

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 395**

51 Int. Cl.:

A23K 10/12	(2006.01) A23L 33/135	(2006.01)
A23D 9/00	(2006.01) A23L 33/18	(2006.01)
A23D 9/007	(2006.01) A23L 33/20	(2006.01)
A23K 50/80	(2006.01) A23L 33/175	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 31/201	(2006.01)	
A23L 33/10	(2006.01)	
A23L 33/105	(2006.01)	
A23L 33/12	(2006.01)	
A23L 33/13	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2007 PCT/GB2007/050112**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2007 WO07102030**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2007 E 07712990 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 1991068**

54 Título: **Compuestos modificados isotópicamente y su uso como complementos alimentarios**

30 Prioridad:

08.03.2006 GB 0604647

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**RETROTOPE, INC. (100.0%)
12133 Foothill Lane
Los Altos Hills, CA 94022-3319, US**

72 Inventor/es:

SHCHEPINOV, MIKHAIL SERGEEVICH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 639 395 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

Compuestos modificados isotópicamente y su uso como complementos alimentarios

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos modificados isotópicamente y a su uso como complementos alimentarios.

10 Antecedentes de la invención

Una teoría del envejecimiento aceptada en la actualidad culpa de los cambios irreversibles en la maquinaria celular y la reducción de la eficiencia de los procesos metabólicos sobre los efectos perjudiciales de los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS), que se encuentran normalmente presentes en la célula como parte del proceso respiratorio. Las ROS y RNS oxidan/nitran el ADN, las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares. De éstos, la oxidación de las proteínas, que convierte la arginina, la lisina, la treonina, el triptófano y la prolina en los compuestos de carbonilo correspondientes, no puede ser reparada por las proteasas tras la oxidación de un cierto número umbral de restos de aminoácido.

La proteína dañada pierde su actividad catalítica o estructural, pero las proteasas son incapaces de desintegrar cadenas fuertemente carboniladas, de modo que las especies dañadas se acumulan y agregan, obstruyendo los pasajes celulares. Este proceso similar a la oxidación va desgastando gradualmente todos los mecanismos celulares, ralentizando todo, causando, finalmente, la muerte celular.

Aparte del envejecimiento, muchas enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la demencia, las cataratas, la artritis, la insuficiencia renal crónica, el síndrome respiratorio agudo, la fibrosis quística, la diabetes, la psoriasis y la sepsia, por dar algunos ejemplos, se asocian con una mayor carbonilación de las proteínas. Por lo general, los niveles fisiológicos de los carbonilos proteicos están en aproximadamente 1 nmol/mg de proteína, mientras que los niveles patológicos llegan a 8 nmol/mg y superiores.

Para las dos moléculas implicadas en el proceso de daño oxidativo de las proteínas, es decir, un oxidante y su sustrato, el oxidante ha sido objeto de muchos estudios con el objetivo de neutralizarlo o eliminarlo mediante el aumento del número de antioxidantes (vitaminas, glutatión, péptidos o enzimas). El sustrato, por ejemplo, los restos de aminoácido (AA) que se convierten en carbonilos, han recibido menos atención.

Una característica común de todos los restos de AA (excepto la prolina) vulnerables a la carbonilación es que pertenecen al grupo de AA esenciales, que no pueden ser sintetizados por vertebrados y deben ser ingeridos, por ejemplo, consumidos con los alimentos. El grupo incluye fenilalanina, valina, triptófano, treonina, isoleucina, metionina, histidina, arginina, lisina y leucina (la arginina es esencial para los niños de hasta 5 años).

La oxidación tanto de la Arg como de la Lys por las ROS produce semialdehído aminoadípico y procede a través del reemplazo secuencial de ω -hidrógenos con hidroxilos. La oxidación de Lys, Arg, Trp, Thr, Phe e His se muestra en la Fig. 1. Las cadenas laterales experimentan las mismas transformaciones si estos AA forman parte de polipéptidos/proteínas. Otros AA esenciales sometidos a oxidación impulsada por ROS incluyen Leu (a 5-hidroxileucina), Val (3-hidroxisvalina) y Ile (varios productos).

Otros tipos de daños oxidativos que afectan a los AA esenciales implican especies reactivas de nitrógeno (RNS). En la Fig. 2, se muestran ejemplos.

