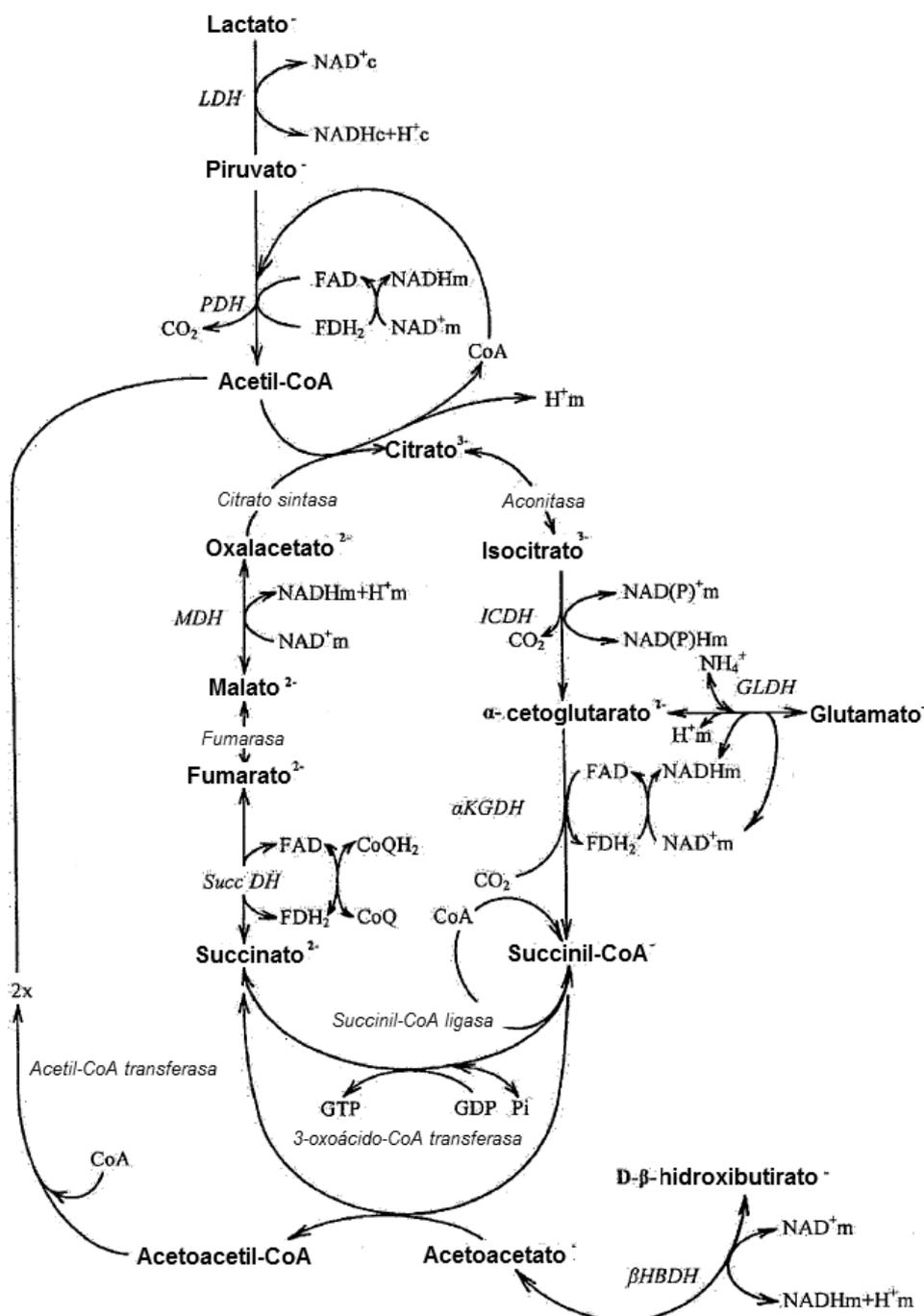


El presente inventor ha determinado por tanto que la acetil-CoA mitocondrial de los cuerpos cetónicos puede reemplazar por tanto a la deficiencia de acetil-CoA que aparece durante la inhibición del complejo multienzimático de

PDH en tejidos dependientes del metabolismo de la glucosa para su suministro de energía metabólica. El citrato mitocondrial suministrado puede transportarse también al citoplasma por el transportador de ácido tri- o dicarboxílico, donde puede convertirse en acetil-CoA citoplasmática necesaria para la síntesis de acetilcolina. Las reacciones del ciclo de Krebs se muestran en el Esquema 1 para ayudar a ilustrar estos conceptos adicionalmente.

- 5 El hígado no puede utilizar cuerpos cetónicos porque carece de la 3-oxoácido-CoA transferasa necesaria para la formación de acetoacetyl-CoA. Los cuerpos cetónicos, en contraposición con los ácidos grasos libres, no pueden producir acetil-CoA en el hígado. Puesto que la acetil-CoA es el precursor esencial de la síntesis de ácidos grasos a través de malonil-CoA y de la síntesis de colesterol a través de HMG-CoA citosólica, los cuerpos cetónicos no pueden dar como resultado una síntesis aumentada de ácido graso o colesterol en el hígado, que habitualmente da cuenta de más de la mitad de la síntesis de cuerpos de estos dos materiales potencialmente patogénicos. El hígado es sensible a la relación de acetoacetato/D-β-hidroxiacetato presentada al mismo y alterará su $[NAD^+]/[NADH]$ libre mitocondrial debido al cuasiequilibrio establecido por la β-hidroxiacetato deshidrogenasa (EC 1.1.1.30) (55)

ESQUEMA 1



El modo más sencillo de aumentar las cetonas en sangre es la inanición. Con el ayuno prolongado, las cetonas en sangre alcanzan niveles de 7,5 mM (62, 63). Sin embargo, esta opción no está disponible a largo plazo, puesto que la muerte aparece rutinariamente después de 60 días de ayuno.

- 5 La dieta cetogénica, compuesta principalmente por lípidos, se ha usado desde 1921 para el tratamiento de epilepsia en niños, particularmente convulsiones mioclónicas y acinéticas (109) y se ha probado eficaz en casos resistentes a los medios farmacológicos habituales (71). La administración oral o parenteral de ácidos grasos libres o triglicéridos puede aumentar las cetonas en sangre, a condición de que carbohidratos e insulina sean bajos para prevenir la reesterificación en el tejido adiposo. Las ratas alimentadas con dietas que comprenden un 70% de aceite de maíz, un 20 % de hidrolizado de caseína, un 5 % de celulosa y un 5 % de mezcla de sales de McCollums desarrollan cuerpos cetónicos aproximadamente 2 mM. La sustitución de aceite de maíz por manteca eleva los cuerpos cetónicos a casi 5 mM (Veech, no publicado).

- 15 Un ejemplo de una dieta cetogénica tradicional de 1500 calorías al día recomendada por Marriott Corp. Health Care Services, "Pediatric Diet Manual", revisado en agosto de 1987, como adecuada para niños epilépticos de 4-6 años de edad contenía de 3:1 a 4:1 de g de grasa por cada g de carbohidratos y proteínas combinadas. En cada de una de las 3 comidas, el paciente debe comer de 48 a 50 g de grasa, solo 6 g de proteína y de 10 a 6,5 g de carbohidrato. En la práctica, esto significa que en cada comida el niño debe comer 32 g de margarina al día (aproximadamente un cuarto de barra) y beber 92 g de crema espesa (aproximadamente 100 ml) que comprende principalmente triglicéridos de cadena media.

- 20 Se da en la Tabla 1 siguiente un ejemplo de una dieta que consigue una relación 3:1 de grasa a carbohidrato y proteína combinados.

Tabla 1. Dieta de muestra de 1.500 calorías para conseguir una dieta de lípido a carbohidrato+proteína 3:1

	Cantidad (g)	Grasa (g)	Proteína (g)	CHO (g)
Desayuno				
Huevo	32	4	4	
Zumo de manzana	70			7
Margarina	11	10		
Crema espesa	92	34	2	3
Desayuno total		48	6	10
Almuerzo				
Carne magra	12	1,75	3,5	
Zanahorias cocidas	45		0,6	3
Peras en lata	40			4
Margarina	14	12,5		
Crema espesa	92	34	2	3
Almuerzo total		48,25	6,1	10
Cena				
Salchicha	22,5	6	3	
Brócoli cocido	50		1	2
Sandía	75			5
Margarina	8	7,5		

	Cantidad (g)	Grasa (g)	Proteína (g)	CHO (g)
Crema espesa	92	34	2	3
Cena total		47,5	6	10
Total diario		143,75	18,1	30

En general, los niveles de cuerpos cetónicos conseguidos con dichas dietas son de aproximadamente D- β -hidroxibutirato 2 mM y acetoacetato 1 mM, mientras que los niveles de ácidos grasos son de aproximadamente 1 mM. Se han intentado otras variaciones de composición que incluyen triglicéridos de longitud de cadena mediana. En general, el cumplimiento de dichas dietas restringidas ha sido malo debido a su falta de palatabilidad (56).
 5 También se han intentado dietas ricas en lípidos y pobres en carbohidratos como agentes terapéuticos en pacientes de cáncer para reducir la disponibilidad de la glucosa en tumores (88), como dietas reductoras de peso en pacientes con y sin diabetes (74, 112) para mejorar la tolerancia al ejercicio (83).