Otro proceso más que es perjudicial para las proteínas es una escisión de enlaces peptídicos conducida por ROS, que está precedida por la oxidación de las proteínas mediada por radicales libres de oxígeno. Un átomo de hidrógeno se extrae de un átomo C α de la cadena polipeptídica, lo que conduce a la formación de un radical alcoxilo. Esto puede conducir al derivado proteico del hidroxilo o a la escisión del enlace peptídico por (1) diamida o (2) la ruta de la α -amidación. Esto se ilustra en la Fig. 3.

Los ácidos nucleicos normalmente no se consideran componentes esenciales de la dieta, pero también son dañados por las ROS. Un ejemplo particularmente importante para el funcionamiento mitocondrial es la formación de 8-oxi-G, como se ilustra en la Fig. 4. Esto conduce a mutaciones en el genoma mitocondrial, que no se mantiene ni se repara tan eficazmente como el genoma nuclear, con consecuencias perjudiciales para la eficiencia de los procesos respiratorios en la célula. Otra causa de degradación es la radiación.

El efecto isotópico cinético se usa ampliamente para dilucidar los mecanismos y las etapas determinantes de la velocidad de las reacciones químicas y bioquímicas. La velocidad de reacción que implica la escisión del enlace C- ^1H es normalmente de 5 a 10 veces más rápida que la escisión del enlace C- ^2H (^2H -D = deuterio) correspondiente, debido a una diferencia del doble en las masas de los isótopos H y D. La diferencia en las velocidades de reacción es aún mayor para el tritio (^3H o T), ya que es 3 veces más pesado que el hidrógeno, pero ese isótopo es inestable.

El segundo componente del enlace C-H, el átomo de carbono, también se puede sustituir por un isótopo ^{13}C más pesado, pero la disminución de la velocidad de escisión del enlace será mucho menor, ya que ^{13}C es solo una fracción más pesada que ^{12}C . Véase Park *et al.*, *JACS* (2006) 128: 1868-72.

- 5 Las reacciones de oxidación son un buen ejemplo del efecto isotópico, ya que la sustracción de hidrógeno por un oxidante normalmente es una etapa limitante de la velocidad del proceso. Darngaard, *Biochemistry* (1981) 20: 5662-69, ilustra esto: el efecto isotópico cinético sobre V/K para la oxidación de (1-R)[1- $^2\text{H}_2$]- y (1-R)[1- $^3\text{H}_2$]-etanol por la alcohol deshidrogenasa del hígado (ADH) a acetaldehído, medida a pH 6, fue de 3 (D(V/K)) y 6,5 (T(V/K)), disminuyendo hasta 1,5 y 2,5 respectivamente a pH 9. Las velocidades más bajas de lo esperado confirman la
- 10 distinta función de los sistemas no ADH como rutas alternativas. Experimentos *in vivo* en hígado de rata perfundido, como se describe en Lundquist *et al.*, *Pharm. & Tox.* (1989) 65: 55-62, dieron el valor medio de D(V/K) de 2,89. Por lo tanto, en todos los casos, la oxidación de etanol deuterado se ralentizó sustancialmente.

- 15 Se ha administrado material marcado isotópicamente a animales, y también a seres humanos, con fines de diagnóstico. Gregg *et al.*, *Life Sciences* (1973) 13: 755-82, desvelan la administración a ratones destetados de una dieta en la que la fracción de carbono digerible contenía un 80 % de átomos de ^{13}C . El aditivo era ácido acético marcado con ^{13}C . El examen de tejidos no reveló anomalías claramente atribuibles al alto enriquecimiento isotópico.

- 20 El documento US2006/0035382A1 desvela un método de metabolómica de RMN para la observación de un animal mediante el marcaje del animal con un isótopo estable. El animal se produce mediante su alimentación con comida marcada con el isótopo estable.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención se basa en la realización de que la sustitución isotópica puede usarse para sintetizar una clase de compuestos que, cuando se ingieren, producen la formación de constituyentes corporales (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, grasas, hidratos de carbono, etc.) que son funcionalmente equivalentes a los constituyentes corporales normales, pero que tienen una mayor resistencia a los procesos de degradación/perjudiciales, por ejemplo, los mediados por ROS y RNS o radiación. Por lo tanto, de acuerdo con la
- 30 presente invención, una composición nutritiva comprende un nutriente esencial en el que al menos un átomo de H intercambiable es ^2H y/o al menos un átomo de C es ^{13}C .