Las limitaciones de las dietas basadas en lípidos para elevar las cetonas en sangre a niveles neurológicamente eficaces son muchas. En primer lugar, los niveles de cuerpos cetónicos en dietas basadas en lípidos tienden a ser menores de 3 mM, significativamente menores que el nivel de 7,5 mM conseguido en seres humanos obesos normales durante un ayuno prolongado. En segundo lugar, la ingestión no autorizada de carbohidratos aumenta la secreción de insulina y causa una rápida disminución de la conversión hepática de ácidos grasos libres en cetonas, con la consiguiente caída de las cetonas en sangre y el desvío de lípidos para esterificar a triglicéridos por el tejido adiposo. Muchos informes anecdóticos se refieren a la reanudación de convulsiones en niños que “se saltaron la dieta con tarta de cumpleaños”. En tercer lugar, la falta de palatabilidad y la necesidad de evitar los carbohidratos para mantener niveles corporales altos de cetonas hacen a dichas dietas ricas en lípidos difíciles de usar en adultos en un entorno extrahospitalario, particularmente en sociedades donde se da tradicionalmente una alta ingesta de azúcares refinados, pan, pasta arroz y patatas. En la práctica, la dieta rica en cetonas tradicional no puede hacerse cumplir en pacientes de una edad mayor a la que todo el alimento se prepara en casa bajo estricta supervisión, salvo niños. En cuarto lugar, la ingestión de dichas grandes cantidades de lípido en la población adulta conduciría a una hipertrigliceridemia significativa con sus secuelas patológicas de enfermedad vascular aumentada y enfermedad hepática y pancreática esporádica, y por lo tanto no podría prescribirse por motivos médicos. La ingestión de dietas ricas en lípidos y pobres en carbohidratos fue popular en los años 70 para la reducción de peso frente a la ingesta rica en calorías, a condición de que la ingesta de carbohidratos fuera baja. Sin embargo, debido a la consciencia aumentada de la relación de lípidos en sangre elevados y aterosclerosis, la popularidad de esta dieta cayó bruscamente.
 10
 15
 20
 25

Suplementar una dieta líquida con un 47 % de su contenido calórico con glucosa o 1,3-butanodiol racémico causaba que la concentración de cetonas en sangre se elevara aproximadamente 10 veces hasta D- β -hidroxibutirato 0,98 mM y acetoacetato 0,33 mM (107). Estos valores son ligeramente menores a los obtenidos normalmente con un ayuno de 48 horas y bastante por debajo de los niveles de 7,5 mM obtenidos en personas en ayuno. El 1,3-butanodiol racémico en el hígado se convierte en acetoacetato y tanto el no natural L- β como el natural D- β -hidroxibutirato (respectivamente (S)-3-hidroxibutanoato y (R)-3-hidroxibutanoato). Aunque el 1,3-butanodiol racémico se ha estudiado ampliamente como fuente calórica barata en alimentación animal, e incluso se ha usado experimentalmente en dietas humanas (81, 101), la producción del isómero L no natural es probable que produzca a largo plazo una toxicidad significativa, como se ha mostrado para el uso humano de D-lactato no natural (64). Es una desventaja de administrar el isómero L no natural que compite por el transporte con el D- β -hidroxibutirato natural. Por tanto, la provisión de (R)-1,3-butanodiol como precursor de cuerpos cetónicos es una posibilidad que evita la administración o producción innecesaria del isómero no natural.
 30
 35

El mono- y diéster de 1,3-butanodiol racémico se han sugerido como fuente de calorías y se han ensayado en cerdos (67). La administración oral de un bolo de dieta que contiene un 30 % de calorías como ésteres produjo breves picos de cetonas en sangre 5 mM. Sin embargo, el uso de 1,3-butanodiol con su producción de (S)-3-hidroxibutanoato anormal no es recomendado por las razones indicadas anteriormente.
 40

Aunque el uso de 1,3-butanodiol racémico en dichas formulaciones no esté recomendado, pueden usarse los ésteres de (R)-1,3-butanodiol, solos o como éster acetoacetato. El (R)-1,3-butanodiol puede sintetizarse fácilmente mediante reducción del D- β -hidroxibutirato monomérico, por ejemplo, con LiAlH_4 . El (R)-1,3-butanodiol se somete a oxidación en el hígado, formando D- β -hidroxibutirato, sin distorsión marcada del estado redox hepático. Los estudios en rata han mostrado que alimentar 1,3-butanodiol racémico causaba que la relación $[\text{NAD}^-]/[\text{NADH}]$ citosólica se redujera de 1500 a aproximadamente 1000 (87). En comparación, la administración de etanol reduce la relación $[\text{NAD}^-]/[\text{NADH}]$ hepática a aproximadamente 200 (106).
 45
 50

El acetoacetato, cuando se prepara reciente, puede usarse en disoluciones de infusión, donde puede procurarse a relaciones fisiológicamente normales para un efecto óptimo (95). Debido a los requisitos de fabricación que actualmente requieren una larga vida útil y fluidos termoesterilizados, el acetoacetato se ha procurado frecuentemente en forma de un éster. Esto se ha realizado para aumentar su vida útil y aumentar su estabilidad al
 50

calor durante la esterilización. En la corriente sanguínea, se ha estimado que la actividad esterasa es de aproximadamente 0,1 mmol/min/ml y en hígado de aproximadamente 15 mmol/min/g (68). Además de ésteres que combinan 1,3-butanodiol y acetoacetato, ha habido también un extenso estudio de los ésteres de glicerol de acetoacetato en nutrición parenteral (59) y entérica (82). Dichas preparaciones se ha reseñado que disminuyen la atrofia intestinal debida a la alta captación de acetoacetato por las células intestinales y que son útiles en el tratamiento de quemaduras (85).

Sin embargo, ni 1,3-butanodiol, que forma acetoacetato, ni glicerol, que es un precursor de glucosa, son parte del par rédox normal D-β-hidroxiacetato/acetoacetato. Para la presente invención, en condiciones óptimas, debería procurarse una relación fisiológica de cetonas. Si no, en el animal entero, el hígado ajustará la relación de cetonas de acuerdo con su propia relación $[NAD^+]/[NADH]$ libre mitocondrial. Si se procura una relación anormal de cetonas, las consecuencias patológicas son una clara posibilidad. En el corazón en funcionamiento, la perfusión con acetoacetato como sustrato único induce rápidamente insuficiencia cardiaca (99), en contraposición con los corazones de ratas perfundidos con una mezcla de glucosa, acetoacetato y D-β-hidroxiacetato, en que la eficacia cardiaca aumentaba por una relación fisiológica de cuerpos cetónicos (95).

La mejor fuente exógena de cuerpos cetónicos, que no requiere la ingestión de grandes cantidades de lípidos ni el uso de material que produzca el isómero fisiológicamente incompatible L-β-hidroxiacetato, serían los cuerpos cetónicos mismos. Sin embargo, la presente invención proporciona también alternativas para la administración en terapia.

Son una primera alternativa los poliésteres de D-β-hidroxiacetato. Los poliésteres naturales de D-β-hidroxiacetato se comercializan como artículos comerciales en polímeros de PM 530.000 de *Alcaligenes eutrophus* (Sigma Chemical Co. St. Louis) o como polímeros de PM 250.000 de remolacha azucarera (Fluka, Suiza). Las bacterias producen el polímero como fuente de nutriente almacenado. La fermentación de estos polímeros por bacterias se desarrolló en los años 70 por ICI en el RU y por Solvay et Cie en Bélgica, como un plástico potencialmente biodegradable para cubiertas de tampón y otros usos. El sistema responsable de la síntesis de poli-D-β-hidroxiacetato se ha clonado ahora y se han producido variaciones en la composición del polímero, basándose en los sustratos procurados a las bacterias mostradas. Sin embargo, estos polímeros no pudieron competir con los plásticos basados en el petróleo. No obstante, los genes responsables de la síntesis de polialcanoatos se han clonado y expresado en una serie de microorganismos (93, 102, 113), permitiendo la producción de este material en una variedad de organismos en condiciones extremadamente variables.

El poli-D-β-hidroxiacetato aparece en una serie de formas a partir de diferentes fuentes biológicas en forma de un polvo blanco insoluble con poco sabor y sin olor y es adecuado para incorporación a composiciones para administración oral u otros medios. Las esterasas capaces de romper los enlaces de éster de este material son ubicuas en el plasma y la mayoría de células. Estos polímeros son también fácilmente escindibles por hidrólisis alcalina *in vitro* para preparar una serie de polímeros que culminan en la producción del monómero de PM 104, que se transporta desde el intestino a la vena porta por el transportador de monocarboxilato normal. Como alternativa, puede llevarse a cabo una hidrólisis ácida usando el método publicado al que se hace referencia en el material promocional de Fluka.

Las formas preferidas de polímero de D-β-hidroxiacetato son oligómeros de aquel cuerpo cetónico diseñado para ser fácilmente digerible y/o metabolizable por seres humanos o animales. Estos son preferiblemente de 2 a 100 repeticiones de largo, típicamente de 2 a 20 y lo más convenientemente de 3 a 10 repeticiones de largo. Se entenderá que pueden emplearse mezclas de dichos oligómeros con la ventaja de que puedan obtenerse una serie de características de captación.

Una vez el monómero está en la corriente sanguínea, y puesto que el hígado es incapaz de metabolizar los cuerpos cetónicos sino que solo puede alterar la relación de D-β-hidroxiacetato/acetoacetato, se transportan los cuerpos cetónicos a tejidos extrahepáticos, donde pueden utilizarse. Los niveles de cetonas en sangre conseguidos no están sometidos a la variación causada por la ingestión no conforme de carbohidratos, como es el caso con la presente dieta cetogénica. En lugar de ello, serían simplemente un aditivo a la dieta normal, procurado en cantidades suficientes para producir un nivel en sangre mantenido, típicamente de entre 0,3 y 20 mM, más preferiblemente de 2 a 7,5 mM, durante un periodo de 24 horas, dependiendo de la afección que se esté tratando. En el caso de epilepsia infantil resistente, se cree actualmente que son suficientes niveles en sangre de 2 mM. En el caso de enfermedad de Alzheimer, podían hacerse intentos por mantener los niveles a 7,5 mM conseguidos en los estudios de ayuno humano, en un esfuerzo por proporcionar suministros de energía y acetil-CoA alternativos al tejido cerebral en pacientes de Alzheimer cuando la capacidad de PDH está afectada debido a cantidades en exceso de péptido amiloide Aβ₁₋₄₂ (77, 78).

La determinación por el inventor de que el D-β-hidroxiacetato y sus mezclas con acetoacetato actúan como estimulante nervioso, por ejemplo estimulante del crecimiento nervioso y/o estimulante del crecimiento axónico y dendrítico, abre la opción de elevar los niveles de cuerpos cetónicos a menores grados que los necesarios nutricionalmente para tratar la neurodegeneración.

Las composiciones de la invención son preferiblemente estériles y exentas de pirógenos, particularmente exentas de endotoxinas. En segundo lugar, se formulan preferiblemente de tal modo que puedan ser palatables cuando se procuran como un aditivo a una dieta normal para mejorar el cumplimiento de los pacientes al tomar los suplementos. Los oligómeros y polímeros son generalmente insípidos e inodoros. Las formulaciones de D-β-hidroxi-
 5 butirato y sus mezclas con acetoacetato pueden recubrirse con agentes enmascarantes o pueden orientarse al intestino recubriéndolas entéricamente o encapsulándolas de otro modo como se entiende bien en el campo farmacéutico.

Puesto que los cuerpos cetónicos contienen aproximadamente 6 calorías/g, existe preferiblemente una disminución compensatoria en las cantidades de los demás nutrientes tomados para evitar la obesidad.

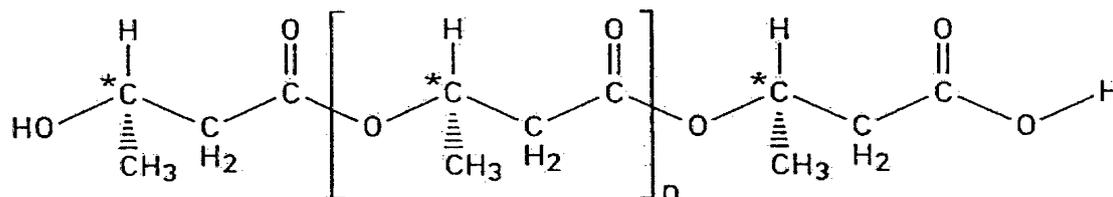
10 Las ventajas particulares de usar los cuerpos cetónicos o precursores tales como ésteres de poli- u oligo-D-β-hidroxi-
 butirato o acetoacetato son:

- 1) pueden comerse con una carga dietética normal de carbohidratos sin perjudicar sus efectos,
- 2) no elevarán el VLDL en sangre, como con las dietas que contienen crema y margarina actuales, eliminando por tanto el riesgo de enfermedad vascular acelerada, esteatosis hepática y pancreatitis,
- 3) tendrán un intervalo de uso más amplio en una mayor variedad de pacientes incluyendo: diabetes de tipo II para prevenir convulsiones hipoglucémicas y coma, en enfermedad de Alzheimer y otros estados neurodegenerativos, para prevenir la muerte de células nerviosas, por ejemplo células de hipocampo, y en epilepsia resistente debido a disminuciones de los transportadores de glucosa cerebral, defectos en la glucólisis o los denominados síndromes de Leigh con defectos congénitos de PDH.

20 El segundo grupo de alternativas particulares son los ésteres de acetoacetato de D-β-hidroxi-
 butirato. Se prefieren los ésteres que proporcionan una relación fisiológica de acetoacetato a D-β-hidroxi-
 butirato, por ejemplo, de 1:1 a 1:20, más preferiblemente de 1:1 a 1:10. Se prefiere particularmente el tetrámero de D-β-hidroxi-
 25 butirato con un residuo de acetoacetato terminal. Dichos materiales tienen la virtud añadida de tener una relación fisiológica de restos de D-β-
 hidroxi-
 butirato/acetoacetato, retirando por tanto la carga sobre el hígado de tener que ajustar el estado rédox del nutriente administrado sin inducir una reducción anormal de la relación hepática [NAD⁺]/[NADH], como ocurre con un consumo excesivo de alcohol. Los ésteres poliméricos, dependiendo de su longitud, tienen una hidrosolubilidad reducida, pero son termoestables. Dichos polímeros pueden usarse, por ejemplo, en uso oral y parenteral en emulsiones, mientras que el acetoacetato, en estado no esterificado, es menos preferido ya que está sujeto a descarboxilación espontánea a acetona con una semivida a temperatura ambiente de aproximadamente 30 días.

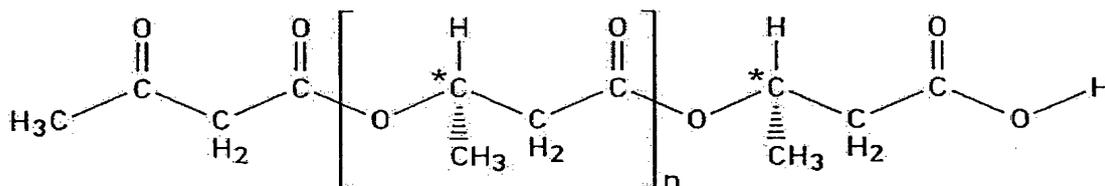
30 Se dan a continuación ejemplos de ésteres de D-β-hidroxi-
 butirato o poli-D-β-hidroxi-
 butirato oxidado terminalmente utilizables como precursores de cuerpos cetónicos.

Ácido poli-(R)-3-hidroxi-
 butirico



Residuo de ácido (R)-3-
 hidroxi-
 butirico terminal Residuo(s) de (R)-3-
 hidroxi-
 butilo de Residuo de ácido (R)-3-hidroxi-
 butirico terminal

Ácido poli-(R)-3-hidroxi-
 butirico oxidado



Residuo de acetoacetato Residuo(s) de (R)-3-
 hidroxi-
 butilo de Residuo de ácido (R)-3-hidroxi-
 butirico terminal

35

En cada caso, n se selecciona de tal modo que el polímero u oligómero se metabolice fácilmente tras administración a un cuerpo humano o animal, proporcionando niveles elevados de cuerpos cetónicos en sangre. Son valores preferidos de n enteros de 1 a 50, lo más preferiblemente de 1 a 20, siendo con particular conveniencia de 3 a 5.

5 Pueden intentarse también una serie de variaciones de este material, incluyendo el poliéster D-β-hidroxi-
butirato mismo, para características de fabricación adecuadas. El material es un polvo blanco insípido. Después de hidrólisis
alcalina parcial, se proporcionaría una mezcla de polímeros de longitud de cadena variable, que tenderían a una
absorción fluida en el intestino y mantendrían niveles altos sostenidos de cetona durante un periodo de 24 horas.

10 El tratamiento puede comprender la provisión de una porción significativa de la ingesta calórica de pacientes con el
poliéster de D-β-hidroxi-
butirato formulado dando una liberación retardada, para mantener las cetonas en sangre en
un intervalo elevado, por ejemplo de 0,5 a 20 mM, preferiblemente de 2-7,5 mM, durante un periodo de 24 horas. La
liberación de cuerpos cetónicos en la sangre puede limitarse mediante la aplicación de una variedad de técnicas
tales como microencapsulación, adsorción y similares, que se practican actualmente en la administración oral de una
serie de agentes farmacéuticos. Pueden usarse particularmente formas recubiertas entéricamente que orientan el
15 suministro a después del estómago cuando el material no requiere hidrólisis en entorno ácido. Cuando se desea
algo de dicha hidrólisis, pueden usarse formas no recubiertas. Algunas formas pueden incluir enzimas capaces de
escindir los ésteres para liberar los cuerpos cetónicos tales como a los que se hace referencia en "Microbial
Polyesters" de Doi.

20 Se ha efectuado la infusión intravenosa de sales de sodio de D-β-hidroxi-
butirato en sujetos humanos normales y
pacientes para una serie de afecciones, por ejemplo aquellos que experimentan tratamiento por sepsis grave en una
unidad de cuidados intensivos. Se encontró que era no tóxico y capaz de disminuir la concentración de glucosa,
ácidos grasos libres y glicerol, pero ineficaz para disminuir la oxidación de leucina.

25 El monómero de D-β-hidroxi-
butirato es un cristal blanco inodoro con un sabor ligeramente agrio o ácido con menor
intensidad en comparación con vinagre o zumo de limón. Puede formularse en la mayoría de alimentos, por ejemplo
bebidas, pudines, purés de hortalizas o rellenos inertes. Las formas ácidas de D-β-hidroxi-
butirato son adecuadas
para uso por vía oral, ya que tienen un pKa de 4,4. Este es menos ácido que el ácido cítrico, con un pKa1 de 3,1 y
pKa2 de 4,8 y ligeramente más ácido que el ácido acético, con un pKa de 4,7.

30 Preferiblemente, se usa solo el isómero D o (R) natural en esta formulación. Puesto que en la práctica no es posible
conseguir una pureza isomérica absoluta, el artículo comercial actualmente comercializado por Sigma, St. Louis Mo.
o Fluka, Ronkonkoma N.Y. es el más adecuado con este fin. La rotación óptica del ácido D-β-hidroxi-
butírico
comercialmente disponible es de -25 ± 1 a la longitud de onda del Na y su punto de fusión de 43-46 °C. La rotación
óptica de la sal de sodio de D-β-hidroxi-
butirato es de $-14,5^\circ$ y su punto de fusión de 149-153 °C. Ambos pueden
ensayarse por análisis enzimático estándar usando D-β-hidroxi-
butirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.30) (5). El
acetoacetato puede determinarse usando la misma enzima (56). El isómero no fisiológico (S) no es medible por
análisis enzimático, pero puede medirse usando CG-espectroscopia de masas (13).

35 Para una dieta de 1.500 calorías, el paciente adulto humano podría consumir 198 g de cetonas al día. Para una dieta
de 2.000 calorías de las mismas proporciones, podrían consumirse 264 g de cetonas al día. Con la dieta lipídica
cetogénica, las cetonas en sangre se elevan a aproximadamente 2 mM. Con la dieta de cetona, los niveles de
cetona deberían ser mayores debido a que las cetonas han sustituido al equivalente calórico de la grasa, es decir
1,5 g de cetona/1 g de grasa. Por consiguiente, las cetonas en sangre deberían ser aproximadamente 3 mM, pero
40 todavía por debajo del nivel conseguido por personas en ayuno de 7,5 mM.

45 Las ventajas de usar los cuerpos cetónicos mismos son varias. En primer lugar, la provisión de los cuerpos
cetónicos mismos no requiere la limitación de carbohidratos, aumentando por tanto la palatabilidad de las
formulaciones dietéticas, particularmente en culturas donde las dietas ricas en carbohidratos son comunes. En
segundo lugar, los cuerpos cetónicos pueden metabolizarse por tejido de músculo, corazón y cerebro pero no
hígado. Por ello, se evita la esteatosis hepática, que puede ser un efecto secundario indeseado de la dieta
cetogénica. En tercer lugar, la capacidad de incluir carbohidratos en las formulaciones dietéticas aumenta las
posibilidades de cumplimiento y abre enfoques terapéuticos prácticos a diabéticos de tipo II en que la insulina es
alta, haciendo impracticable la dieta cetogénica conocida.

50 El presente inventor ha determinado que, aunque puede ser deseable cualquier elevación de los cuerpos cetónicos,
será una cantidad preferida de cuerpos cetónicos para administrar la suficiente para elevar los niveles en sangre al
nivel de 0,5 a 20 mM, preferiblemente al nivel de 2 mM a 7,5 mM y superior, particularmente cuando se intenta
detener la muerte de células cerebrales en enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer. Aunque las
células muertas no pueden restaurarse, se prevé la detención de la afectación adicional y al menos cierta
restauración de la función.

55 Por tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto seleccionado de ácido D-β-
hidroxi-
butírico, acetoacetato y sus precursores metabólicos o una sal fisiológicamente aceptable de estos, en los que
los precursores metabólicos se seleccionan del grupo consistente en (i) triglicéridos de longitud de cadena mediana,
(ii) oligómeros de ácido D-β-hidroxi-
butírico o sus ésteres con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o

alcoholes trihidroxílicos o acetoacetato, (iii) ésteres de ácido D-β-hidroxi-butírico con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o alcoholes trihidroxílicos o con acetoacetato, (iv) ésteres de acetoacetato con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o alcoholes trihidroxílicos para uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

- 5 Este aspecto incluye dicho uso como estimulante neuronal, por ejemplo, capaz de estimular el crecimiento axonal y/o dendrítico en células nerviosas, por ejemplo en hipocampo o sustancia negra, particularmente en enfermedades en que la neurodegeneración tiene consecuencias clínicas graves.