- Los compuestos para su uso en la invención son idénticos a los nutrientes o constituyentes normales de los alimentos, excepto que contienen isótopos estables que, cuando se incorporan en los constituyentes corporales, hacen que dichos constituyentes corporales sean más resistentes a los procesos de degradación de lo que serían de otro modo. Proporcionan un método de protección de la funcionalidad preferida de biomoléculas naturales; el método comprende el suministro de un compuesto de manera que se incorpore a las biomoléculas y, al hacerlo, confiere propiedades a la biomolécula que protegen frente a las alteraciones químicas nocivas o perjudiciales.
- 35

- 40 Los compuestos para su uso en la invención se sintetizan químicamente y, cuando son ingeridos por un organismo, y se metabolizan de modo que se produce la incorporación del compuesto a una biomolécula funcional; haciendo la incorporación del compuesto que la biomolécula tenga un mayor grado de resistencia a los cambios moleculares perjudiciales que el caso de la biomolécula equivalente que no comprendía el compuesto. Dichos compuestos pueden actuar como imitadores de elementos precursores naturales de biomoléculas. Pueden imitar a un
- 45 aminoácido esencial. El organismo es normalmente una planta, un microbio, un animal o un ser humano.

Normalmente, un compuesto para su uso en la invención, no es degradado por enzimas de la ruta P450. Por lo tanto, puede acumularse en un sujeto para el que sea esencial.

- 50 La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones anexas.

Descripción de los dibujos

- 55 Cada una de las Fig. 1 a 4 muestran reacciones que degradan nutrientes esenciales.

Descripción de la invención

- La presente invención se refiere al hecho de que los complementos esenciales pueden experimentar transformaciones químicas irreversibles, tales como oxidación, nitración, etc., que conducen a la aparición de senescencia o enfermedades. Los componentes alimentarios esenciales no pueden ser sintetizados *de novo* por un organismo, por ejemplo, un mamífero, primate o ser humano y, por lo tanto, necesitan ser suministrados con la dieta. Para los fines de la presente memoria descriptiva, un ácido nucleico es esencial, aunque se puede describir más adecuadamente como condicionalmente esencial. Los nutrientes condicionalmente esenciales se deben suministrar con la dieta en ciertas circunstancias.
- 60

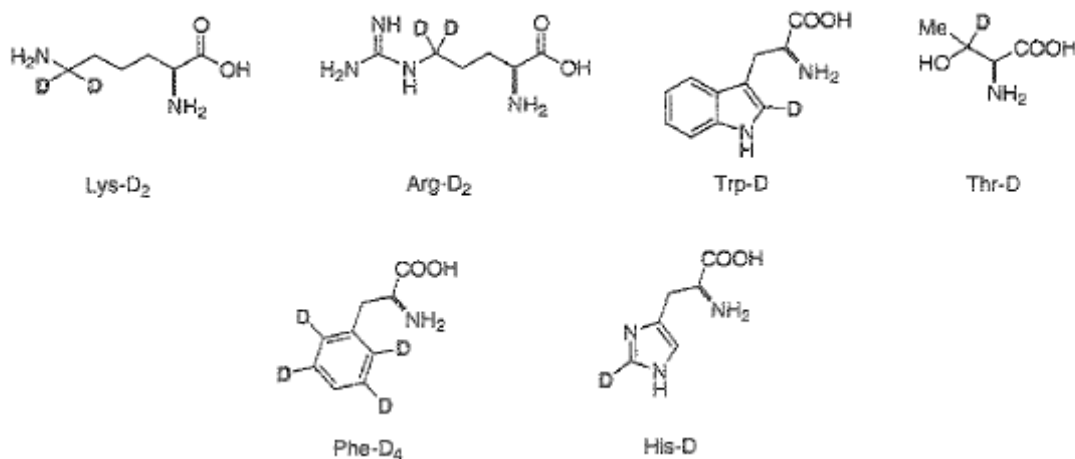
- 65 Para los seres humanos, (hasta los cinco años), 10 aminoácidos son esenciales, es decir, Phe, Val, Trp, Thr, Ile,

Met, His, Leu, Lys y Arg. Los nucleósidos de purina y pirimidina son condicionalmente esenciales. Los ácidos grasos esenciales son ω -3 y ω -6, mientras que el ácido oleico monoinsaturado, en general, no es esencial.

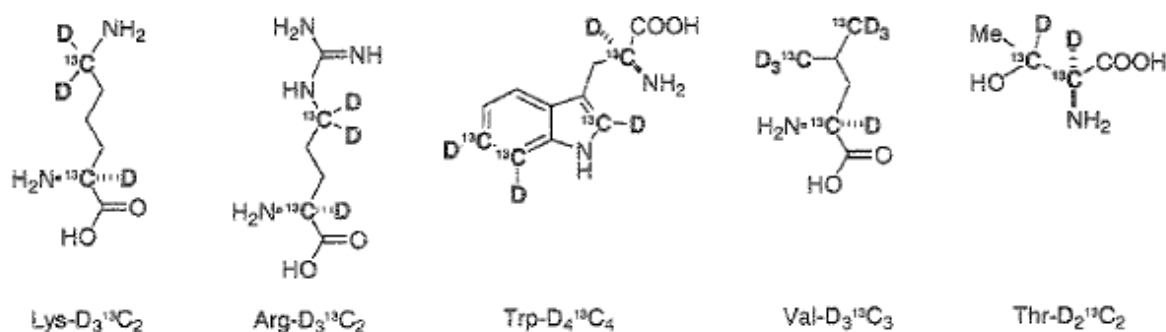
De acuerdo con la presente invención, se pueden ralentizar los efectos no deseados propuestos tales como el envejecimiento/las enfermedades. Los compuestos consumidos se deben modificar para ralentizar las reacciones no deseadas, conservando al mismo tiempo su identidad química. En una realización esto se puede conseguir sustituyendo átomos de hidrógeno sometidos a abstracción durante la oxidación/sustitución oxidativa en los sitios de carbono más reactivos, o en los sitios que se sabe que sufren daño infligido por ROS/RNS, como se ilustra en las Fig. 1-4, con deuterios, que, debido al efecto isotópico, disminuyen la velocidad de las reacciones. La sustitución de los átomos de carbono en lugar de, o además de, la sustitución de los átomos de H, puede requerir un mayor grado de sustitución, ya que no se añade tanto a la disminución de la velocidad de reacción (D es el doble del peso de H, y ^{13}C es menos del 10 % más pesado que ^{12}C).

Dependiendo en parte del método de preparación, un compuesto para su uso en la invención puede comprender una sustitución isotópica parcial o total. Por ejemplo, la sustitución de deuterio puede estar solamente en uno o dos átomos de hidrógeno que se consideran intercambiables químicamente, por ejemplo, en OH o CH_2 adyacente a un grupo funcional. La sustitución de ^{13}C total en lugar de parcial se puede lograr con mayor eficacia.

En una realización preferida de la invención, los (o solamente los) hidrógenos sensibles a la oxidación se deben sustituir con deuterios para reducir al mínimo el riesgo de que otros procesos metabólicos se ralenticen cuando se usen fragmentos de estos AA para construir otras estructuras. En casos especiales, para aumentar aún más la resistencia a la oxidación, se pueden sustituir tanto ^1H como ^{12}C de un enlace H-C por ^2H y ^{13}C . Para reducir al mínimo cualquier posible efecto negativo de los isótopos, tal como la ralentización no deseada de las reacciones bioquímicas que utilizan fragmentos de AA protegidos con isótopos, preferentemente solo deben derivatizarse las partes más sensibles de los AA, por ejemplo, los átomos de ω de Lys y Arg. Los compuestos preferidos de este tipo son



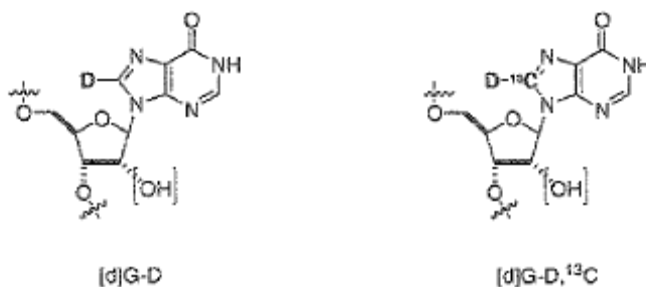
Si el estrés oxidativo es tan grave que los beneficios de proteger los sitios vulnerables superan a los posibles efectos perjudiciales de ralentizar otras rutas metabólicas (como es el caso de algunas enfermedades), entonces se pueden emplear los AA protegidos con isótopos más pesados, como se muestra en las siguientes fórmulas ilustrativas:



Dichos derivados confieren protección contra los efectos perjudiciales ilustrados en las Fig. 1-4.