10 En pacientes diabéticos, este uso de estos compuestos permite el mantenimiento de bajos niveles de azúcar en sangre sin temor de complicaciones hipoglucémicas. En sujetos no diabéticos normales, el azúcar en sangre en ayuno es de 80 a 90 % en mg (4,4-5 mM), que se eleva a 130 % en mg (7,2 mM) después de una comida. En los diabéticos, se ha recomendado desde hace mucho un "control estricto" de la diabetes como método para retardar las complicaciones vasculares pero, en la práctica, los facultativos han encontrado difícil mantener los niveles de azúcar en sangre controlados estrechamente por debajo de 150 % en mg (8,3 mM) después de comer, debido a episodios hipoglucémicos. El coma hipoglucémico aparece regularmente en sujetos cuyo azúcar en sangre cae a 2 mM. Como se discute anteriormente (62, 63), en presencia de cetonas en sangre 5 mM, no existen síntomas neurológicos cuando los azúcares sanguíneos caen por debajo de 1 mM.

20 Cuando la terapia está orientada a trastornos relacionados con convulsiones, tales como epilepsia resistente como se trata por la dieta cetogénica, la terapia mejora por el uso de cuerpos cetónicos, sus polímeros o ésteres o precursores tales como compuestos de butanodiol, debido a la reducción o eliminación del alto contenido de lípidos y carbohidratos. Dichos pacientes incluyen aquellos con defectos genéticos en el sistema transportador de glucosa cerebral, en la glucólisis o en la PDH misma, así como el síndrome de Leigh.

25 Fuera del alcance de la invención reivindicada, los trastornos particulares tratables con estos medicamentos son aplicables a todas las afecciones que implica bloqueo de PDH, incluyendo aquellas afecciones que aparecen después de traumatismo craneal, o que implican la reducción o eliminación del suministro de acetil-CoA a las mitocondrias, tal como coma insulínico e hipoglucemia, defectos en el transportador de glucosa en el cerebro o en las etapas de enzimas glucolíticas o en el transporte de piruvato.

30 Preferiblemente, el D-β-hidroxi-butirato se administra en una forma que suministra también acetoacetato. Preferiblemente, el precursor metabólico es aquel que, cuando se administra a un cuerpo humano o animal, se metaboliza, por ejemplo por el hígado, produciendo uno o ambos de D-β-hidroxi-butirato y acetoacetato, más preferiblemente en relación fisiológica. Se prefieren particularmente poli(ácido D-β-hidroxi-butírico) u oligómeros de acetoacetato-β-hidroxi-butirato o un éster de uno de ambos de estos. Pueden emplearse ésteres de alquilo inferior tales como ésteres de alquilo C₁₋₄, pero son más preferibles ésteres más fisiológicamente aceptables tales como los respectivos ésteres de 1,3-butanodiol, particularmente empleando (R)-1,3-butanodiol. Los más preferidos son los ésteres de tri-, tetra y penta-D-β-hidroxi-butirato de acetoacetato. Los precursores de éster incluirán ésteres de 1,3-butanodiol, preferiblemente la forma (R) y particularmente ésteres de acetoacetato tales como acetoacetilglicerol.

35 Son ésteres de poli-D-β-hidroxi-butirato preferidos aquellos que son ésteres de los oligómeros preferidos de 2-100 repeticiones, por ejemplo 2-20 repeticiones, lo más preferiblemente 2-10 repeticiones.

40 Cuando el medicamento o producto nutricional de la invención es para uso sin un almacenamiento prolongado, es conveniente usarlo en forma de composición líquida o sólida que comprende el ácido carboxílico hidroxisustituido y/o la cetona, preferiblemente que comprende ambos, y en que estos son ácidos D-β-hidroxi-butírico y acetoacetato juntos preferiblemente a una relación de aproximadamente 3:1 a 5:1, más preferiblemente de aproximadamente 4:1.

45 Cuando el medicamento o ayuda comprende acetoacetato, preferiblemente no se almacena durante un periodo prolongado de tiempo ni se expone a temperaturas superiores a 40 °C. El acetoacetato es inestable al calentarse y se descompone violentamente a 100 °C en acetona y CO₂. En dichas circunstancias, se prefiere generar el acetoacetato mediante la puesta en contacto de la composición con procesos metabólicos del cuerpo. Preferiblemente, la composición comprende un éster precursor de acetoacetato. Por ejemplo, el éster etílico de acetoacetato es relativamente estable, con un punto de ebullición de 180,8 °C.

50 Aún más preferiblemente, el medicamento o ayuda comprende un éster acetoacetílico de D-β-hidroxi-butirato o dicho éster de un oligómero de D-β-hidroxi-butirato como se describe. Este puede suplementarse con D-β-hidroxi-butirato o uno o de los polímeros de este, p.ej., oligo-D-β-hidroxi-butirato, para producir la relación preferida de los dos componentes. Dicha composición proporcionará los dos componentes preferidos cuando el éster y el polímero se metabolicen en el estómago o en el plasma del ser humano o animal que los ha consumido. De nuevo, el más preferido puede ser un éster de (R)-1,3-butanodiol de acetoacetil-D-β-hidroxi-butirato, ya que será más lipófilo hasta metabolizarse o desesterificarse de otro modo y convertirse todos sus componentes en los cuerpos cetónicos deseados.

55

Un segundo aspecto de la invención proporciona ésteres novedosos de acetoacetato para uso en terapia o como ayuda nutricional. Son los más preferidos los ésteres de acetoacetato de D-β-hidroxiacetato a los que se hace referencia anteriormente.

5 Los métodos de preparación de poli-D-β-hidroxiacetato no se reivindican específicamente ya que estos son conocidos en la materia. Por ejemplo, Shang *et al.*, (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1198-1205. Este polímero está comercialmente disponible en Fluka Chemical Co. P1082, n° de cat. 81329, 1993-94, 980. Second St. Ronkonkoma N.Y. 11779-7238, 800 358 5287.

10 Las ventajas particulares del uso de los polímeros biológicamente disponibles de la invención incluyen la reducción de la cantidad de contraiones tales como sodio que tienen que administrarse con ellos. Esta reducción de la carga de sodio es particularmente ventajosa con mala salud. Se entienden por biológicamente disponibles aquellos materiales que pueden usarse por el cuerpo para producir al menos uno de D-β-hidroxiacetato y una mezcla de estos en relación fisiológica como se describe anteriormente.

15 La cantidad de cuerpos cetónicos usada en el tratamiento de la neurodegeneración tal como enfermedad de Alzheimer y parkinsonismo elevará preferiblemente los niveles en sangre a 0,5 mM a 20 mM, por ejemplo a 2 mM a 7,5 mM como se describe anteriormente. El presente inventor estima que podrían requerirse de 200 a 300 g (0,5 libras) de cuerpos cetónicos por paciente al día para conseguir esto. Cuando el tratamiento es para el mantenimiento de células frente a los efectos de neurotoxinas en estas, pueden estar a un nivel mayor, p.ej. de 2 a 7,5 mM en sangre. Cuando se basa en el efecto del factor estimulador nervioso del D-β-hidroxiacetato así producido, la cantidad administrada puede ser menor, por ejemplo para proporcionar de 0,2 a 4 mM, pero por supuesto puede ser mayor para esta u otra enfermedad.

20 Se observará que el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer se procurará lo más eficazmente poco después de identificar en el paciente una predisposición a desarrollar la enfermedad. Por tanto, el tratamiento para enfermedad de Alzheimer sigue lo más eficazmente a un resultado de prueba positivo de una o más afecciones seleccionadas del grupo de (i) mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide en el cromosoma 21, (ii) mutaciones en el gen de presenilina en el cromosoma 14, (iii) la presencia de isoformas de apolipoproteína E. Serán por supuesto aplicables también otras pruebas que se haya mostrado que son indicativas de enfermedad de Alzheimer.

25 Después de dicho resultado de prueba positivo, será apropiado prevenir el desarrollo de pérdida de memoria y/u otra disfunción neurológica mediante la elevación de la suma total de las concentraciones de los cuerpos cetónicos D-β-hidroxiacetato y acetoacetato en la sangre o plasma del paciente a, digamos, entre 1,5 y 10 mM, más preferiblemente de 2 a 8 mM, mediante uno de varios medios. Preferiblemente, se alimenta al paciente con una dieta con cantidades suficientes de D-β-hidroxiacetato, sus polímeros metabolizables, sus ésteres de acetoacetato o sus precursores de (R)-1,3-butanodiol y sus ésteres de acetoacetato, por ejemplo, acetoacetilglicerol, o sus cuerpos cetónicos administrados por vía intravenosa o intraarterial D-β-hidroxiacetato y ácido acetoacético. Todos los materiales orgánicos a los que se hace referencia anteriormente están opcionalmente en forma de sal o éster. Los ejemplos de sales fisiológicamente aceptables se seleccionarán de sodio, potasio, magnesio, L-lisina y L-arginina o, p.ej, sales más complejas tales como sales de metilglucamina. Los ésteres serán aquellos descritos anteriormente para otros aspectos de la invención.

30 En todos estos tratamientos distintos de la dieta cetogénica, existe la mejora de un método para evitar la caída de las cetonas en sangre que acompaña a la ingestión de carbohidratos en exceso y de un método para evitar la alimentación con lípido en exceso que acelere la síntesis por el hígado de ácidos grasos y colesterol, lo que de otro modo contribuiría a la enfermedad vascular.

35 Se observará que la disfunción cerebral hipoglucémica será también tratable usando los tratamientos y composiciones de la presente invención. Una propiedad adicional asociada al presente tratamiento será una mejora general del rendimiento muscular.

40 La provisión de alimentos basados en cuerpos cetónicos y medicamentos de la invención se facilita por la fácil disponibilidad de una serie de materiales de partida relativamente baratos, o potencialmente baratos, de los que puede derivar el ácido (R)-3-hidroxiacetico (véase "Microbial Polyesters" de Yoshiharu Doi. ISBN 0-89573-746-9 Capítulos 1.1, 3.2 y 8). La disponibilidad de genes capaces de inserción en organismos generadores de alimentos proporciona un medio para generar productos tales como yogures y queso que están enriquecidos en poli(ácido poli-

45 (R)-3-hidroxiacetico) o, después de degradación con enzimas capaces de escindir dichos polímeros, con la sustancia monomérica misma (véase Doi. capítulo 8).

50 La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ilustración solo con referencia a las siguientes figuras y ejemplos experimentales. Se le ocurrirán realizaciones adicionales que entran dentro del alcance de la invención a los especialistas en la materia a la vista de estos.

55

FIGURAS

La Figura 1 es una gráfica que muestra el nivel de (R)-3-hidroxiacetato en sangre producido tiempo después de alimentación por sonda nasogástrica con (R)-3-hidroxiacetato, un oligómero de este como se produce en el ejemplo 1 y un monómero de acetoacetilo del mismo como se produce en el ejemplo 2.