Como todos los vertebrados han perdido la capacidad de sintetizar los AA esenciales y requieren el suministro externo de AA esenciales o de ácidos grasos, son posibles formas no dolorosas de administrar los AA deuterados/deuterados y modificados con ^{13}C en las fuentes de alimentación para los seres humanos. Para los AA, un ejemplo de proceso es la creación de levaduras/algas/bacterias/etc. deficientes en AA esenciales, cultivándolas sobre medios/sustratos apropiados "protegidos" isotópicamente y después alimentando a peces o a ganado con la biomasa obtenida. Los peces o el ganado pueden después introducirse en la cadena alimentaria de la manera normal. Otro ejemplo es la administración directa de una píldora/un complemento.

Los componentes no esenciales de los alimentos son los compuestos que pueden ser producidos por un organismo, tales como bases de ácido nucleico, pero cuando estos se consumen como alimento, algunos de los componentes no esenciales se digieren/usan como precursores para otros compuestos, aunque una cierta fracción se utiliza directamente en procesos metabólicos, por ejemplo, bases de ácido nucleico (NA), incorporadas en el ADN. Por lo tanto, como ejemplo, algunas de las bases de NA suministradas con la comida pueden estar protegidas isotópicamente, como se muestra en las siguientes fórmulas ilustrativas:



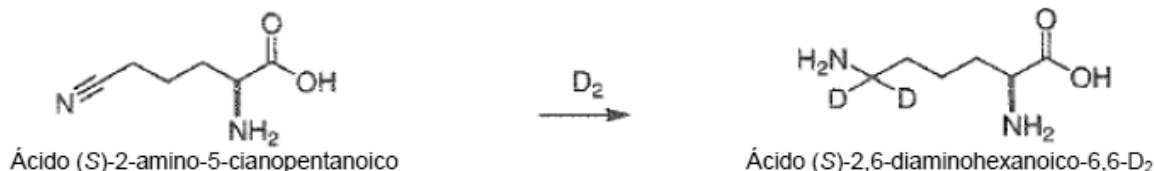
Dichas especies son menos vulnerables a la oxidación tras su incorporación al ADN. En otras palabras, se puede reducir la velocidad de oxidación del ADN, incluyendo el ADN mitocondrial.

Tanto los componentes esenciales como los no esenciales pueden administrarse a través de un sistema digestivo para conseguir un efecto deseado de ralentización de los cambios perjudiciales asociados con el proceso de envejecimiento y diversas enfermedades. Sin embargo, se pueden prever otros medios distintos del tracto digestivo, por ejemplo, la administración por vía intravenosa. El aspecto importante de cualquier sistema de administración es conseguir que los compuestos manipulados isotópicamente se incorporen en los constituyentes corporales/bioquímicos.

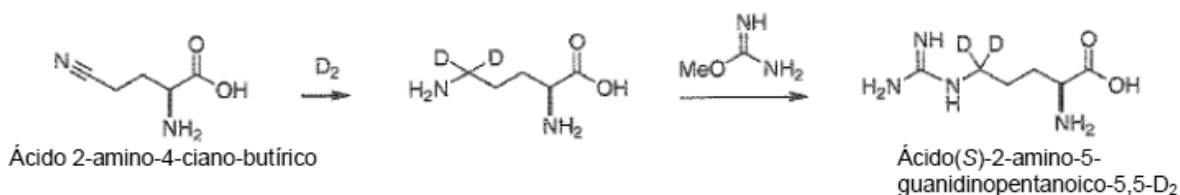
Una composición de la invención puede proporcionarse como cualquier complemento alimentario. Por lo general, además del componente esencial marcado isotópicamente, comprende uno o más nutrientes. Puede comprender material vegetal, material microbiano o material animal. La composición puede ser un producto alimentario normal, un comprimido u otro medicamento sólido, o un líquido inyectable u otro líquido.

La composición puede comprender compuestos no modificados además de los que han sido marcados. El compuesto marcado normalmente está presente en una cantidad mayor y ciertamente superior a la que puede estar presente de manera natural.

Los compuestos para su uso en la invención se pueden preparar mediante procedimientos que son conocidos o que pueden ser modificados según sea apropiado por un experto en la materia. Por ejemplo, el análogo deuterado de Lys, ácido 2,6-diaminohexanoico-6,6- D_2 , se puede sintetizar a partir de un nitrilo precursor mediante hidrogenólisis en D_2 de acuerdo con procedimientos convencionales.



El análogo deuterado de Arg, ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico-5,5- D_2 , se puede sintetizar a partir de un nitrilo correspondiente.



La ornitina-D₂, obtenida mediante hidrogenólisis de una manera similar a la descrita anteriormente para Lys, se disolvió en agua y se mezcló con un volumen igual de O-metilisourea 0,5 M, pH 10,5, ajustado con NaOH. Después de 4-5 h, se añadió TFA al 1 % para detener la reacción. El compuesto se purificó mediante RP-HPLC (los tampones fueron A: TFA al 0,1 %/H₂O; B: TFA al 0,1 %/(MeCN al 80 %/H₂O al 20 %), B del 0 al 65 % durante 40 min. Véase Kimmel, *Methods Enzymol.* (1967), **11**:584-589, y Bonetto *et al.*, *Anal. Chem.* (1997), **69**:13154319.

Los ciano-aminoácidos son precursores de aminoácidos. La síntesis de ciano-aminoácidos se puede llevar a cabo por varias rutas, partiendo de una variedad de precursores. Los alcoholes (Davis y Untch, *J. Org. Chem.* (1981), 46: 2985-2997), las aminas (Mihailovic *et al.*, *Tet. Lett.* (1965) 461-464), las amidas (Yamato y Sugawara, *Tet. Lett.* (1970) 4383-4384) y la glicina (Belokon *et al.*, *JACS* (1985) 107:4252-4259) pueden servir como materiales de partida en dichas síntesis. Algunos métodos pueden producir compuestos sustituidos tanto con ¹³C como con ²H, mientras que otros son solo compatibles con la deuteración.

La deuteración se puede llevar a cabo usando gas de deuterio (por ejemplo, como se describe en White *et al.*, *JACS* (1994) 116:1831-1838) o diferentes compuestos deuterados, por ejemplo, NaBD₄ (Sato *et al.*, *Tet. Lett.* (1969) 4555-4558); la elección entre estos métodos debe basarse en la disponibilidad y el precio de los derivados de deuterio correspondientes. Algunas de las estrategias ensayadas se describen en detalle a continuación.

Los sitios que se van a proteger de los ácidos grasos esenciales para el fin de la presente invención son los grupos metileno de los sistemas 1,4-dieno (posiciones "bis-alilo"). Son los más reactivos, y se pueden derivatizar fácilmente usando una variedad de métodos. La bromación de esta posición seguida de la reducción con ²H₂ da lugar a la sustitución de un hidrógeno cada vez. Para sustituir ambos, el procedimiento debe repetirse dos veces. Un método más atractivo puede ser una sustitución directa en una etapa en agua pesada. Un ejemplo de dicho intercambio se da a continuación (Ejemplo 6) para la 8-deuteración de la desoxiguanosina.

Un enfoque alternativo para la síntesis de ácidos grasos insaturados deuterados se basa en un tratamiento con base fuerte de 1,4-dienos seguido de la inactivación con agua pesada. Esto se ilustra en el Ejemplo 7.

Hay ejemplos en la literatura de las sustituciones en cualquier posición de todas las bases de nucleótidos principales con todos los tipos principales de isótopos (²H₂, ³H₂, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O etc.). A continuación, se describen solo dos procedimientos basados en el trabajo previamente publicado para la deuteración selectiva de las purinas (Esaki *et al.*, *Heterocycles* (2005) 66:361-369 y Chiriac *et al.*, *Labeled Compd. Radiopharm.* (1999) 42:377-385). También son adecuados otros numerosos protocolos. A menudo es posible intercambiar hidrógenos por deuterios en una base de ácido nucleico/nucleósido existente, mientras que para incorporar ¹³C, las bases se deben ensamblar (por ejemplo, véase Folesi *et al.*, "Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids" (2000)).