5 EJEMPLOS:EJEMPLO 1:Preparación de oligómeros del ácido (R)-3-hidroxiacetico (D-β-hidroxiacetato)

Se agitaron ácido (R)-3-hidroxiacetico (Fluka-5,0 g: 0,048 mol), ácido p-toluenosulfónico (0,025 g) y benceno (100 ml) a reflujo en un dispositivo de trampa de Dean-Stark durante 24 horas. Se enfrió la mezcla de reacción y se evaporó el benceno a vacío (0,67 kPa). Se obtuvieron 4,4 g de aceite incoloro, de los que una muestra de 20 mg se convirtió en el éster metílico para análisis del número de repeticiones monoméricas usando RMN. Estos estudios muestran que el producto es una mezcla de oligómeros de D-β-hidroxiacetato de un número medio de repeticiones 3,75, siendo principalmente una mezcla de trímeros, tetrámeros y pentámeros y siendo el tetrámero el material individual más abundante. La mezcla de productos era soluble en 1 equivalente de hidróxido de sodio.

15 EJEMPLO 2:Preparación del éster acetoacetílico del ácido (R)-3-hidroxiacetico oligomérico

Se calentó a 60 °C durante 1 hora un lote adicional del producto de aceite incoloro del ejemplo 1 (4,5 g) con diceteno (3,8 g) y acetato de sodio (0,045 g) en atmósfera de nitrógeno. Se añadió diceteno adicional (3,8 g) y se calentó la reacción durante 1 hora adicional, se enfrió y se diluyó con éter, se lavó con agua y se extrajo entonces con bicarbonato de sodio saturado (5x100 ml). Se lavó el extracto combinado con éter y se acidificó entonces con HCl concentrado (añadido gota a gota). La extracción con acetato de etilo (3x50 ml) fue seguida por secado sobre sulfato de magnesio y evaporación a vacío. Se obtuvo una mezcla de sólido/aceite amarilla (7,6 g) que se sometió a cromatografía en una columna de sílice usando diclorometano/metanol (98:2), dando un producto de aceite ámbar claro. Se aislaron las impurezas de movimiento más rápido (1,6 g) y, después de volver a pasar por la columna tetracloruro de carbono/metanol (99:1), se recuperaron 0,8 g de aceite, que se mostró por RMN y espectrometría de masas que era la mezcla deseada de oligómeros acetoacetilados de D-β-hidroxiacetato. La mezcla de productos tenía un R_f de 0,44 en diclorometano/metanol (90:1) y era soluble en 1 equivalente de hidróxido de sodio. Ambos productos del ejemplo 1 y el ejemplo 2 son susceptibles de separación de los componentes individuales por HPLC preparativa.

30 EJEMPLO 3:Administración oral de D-β-hidroxiacetato, oligómeros y oligómeros de D-β-hidroxiacetato de acetoacetilo a ratas

Se investigó la capacidad del D-β-hidroxiacetato y oligómeros de los ejemplos 1 y 2 administrados por vía oral de elevar los niveles en sangre de cuerpos cetónicos como sigue. Se hicieron ayunar ratas durante una noche y se alimentaron por sonda nasogástrica con 100 µl de D-β-hidroxiacetato 4 M/100 g de peso corporal llevado a pH 7,74 usando metilglucamina. Se midieron los niveles en sangre de D-β-hidroxiacetato usando el ensayo de NAD⁺/EDTA de Anal. Biochem. 131, p478-482 (1983). Se añadieron 1,0 ml de una solución compuesta por 2-amino-2-metil-1-propanol (100 mM pH 9,9, 0,094 g/10 ml), NAD⁺ (30 mM, 0,199 g/10 ml) y EDTA (4 mM, 0,015 g/10 ml) a cada una de una serie de cubetas y 4 µl de muestra o control de D-β-hidroxiacetato.

Como las ratas se habían hecho ayunar, los niveles iniciales de D-β-hidroxiacetato estaban elevados desde el estado alimentado de 0,1 mM. Sin embargo, se proporcionaron aumentos de D-β-hidroxiacetato en suero consistentes, aumentos de entre 1, y 3,2 mM en cada caso.

Se repitió este procedimiento con disoluciones 2 M de oligómeros de D-β-hidroxiacetato y sus ésteres de acetoacetilo descritos en los ejemplos 1 y 2. El oligómero de D-β-hidroxiacetato (19/1 en la Figura. 1) y el éster de acetoacetilo (20/4 en la Figura 1) se llevaron ambos a pH 7,6 con metilglucamina y se monitorizó el nivel en sangre de D-β-hidroxiacetato usando el procedimiento de ensayo anteriormente citado. Se mostró que los aumentos de D-β-hidroxiacetato en suero eran de 0,5 a 1,2 mM a los 60 y 120 minutos después de la sonda nasogástrica. Estos resultados demuestran la eficacia del D-β-hidroxiacetato y sus precursores metabólicos de la invención administrados por vía oral en la elevación significativa de los niveles en sangre durante un periodo de horas después de la ingesta.

Se indicó que los ésteres oligoméricos 19/1 y 20/4, aunque no elevaban el nivel de cuerpos cetónicos en sangre tanto como el monómero mismo, daban como resultado la elevación durante un periodo mucho más largo de tiempo y por tanto son adecuados para administración menos frecuente que el monómero.

EJEMPLO 4:

Tabla 2. Dieta cetogénica de muestra de 1500 calorías que usa cuerpos cetónicos, sus ésteres o polímeros. Se supuso que las cetonas contenían 6 kcal/g, las grasas 9 kcal/g, carbohidratos y proteínas 4 kcal/g. Las cetonas se han sustituido para dar calorías equivalentes.

5

	Cantidad (g)	Grasa (g)	Proteína (g)	CHO (g)	Cetonas (g)
Desayuno					
Huevo	32	4	4		
Zumo de manzana	70			7	
Cetonas	66				66
Leche desnatada	92	0	2	3	
Desayuno total		4	6	10	66
Almuerzo					
Carne magra	12	1,75	3,5		
Zanahorias cocidas	45		0,6	3	
Peras en lata	40			4	
Cetonas	69,75				69,75
Leche desnatada	92		2	3	
Almuerzo total		1,75	6,1	10	69,75
Cena					
Salchicha	22,5	6	3		
Brócoli cocido	50		1	2	
Sandía	75			5	
Cetonas	62,25				62,25
Leche desnatada	92		2	3	
Cena total		6	6	10	62,25
Total diario		11,75	18,1	30	198

EJEMPLO 5:

Efecto de los niveles en sangre aumentados de D-β-hidroxibutirato sobre los niveles de GABA en cerebro total

10 Para valorar el efecto del D-β-hidroxibutirato sobre los niveles de GABA en cerebro total y proporcionar por tanto una indicación del efecto antiepiléptico del tratamiento con cuerpos cetónicos o precursor orientado a aumentar los niveles de cuerpos cetónicos en sangre, se congeló el cerebro entero de rata a tiempos fijados después de la administración de D-β-hidroxibutirato como se describe en el ejemplo 3. Se ensayó GABA usando la técnica de HPLC estándar y se relacionó con el contenido de proteína usando un ensayo de proteína estándar. A t= 0, los niveles de GABA eran de 191 pmol/μg de proteína, mientras que a los 120 minutos esto se había elevado a 466 pmol/μg de proteína, demostrando el potencial antiepiléptico.

15

EJEMPLO 6:**Métodos****Medio de cultivo y productos químicos**

5 El medio exento de suero usado del día 0 a 4 contenía medio neurobasal con suplemento de B27 diluido 50 veces (Life Technology, Gaithersburg, Md.) al que se añadió: L-glutamina 0,5 mM, L-glutamato de Na 25 μ M, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Después del día 4, se usó medio DMEM/F12 que contenía insulina 5 μ M, 1-tiroxina 30 nM, progesterona 20 nM, selenita de Na 30 nM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin.

Cultivos de microislas del hipocampo

10 Se retiraron cultivos de hipocampo primarios de embriones Wistar el día 18 y se dispersaron por agitación suave con una pipeta. Se centrifugó la suspensión a 1.500xg durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Se preparó medio nuevo a $0,4-0,5 \times 10^6$ células/ml. Se pipetearon 10 μ l de esta suspensión al centro de pocillos de cultivo recubiertos con poli-D-lisina, se incubaron las placas a 38 °C durante 4 horas y entonces se añadieron 400 μ l de medio neurobasal reciente. Después de 2 días de incubación, se cambió la mitad del medio por medio reciente y se continuó la incubación durante 2 días más. Después del día 4, se cambió el medio por medio DMEM/F12 que
15 contenía insulina 5 μ M, 1-tiroxina 30 nM, progesterona 20 nM, selenita de Na 30 nM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Se dividieron los pocillos en 4 grupos: la mitad de los pocillos recibió D- β -hidroxibutirato de Na a una concentración final de 8 mM, mientras que la mitad de los pocillos recibieron amiloide β_{1-42} 5 nM (Sigma). Se intercambiaron estos medios 2 días después (día 8), se fijaron las células el día 10 y se tñieron con anti-MAP2 (Boehringer Mannheim, Indianápolis Ind.) para visualizar las neuronas y vimentina y GFAP (Boehringer) para
20 visualizar las células gliales.

Resultados**Recuentos celulares**

25 La adición de D- β -hidroxibutirato a la incubación dio como resultado un aumento del número de células neuronales por microisla desde una media de 30 a una media de 70 células por microisla. La adición de amiloide β_{1-42} 5 nM a los cultivos reducía los números de células de 70 a 30 células por microisla, confirmando las observaciones anteriores de Hoshi *et al.*, de que el amiloide β_{1-42} es tóxico para las neuronas del hipocampo. La adición de D- β -hidroxibutirato a cultivos que contenían amiloide β_{1-42} aumentó el número de células desde una media de 30 a 70 células por microisla. A partir de estos datos, se concluyó que la adición de cantidades a nivel de sustrato de D- β -hidroxibutirato a medio cuyos nutrientes principales son glucosa, piruvato y L-glutamina, retarda la tasa de muerte celular en el
30 cultivo. Se concluyó adicionalmente que el D- β -hidroxibutirato puede disminuir la tasa aumentada de muerte celular del hipocampo causada por la adición de amiloide β_{1-42} al cultivo.

Se observó que tanto el número de crecimientos dendríticos como la longitud de los axones habían aumentado con la presencia de D- β -hidroxibutirato, tanto si β_{1-42} estaba presente como si no. Esto es indicativo de un comportamiento similar al factor de crecimiento nervioso.