Se conocen síntesis de algunos componentes dietéticos esenciales "reforzados" isotópicamente adecuados para su uso en la presente invención; véase, por ejemplo, 6,6-²H₂,1,1-¹³H₂-L-Lys: Lichtenstein *et al.*, *J. Lipid Res.* (1990) 31:1693-1701 y 8-deutero-desoxi-guanosina: Toyama *et al.*, *J. Raman Spectrosc.* (2002)33: 699-708).

La invención no está limitada por los métodos de química orgánica sintética descritos anteriormente, ya que existe un gran arsenal de diferentes métodos que también se pueden usar para preparar los componentes anteriormente mencionados y otros componentes protegidos isotópicamente adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, además de los métodos desvelados en los ejemplos, se pueden emplear otros métodos adecuados para la conversión de una función de grupo amino primario en una función CN (con el objetivo de la posterior deuteración del átomo de carbono alfa (con respecto al N)), por ejemplo:

- una oxidación directa por oxígeno catalizada por un sistema de cloruro cuproso-dioxígeno-piridina (Nicolaou *et al.*, *Synthesis* (1986) 453-461; Capdevielle *et al.*, *Tet. Lett.* (1990) 31: 3305-3308);
- una conversión directa usando bromosuccinimida (Gottardi, *Monatsh. Chem.* (1973) 104:1690-1695);
- una oxidación directa de yodosobenceno (Moriarty *et al.*, *Tet. Lett.* (1988) 29: 6913-6916);
- una conversión en dos etapas a través de un derivado de ditosilo y un derivado de yodo (DeChristopher *et al.*, *JACS* (1969) 91:2384-2385).

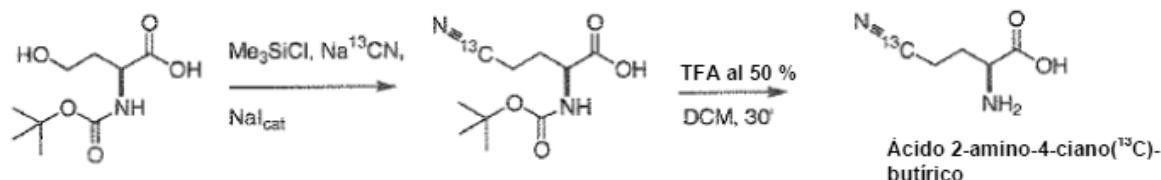
Los siguientes Ejemplos 1 a 9 ilustran la preparación de materiales adecuados para su uso en la invención.

Los espectros de masas (MA)LDI-TOF se obtuvieron usando una estación de investigación de bioespectrometría Voyager Elite (PerSeptive Biosystems, Vestec Mass Spectrometry Products) en un modo de iones positivos; los espectros de FAB se adquirieron usando un instrumento Varian. La cromatografía analítica en capa fina se realizó en las placas de aluminio precocidas Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) o placas de aluminio precocidas óxido de aluminio 60 F₂₅₄ (Merck), las manchas se visualizaron bajo UV o según lo especificado. La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice (Merck Kieselgel 60 0,040-0,063 mm) u óxido de aluminio (óxido de aluminio Aldrich, activado, neutro, Brockmann I, malla 150, 58 Å).

Los reactivos para los experimentos biológicos, a menos que se especifique lo contrario, eran de Sigma-Aldrich. La ¹³C-glucosa era de Sigma y Reakhim (Rusia).

Los reactivos obtenidos de proveedores comerciales se usaron como se recibieron. Todos los disolventes eran de Aldrich; el ácido trifluoroacético procedía de Pierce; los disolventes de calidad HPLC procedían de Chimmed (Rusia), y se usaron sin purificación adicional. El ácido (S)-2-amino-5-cianopentanoico procedía de Genolux (Rusia). El gas de deuterio se generó por electrólisis mediante un módulo de suministro de hidrógeno de GC (salida de 607,95 kPa [6 atm], Himelectronika, Moscú, Rusia), usando agua pesada como fuente. El agua pesada (²H₂O, D₂O), NaBD₄ y Na¹³CN procedían de Reakhim (Rusia) y Gas-Oil JSC (Rusia). La DMF se destiló recientemente bajo presión reducida y se almacenó sobre tamices moleculares de 4 Å bajo nitrógeno. El DCM siempre se usó recién destilado sobre CaH₂. El THF se destiló sobre LiAlH₄.