35

Referencias

1. Cheung, J. Y., C. Conover, D. M. Regen, C. F. Whitfield, H. E. Morgan. "Effect of insulin on kinetics of sugar transport in heart muscle". Am. J. Physiol. 1978; 234: E70-E78.
- 5 2. Simpson, I. A., S. W. Cushman. "Hormonal regulation of mammalian glucose transport". Annu. Rev. Biochem. 1986; 55: 1059-1089.
3. Lamer, J., J. C. Lawrence, R. J. Walkenbach, P. J. Roach, R. J. Hazen, L. C. Huang. "Insulin control of glycogen synthesis". Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1978; 9: 425-439.
4. Denton, R. M., P. J. Randle, B. J. Bridges, R. H. Cooper, A. L. Kerbey, H. T. Pask, D. L. Severson, D. Stansbie, S. Whitehouse. "Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase". Mol. Cell. Biochem. 1975; 9: 27-53).
- 10 5. Mukherjee, C., R. L. Jungas. "Activation of pyruvate dehydrogenase in adipose tissue by insulin. Evidence for an effect of insulin on pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase". Biochem. J. 1975; 148: 229-235.
6. Randle, P. J., R. M. Denton, H. T. Pask, D. L. Severson. "Calcium ions and the regulation of pyruvate dehydrogenase". Biochem. Soc. Symp. 1974; 75-88.
- 15 7. Sodi-Pallares, D., M. R. Testelli, B. L. Fishleder, A. Bistenì, G. A. Medrano, C. Friedland, A. D. Micheli. "Effects of an intravenous infusion of potassium-glucose-insulin solution on the electrographic signs of myocardial infarction". Am. J. Cardiol. 1962; 9: 166-181.
8. Rackley, C. E., R. O. Russell, Jr., W. J. Rogers, J. A. Mantle, H. G. McDaniel, S. E. Papapietro. "Clinical experience with glucose-insulin-potassium therapy in acute myocardial infarction". Am. Heart. J. 1981; 102: 1038-1049.
- 20 9. Muller, J. E., S. Mochizuki, J. K. Koster, Jr., J. J. Collins, Jr., L. H. Cohn, S. R. Neely. "Insulin therapy for depressed myocardial contractility after prolonged ischemia". Am. J. Cardiol. 1978; 41: 1215-1221.
10. Oliver, M. F., L. H. Opie. "Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias". Lancet 1994; 343: 155-158.
- 25 11. Taegtmeier, H. "The use of hypertonic glucose, insulin, and potassium (GIK) in myocardial preservation". J. Appl. Cardiol. 1991; 6: 255-259.
12. McDaniel, H. G., S. E. Papapietro, W. J. Rogers, J. A. Mantle, L. R. Smith, R. O. Russell, Jr., C. E. Rackley. "Glucose-Insulin-potassium induced alterations in individual plasma free fatty acids in patients with acute myocardial infarction". Am. Heart J. 1981; 102: 10-15.
- 30 13. Cross, H. R., K. Clarke, L. H. Opie, G. K. Radda. "Is lactate-induced myocardial ischaemic injury mediated by decreased pH or increased intracellular lactate?" J. Mol. Cell Cardiol. 1995; 27: 1369-1381.
14. Cahill, G. F. Jr. "Starvation in man". N. Engl. J. Med. 1970; 282: 668-675.
15. Sato, K., Y. Kashiwaya, C. A. Keon, N. Tsuchiya, M. T. King, G. K. Radda, B. Chance, K. Clarke, R. L. Veech. "Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction". FASEB J. 1995; 9: 651-658.
- 35 16. Kashiwaya, Y., K. Sato, N. Tsuchiya, S. Thomas, D. A. Fell, R. L. Veech, J. V. Passonneau. "Control of glucose utilization in working perfused rat heart". J. Biol. Chem. 1994; 269: 25502-25514.
17. Clarke, K., Y. Kashiwaya, M. T. King, D. Gates, C. A. Keon, H. R. Cross, G. K. Radda, R. L. Veech. "The β/α peak height ratio of ATP: a measure of free $[Mg^{2+}]$ using ^{31}P NMR". J. Biol. Chem. 1996; 271: 21142-21150.
18. Veloso, D., R. W. Guynn, M. Oskarsson, R. L. Veech. "The concentrations of free and bound magnesium in rat tissues. Relative constancy of free Mg^{2+} concentrations". J. Biol. Chem. 1973; 248: 4811-4819.
- 40 19. Chance, B., J. S. J. Leigh, J. Kent, K. McCully, S. Nioka, B. J. Clark, J. M. Maris, T. Graham. "Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 9458-9462.
20. Veech, R. L., J. W. R. Lawson, N. W. Comell, H. A. Krebs. "Cytosolic phosphorylation potential". J. Biol. Chem. 1979; 254: 6538-6547.
- 45 21. Passonneau, J. V., J. P. Schwartz, D. A. Rottenberg. "The partial purification and properties of pig brain glycogen synthase". J. Biol. Chem. 1975; 250: 2287-2292.
22. Michaelis, L., M. L. Menten. "Die Kinetik der Invertinwirkung". Biochem. Z 1913; 49: 333-369.

23. Haldane, J. B. S., "Enzymes". London: Longmans, Green and Co. 1930: 74-92.
24. Kacser, H., J. A. Burns. "The control of flux". Symp. Soc. Ecp. Biol. 1973; 27: 65-104.
25. Purich, D. L., H. J. Fromm, F. B. Rudolph. "The hexokinases: kinetic, physical, and regulatory properties". Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1973; 39: 249-326.
- 5 26. Casazza, J. P., R. L. Veech. "The interdependence of glycolytic and pentose cycle intermediates in ad libitum fed rats". J. Biol. Chem. 1986; 261: 690-698.
27. Randle, P. J. "Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level". Proc. Nutr. Soc. 1995; 54: 317-327.
- 10 28. Williamson, J. R., H. A. Krebs. "Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart". Biochem. J. 1961; 80: 540-547.
29. Taegtmeier, H., R. Hems, H. A. Krebs. "Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart". Biochem. J. 1980; 186: 701-711.
- 15 30. Halestrap, A. P., R. M. Denton. "The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by α -Cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds". Biochem. J. 1975; 148: 97-106.
31. Williamson, D. H., P. Lund, H. A. Krebs. "The redox state of free nicotinamide-adenomine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver". Biochem. J. 1967; 103: 514-527.
32. Krebs, H. A., R. L. Veech. "The energy and metabolic control in mitochondria". Adriatica Editrice: Bari, 1969: 329-382.
- 20 33. Ozawa, K., H. Aoyama, K. Yasuda, Y. Shimahara, T. Nakatani, J. Tanaka, M. Yamamoto, Y. Kamiyama, T. Tobe. "Metabolic abnormalities associated with postoperative organ failure. A redox theory". Arch. Surg. 1983; 118: 1245-1251.
- 25 34. Tanaka, A., T. Kitai, A. Tokuka, T. Inomoto, H. J. Kim, K. Tanaka, Y. Yamaoka, K. Ozawa. "Increased span of oxido-reduction states between pyridine nucleotide and cytochrome c oxidase in the regenerating rabbit liver as measured by arterial ketone body ratio and near-infrared spectroscopy". Res. Exp. Med. (Berl) 1993; 193: 353-359.
- 35 35. Veech, R. L., D. N. Gates, C. W. Crutchfield, W. L. Gitomer, Y. Kashiwaya, M. T. King, R. Wondergem. "Metabolic hyperpolarization of liver by ethanol: The importance of Mg^{2+} and H^+ in determining impermeant intracellular anionic charge and energy of metabolic reactions". Alcohol Clin. Exp. Res. 1994; 18: 1040-1056.
- 30 36. Lawson, J. W. R., R. L. Veech. "Effects of pH and free Mg^{2+} on the K_{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions". J. Biol. Chem. 1979; 254: 6528-6537.
37. Hochachka, P. W., C. M. Clark, J. E. Holden, C. Stanley, K. Ugurbil, R. S. Menon. " ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of the Sherpa heart: a phosphocreatine/adenosine triphosphate signature of metabolic defense against hypobaric hypoxia". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93: 1215-1220.
- 35 38. Klingenberg, M. "Metabolite transport in mitochondria: an example for intracellular membrane function". Essays Biochem. 1970; 6: 119-159.
39. Coty, W. A., P. L. Pedersen. "Phosphate transport in rat liver mitochondria, Kinetics and energy requirements". J. Biol. Chem. 1974; 249: 2593-2598.
- 40 40. Masuda, T., G. P. Dobson, R. L. Veech. "The Gibbs-Donnan near-equilibrium system of heart". J. Biol. Chem. 1990; 265: 20321-20334.
41. Romani, A., A. Scarpa. "cAMP control of Mg^{2+} homeostasis in heart and liver cells". Magnes. Res. 1992; 5: 131-137.
42. Veech, R. L., Y. Kashiwaya, M. T. King. "The resting potential of cells are measures of electrical work not of ionic currents". Int. Physiol. Behav. Sci. 1995; 30: 283-306.
- 45 43. Denton, R. M., J. G. McCormack, P. J. Midgley, G. A. Rutter. "Hormonal regulation of fluxes through pyruvate dehydrogenase and the citric acid cycle in mammalian tissues". Biochem. Soc. Symp. 1987; 54: 127-143.
44. Saladin, R, P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels, J. Auwerx. "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration". Nature 1995; 377: 527-529.

45. Apstein, C. S., F. N. Gravino, C. C. Haudenschild. "Determinants of a protective effect of glucose and insulin on the ischemic myocardium. Effects on contractile function, diastolic compliance, metabolism, and ultrastructure during ischemia and reperfusion". Circ. Res. 1983; 52: 515-526.
- 5 46. Mantle, J. A., W. J. Rogers, L. R. Smith, H. G. McDaniel, S. E. Papapietro, R. O. Russell Jr., C. E. Rackley. "Clinical effects of glucose-insulin-potassium on left ventricular function in acute myocardial infarction: results from a randomized clinical trial". Am. Heart J. 1981; 102: 313-324.
47. Owen, O. E., A. P. Morcran, H. G. Kemp, J. M. Sullivan, M. G. Herrera, G. F. Cahill, Jr. "Brain metabolism during fasting". J. Clin. Invest. 1967; 46: 1589-1595.
- 10 48. Veech, R. L. "The toxic impact of parenteral solutions on the metabolism of cells: a hypothesis for physiological parenteral therapy". Am. J. Clin. Nutr. 1986; 44: 519-551.
49. Chan, L., J. Slater, J. Hasbargen, D. N. Herndon, R. L. Veech, S. Wolf. "Neurocardiac toxicity of racemic D,L-lactate fluids". Integr. Physiol. Behav. Sci. 1994; 29: 383-394.
50. "ISIS4. A randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction". Lancet 1995; 345: 669-685.
- 15 51. Seelig, M. S., R. J. Elin. "Is there a place for magnesium in the treatment of acute myocardial infarction?" Am. Heart. J. 1996; 132: 471-477.
52. McLean, R. M. "Magnesium and its therapeutic uses: a review". Am. J. Med. 1994; 96: 63-76.
53. Ma, J., A. R. Folsom, S. L. Melnick, J. H. Eckfeldt, A. R. Sharrett, A. A. Nabulsi, R. G. Hutchinson, P. A. Metcalf. "Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities Study". J. Clin. Epidemiol. 1995; 48: 927-940.
- 20 54. Ozono, R., T. Oshima, H. Matsuura, Y. Higashi, T. Ishida, M. Watanabe, M. Yoshimura, H. Hiraga, N. Ono, G. Kajiyama. "Systemic magnesium deficiency disclosed by magnesium loading test in patients with essential hypertension". Hypertens Res. 1995; 18: 39-42.
- 25 55. Rasmussen, H. S., P. McNair, L. Goransson, S. Balslov, O. G. Larsen, P. Aurup. "Magnesium deficiency in patients with ischemic heart disease with and without acute myocardial infarction uncovered by an intravenous loading test". Arch. Intern. Med. 1988; 148: 329-332.
56. Amari, A., N. C. Grace, W. W. Fisher. "Achieving and maintaining compliance with the ketogenic diet". J. Appl. Behav. Anal. 28: 341-342, 1995.
- 30 57. Bartus, R. T., R. L. Dean, 3^o, B. Beer, A. S. Lippa. "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction". Science 217: 408-414, 1982.
58. Beylot, M., D. Chassard, C. Chambrier, M. Guiraud, M. Odeon, B. Beaufriere, P. Bouletreau. "Metabolic effects of a D-beta-hydroxybutyrate infusion in septic patients: inhibition of lipolysis and glucose production but not leucine oxidation". Crit. Care Med. 22: 1091-1098, 1994.
- 35 59. Birkhahn, R. H., J. R. Border. "Intravenous feeding of the rat with short chain fatty acid esters. II Monoacetoacetin". Am. J. Clin. Nutr. 31: 436-441, 1978.
60. Brashear, A., G. A. Cook. "A spectrophotometric, enzymatic assay for D-3-hydroxybutyrate that is not dependent on hydrazine". Anal Biochem. 131: 478-482, 1983.
61. Brion, J. P. "The neurobiology of Alzheimer's disease". Acta Clin. Belg. 51: 80-90 1996.
- 40 62. Cahill, G. F., Jr. "Starvation in man". N. Engl. J. Med. 282: 668-675, 1970.
63. Cahill, G. F., Jr., T. T. Aoki. "Alternative Fuel Utilization in Brain. In: Cerebral metabolism and neural function", editado por J. V. Passonneau, R. A. Hawkins, W. D. Lust y F. A. Welsh, Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, p. 234-242.
64. Chan, L., J. Slater, J. Hasbargen, D. N. Herndon, R. L. Veech, S. Wolf. "Neurocardiac toxicity of racemic D, L-lactate fluids", Integr. Physiol. Behav. Sci. 29: 383-394, 1994.
- 45 65. Chartier-Harlin, M. C., F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, A. Goate, M. Rossor, P. Roques, J. Hardy "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene". Nature 353: 844-846, 1991.

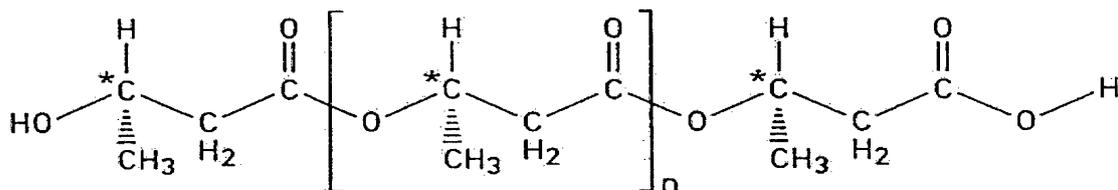
66. Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance. "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families (véase comentarios)", Science 261: 921-923, 1993.
- 5 67. Desrochers, S., P. Dubreuil, J. Brunet, M. Jette, F. David, B. R. Landau, H. Btunengraber. "Metabolism of (R,S)-1,3-butanediol acetoacetate esters, potential parenteral and enteral nutrients in conscious pigs". Am. J. Physiol. 286: E660-7, 1995.
68. Desrochers, S., K. Quinze, H. Dugas, P. Dubreuil, C. Bomont, F. David, K. C. Agarwal, A. Kumar, M. V. Soloviev, L. Powers, B. R. Landau, H. Brunengraber. "(R.S.) 1,3 butandiol acetoacetate esters, potential alternatives to lipid emulsions for total parenteral nutrition". J. Nutr. Biochem. 6: 109-116, 1995.
- 10 69. Feany, M. B., D. W. Dickson. "Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review". Ann. Neurol. 40: 139-148, 1996.
70. Fox, N. C., E. K. Warrington, P. A. Freeborough, P. Hartikainen, A. M. Kennedy, J. M. Stevens, M. N. Rossor. "Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study". Brain 119: 2001-2007, 1996.
- 15 71. Freeman, J. M., E. P. G. Vining. "Intractable epilepsy". Epilepsia 33: 1132-1136, 1992.
72. Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James. "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease (see comments)". Nature 349: 704-706, 1991.
- 20 73. Graham, D. I., S. M. Gentleman, J. A. Nicoll, M. C. Royston, J. E. McKenzie, G. W. Roberts, W. S. Griffin. "Altered beta-APP metabolism after head injury and its relationship to the aetiology of Alzheimer's disease". Acta Neurochir. Suppl. (Wien). 66: 96-102, 1996.
74. Gumbiner, B., J. A. Wendel, M. P. McDermott. "Effects of diet composition and ketosis on glycemia during very-low-energy-diet therapy in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus". Am. J. Clin. Nutr. 63: 110-115, 1996.
- 25 75. Halestrap, A. P. "The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors". Biochem. J. 148: 85-96, 1975.
76. Hawkins, R. A., J. F. Biebuyck. "Regional brain utilization of ketone bodies. In: Cerebral metabolism and neural function", editado por J. V. Passonneau, R. A. Hawkins, W. D. Lust y F. A. Welsh. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980, pág. 255-263.
- 30 77. Hoshi, M., A. Takashima, M. Murayama, K. Yasutake, N. Yoshida, K. Ishiguro, T. Hoshino, K. Imahori. "Nontoxic amyloid β peptide₁₋₄₂ suppresses acetylcholine synthesis". J. Biol. Chem. 272: 2038-2041, 1997.
78. Hoshi, M., A. Takashima, K. Noguchi, M. Murayama, M. Sato, S. Kondo, Y. Saitoh, K. Ishiguro, T. Hoshino, K. Imahori. "Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 2719-2723, 1996.
- 35 79. Hutton, M., F. Busfield, M. Wragg, R. Crook, J. Perez-Tur, R. F. Clark, G. Prihar, C. Talbot, H. Phillips, K. Wright, M. Baker, C. Lendon, K. Duff, A. Martinez, H. Houlden, A. Nichols, E. Karran, G. Roberts, P. Roques, M. Rossor, J. C. Venter, M. D. Adams, R. T. Cline, C. A. Phillips, A. Goate. "Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease". Neuroreport. 7: 801-805, 1996.
- 40 80. Kashiwaya, Y., K. Sato, N. Tsuchiya, S. Thomas, D. A. Fell, R. L. Veech, J. V. Passonneau. "Control of glucose utilization in working perfused rat heart". J. Biol. Chem. 269: 25502-25514, 1994.
81. Kies, C., R. B. Tobin, H. M. Fox, M. A. Mehلمان. "Utilization of 1,3-butanediol and nonspecific nitrogen in human adults". J. Nutr. 103: 1155-1163, 1973.
82. Kripke, S. A., A. D. Fox, J. M. Berman, J. DePaula, R. H. Birkhahn, J. L. Rombeau, R. G. Settle. "Inhibition of TPN-associated intestinal mucosal atrophy with monoacetoacetin". J. Surg. Res 44: 436-444, 1988.
- 45 83. Langfort, J., W. Pilis, R. Zarzeczny, K. Nazar, H. Kaciuba-Uscilko. "Effect of low-carbohydrate-ketogenic diet on metabolic and hormonal responses to graded exercise in men". J. Physiol. Pharmacol. 47: 361-371, 1996.
84. Lawson, J. W. R., R. W. Guynn, N. W. Cornell, R. L. Veech. "Gluconeogenesis, Its regulation in mammalian species". En: editado por R. W. Hanson y M. A. Mehلمان, John Wiley & Sons: Nueva York, 1976, pág. 481-514.
- 50 85. Maiz, A., L. L. Moldawer, B. R. Bistran, R. H. Birkhahn, C. L. Long, G. L. Blackburn. "Monoacetoacetin and protein metabolism during parenteral nutrition in burned rats". Biochem. J. 226: 43-50, 1985.

86. Masuda, T., G. P. Dobson, R. L. Veech. "The Gibbs-Donnan near-equilibrium system of heart". J. Biol. Chem. 265: 20321-20334, 1990.
87. Mehlman, M. A., R. L. Veech. "Redox and phosphorylation states and metabolite concentrations in frozen clamped livers of rats fed diets containing 1,3-butanediol and DL-carnitine". J. Nutr. 102:45-51, 1972.
- 5 88. Nebeling, L. C., E. Lerner. "Implementing a ketogenic diet based on medium-chain triglyceride oil in pediatric patents with cancer". J. Am. Diet. Assoc. 95: 693-697, 1995.
89. Nebeling, L. C., F. Miraldi, S. B. Shurin, E. Lerner. "Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patents: two case reports". J. Am. Coll. Nutr. 14: 202-208, 1995.
- 10 90. Oster-Granite, M. L., D. L. McPhie, J. Greenan, R. L. Neve. "Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein". J. Neurosci. 16: 6732-6741, 1996.
91. Owen, O. E., A. P. Morgan, E. G. Kemp, J. M. Sullivan, M. G. Herrera, G. F. Cahill, Jr. "Brain metabolism during fasting". J. Clin. Invest. 46: 1589-1595, 1967.
92. Paradis, E., H. Douillard, M. Koutroumanis, C. Goodyer, A. LeBlanc. "Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons". J. Neurosci. 16: 7533-7539, 1996.
- 15 93. Rhie, H. G., D. Dennis. "Role of fadR and atoC(Con) mutations in poly(3-hydroxy-butyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant pha-Escherichia coli". Appl. Environ. Microbiol. 61: 2487-2492, 1995.
94. Rossor, M. N. "Catastrophe, chaos and Alzheimer's disease. The E Williams Lecture". J R Coll Physicians Lond 29: 412-418, 1995.
- 20 95. Sato, K., Y. Kashiwaya, C. A. Keon, N. Tsuchiya, M. T. King, G. K. Radda, B. Chance, K. Clarke, R. L. Veech. "Insulin, Ketone bodies, and mitochondrial energy transduction", FASEB J. 9: 651-658, 1995.
96. Selkoe, D. "J. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments". Science 275: 630-631, 1997.
97. Sheng, J. G., K. Ito, R. D. Skinner, R. E. Mrak, C. R. Rovnaghi, L. J. Van Eldik, W. S. Griffin. "In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis". Neurobiol. Aging 17: 761-766, 1996.
- 25 98. Strittmatter, W. J., A. D. Roses. "Apolipoprotein E and Alzheimer disease". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 4725-4727, 1995.
99. Taegtmeyer, H., R. Hems, H. A. Krebs. "Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart". Biochem. J. 186: 701-711, 1980.
- 30 100. Talbot, C., H. Houlden, H. Craddock, R. Crook, M. Hutton, C. Lendon, G. Prihar, J. C. Morris, J. Hardy, A. Goate. "Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease". Neuroreport. 7: 534-536, 1996.
101. Tobin, R. B., M. A. Mehlman, C. Kies, H. M. Fox, J. S. Soeldner. "Nutritional and metabolic studies in humans with 1,3-butanediol". Fed. Proc. 34: 2171-2176, 1975.
- 35 102. Valentin, H. F., D. Dennis. Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: inactivation of mutB by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene". Appl. Environ. Microbio. 62: 372-379, 1996.
103. Veech, R. L. "The toxic impact of parenteral solutions on the metabolism of cells: a hypothesis for physiological parenteral therapy". Am. J. Clin. Nutr. 44: 519-551, 1986.
104. Veech, R. L. "The untoward effects of the anions of dialysis fluids". Kidney Int. 34: 587-597, 1988.
- 40 105. Veech, R. L., W. L. Gitomer. "The medical and metabolic consequences of administration of sodium acetate". Adv. Enzyme Regul. 27: 313-343, 1988.
106. Veech, R. L., R. W. Guynn, D. Veloso. "The time-course of the effects of ethanol on the redox and phosphorylation states of rat liver". Biochem. J. 127: 387-397, 1972.
- 45 107. Veech, R. L., R. L. Harris, M. A. Mehlman. "Brain metabolite concentrations and redox states in rats fed diets containing 1,3-butanediol and ethanol". Toxicol. Appl. Pharmacol. 29: 196-203, 1974.
108. Wang, J. Z., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal. "Restoration of biological activity of alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1". Brain Res. Mol. Brain Res. 38: 200-208, 1996.

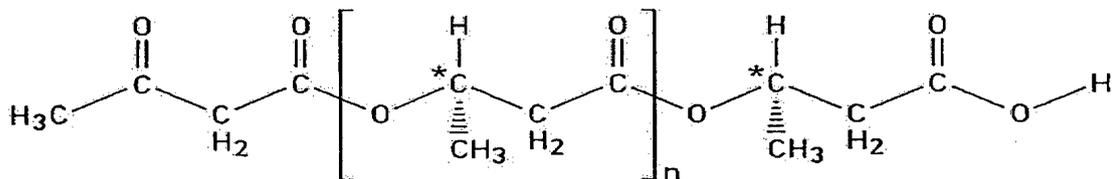
109. Wilder, R. M. "Effect of ketonuria on the course of epilepsy". Mayo Clin. Bull. 2: 307-siguientes, 1921.
110. Williamson, D. H., P. Lund, H. A. Krebs. "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver". Biochem. J. 103: 514-527, 1967.
111. Williamson, D. H., J. Mellanby, H. A. Krebs. Biochem. J. 82: 90-96, 1962.
- 5 112. Wing, R. R., H. A. Vazquez, C. M. Ryan. "Cognitive effects of ketogenic weight-reducing diets". Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 19: 811-816, 1995.
113. Zhang, H., V. Obias, K. Gonyer, D. Dennis. "Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains" Appl. Environ. Microbiol. 60: 1198-1205, 1994.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de ácido D-β-hidroxi-butírico, acetoacetato y sus precursores metabólicos o una sal fisiológicamente aceptable de estos, en el que los precursores metabólicos se seleccionan del grupo consistente en
- 5 (i) triglicéridos de longitud de cadena mediana
- (ii) oligómeros de ácido D-β-hidroxi-butírico o sus ésteres con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o alcoholes trihidroxílicos o acetoacetato,
- (iii) ésteres de ácido D-β-hidroxi-butírico con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o alcoholes trihidroxílicos o con acetoacetato,
- 10 (iv) ésteres de acetoacetato con alcoholes alquílicos C₁-C₄, alcoholes dihidroxílicos o alcoholes trihidroxílicos, para uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.
2. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el trastorno neurodegenerativo es aquel asociado a placas de proteína neurotóxica.
3. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que los ésteres son ésteres de D-β-hidroxi-butirato o ésteres de oligómeros o polímeros de D-β-hidroxi-butirato.
- 15 4. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los compuestos son de fórmula



o



20

o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos,

en los que en cada caso n es un entero de 0 a 1.000.

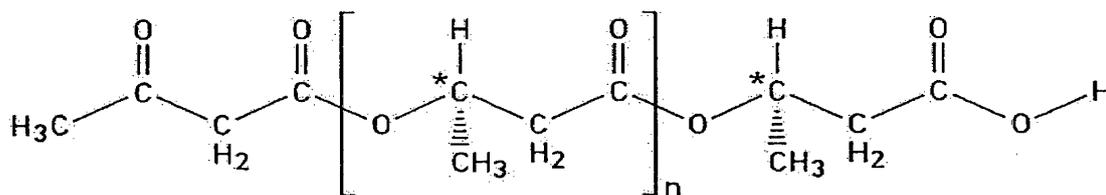
5. Un compuesto para uso según la reivindicación 4, en el que n es un entero de 0 a 200.
6. Un compuesto para uso según la reivindicación 5, en el que n es un entero de 3 a 5.
- 25 7. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, caracterizado por que en el tratamiento proporciona un medicamento con D-β-hidroxi-butirato y acetoacetato a una relación de 1:1 a 20:1.
8. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el tratamiento es tal que eleva el nivel en sangre del paciente de cuerpos cetónicos, definido como la suma total de ácido D-β-hidroxi-butírico y acetoacetato, al nivel en sangre de un paciente de 0,3 a 20 mM.
- 30 9. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el compuesto se selecciona de ácido D-β-hidroxi-butírico, acetoacetato, un oligómero de ácido D-β-hidroxi-butírico, un éster acetoacetílico de un oligómero de ácido D-β-hidroxi-butírico o un éster de alcohol alquílico C₁-C₄, alcohol dihidroxílico o alcohol trihidroxílico del mismo y un éster acetoacetílico de un ácido D-β-hidroxi-butirico o un éster de alcohol dihidroxílico o alcohol trihidroxílico del mismo,
- 35 y/o sales fisiológicamente aceptables de cualquiera de estos.

10. Un compuesto para uso según la reivindicación 9, caracterizado por que el éster es un éster de (R)-1,3-butanodiol.

5 11. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo consistente en trastornos neurodegenerativos que implican la incapacidad de metabolizar glucosa, pérdida de memoria por envejecimiento, péptidos o proteínas neurotóxicas y anomalías genéticas.

10 12. Un compuesto para uso según la reivindicación 11, caracterizado por que el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo consistente en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, demencia vascular, demencia senil de tipo cuerpos de Lewy, demencia parkinsoniana con atrofia frontal, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Alzheimer asociada a síndrome de Down, ECJ, EEB, miastenia grave y distrofia muscular.

13. Un compuesto de fórmula



en la que n es de 1 a 50

15 o sales o ésteres fisiológicamente aceptables del mismo.

14. Un compuesto como se define en la reivindicación 13, en el que el éster se selecciona del grupo consistente en ésteres de alcohol alquílico C₁-C₄, ésteres de alcohol dihidroxílico o ésteres de alcohol trihidroxílico, en el que los ésteres de alcohol alquílico C₁-C₄, ésteres de alcohol dihidroxílico o alcoholes trihidroxílicos se seleccionan del grupo de alcoholes alquílicos C₁-C₄ y (R)-1,3-butanodiol.

20 15. Un compuesto según la reivindicación 1, 9 o 14, en el que el éster es de (R)-1,3-butanodiol.

Niveles de beta-hidroxibutirato

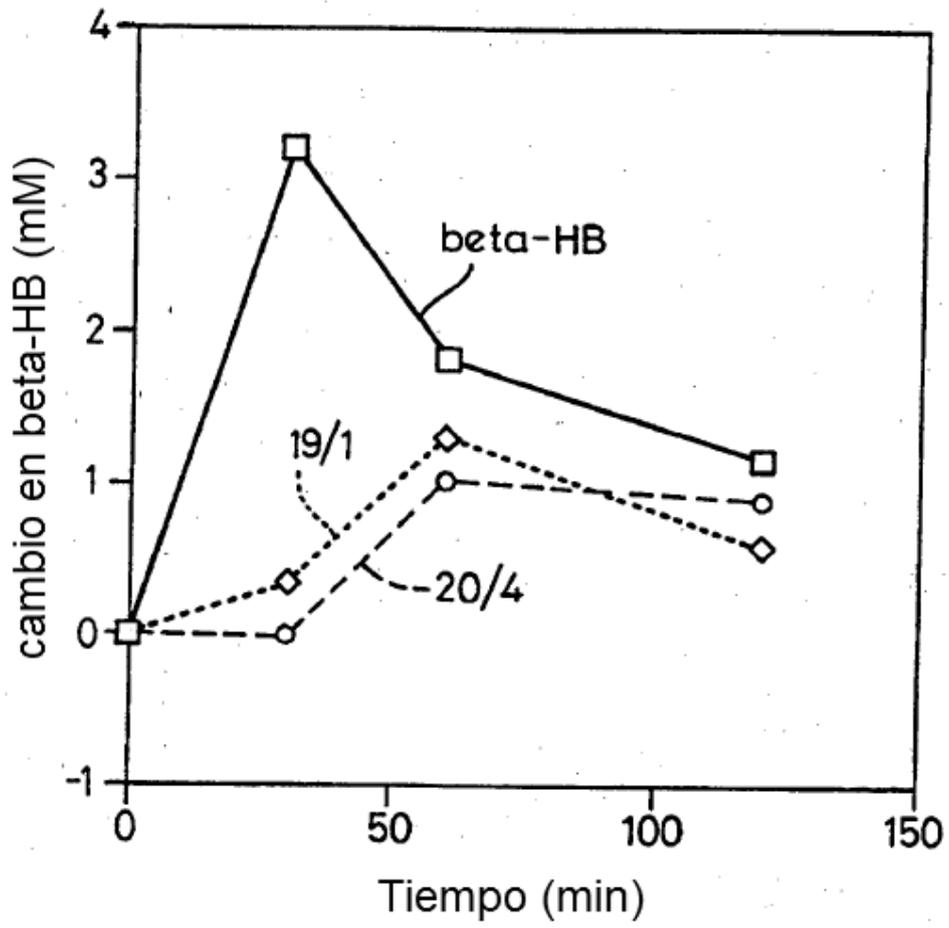


Fig.1