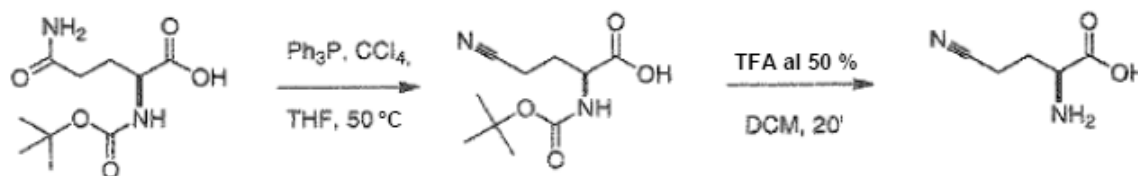
Ejemplo 1 – Ácido (S)-2-amino-4-ciano(¹³C)-butírico (un precursor para ¹³C-Arg y ¹³C,²H₂-Arg)



Se disolvieron 2,19 g (10 mmol) de N-Boc-homo-Serina (Bachem, desecada durante una noche sobre P₂O₅) en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo/dimetilformamida (1:1). Se añadieron Na¹³CN seco (Gas-Oil JSC, Rusia, 1 g, 2 eqv) y NaI (10 mg, cat), y se desgasificó la mezcla. A continuación, se añadió Me₃SiCl (2,55 ml, 2 eqv) con una jeringa a TA bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción bajo argón a 60 °C durante 6 h, controlando mediante TLC (cloroformo/metanol 2:1, visualización en vapor de yodo). Una vez finalizada, se enfrió la mezcla de reacción a TA, se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con éter dietílico (2 x 50 ml). Se lavó la fase orgánica con agua (4 x 50 ml) y salmuera (50 ml), se secó (Na₂SO₄), se decantó y se concentró al vacío, proporcionando (2,07 g, 91 %) de un aceite incoloro. La estructura del Boc-nitrilo se confirmó mediante MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con HPA como matriz. Encontrado: 229,115 (MI), 230,114 (MI + H⁺), 252,104 (MI + Na⁺). No se detectaron máximos relacionados con el material de partida.

Se llevaron a cabo la eliminación del grupo protector Boc y el tratamiento usando un protocolo de síntesis de péptidos convencional (TFA al 50 % en DCM, 30 min, TA). La estructura del nitrilo se confirmó mediante MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems) con HPA como matriz. Encontrado: 129,062 (MI), 130,070 (MI + H⁺). No se detectó ninguna señal relacionada con el material de partida.

Ejemplo 2 – Ácido (S)-2-amino-4-ciano-butírico (un precursor para ²H₂-Arg)



Se disolvieron 4,93 g (20 mmol) de N-Boc-L-Glutamina (Sigma) en 30 ml de THF anhidro, y se añadieron con agitación a una mezcla de trifetilfosfina (10,49 g, 40 mmol, Aldrich) y 40 ml de tetraclorometano anhidro. Se agitó la mezcla de reacción con calentamiento suave durante 3 h (control mediante TLC, cloroformo/metanol 2:1, visualización en vapor de yodo), se enfrió y se separó por filtración el precipitado de óxido de trifetilfosfina. Se diluyó el aceite obtenido tras la evaporación y la reevaporación con 15 ml más de THF con 30 ml de agua. Se saturó la fracción acuosa con salmuera, se lavó con éter dietílico (2 x 20 ml) y se acidificó a pH 3,5 con ácido sulfúrico. El producto se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Se secaron las fracciones orgánicas combinadas (salmuera, Na₂SO₄), se decantaron y se evaporaron, dando 3,46 g (76 %) de aceite incoloro. La estructura del Boc-nitrilo se confirmó mediante MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con HPA como matriz. Encontrado: 228,114 (MI), 229,114 (MI + H⁺), 251,103 (MI + Na⁺). No se detectaron máximos relacionados con el material de partida.

La eliminación del grupo protector de Boc y el tratamiento se llevaron a cabo usando un protocolo de síntesis de péptidos convencional (TFA al 50 % en DCM, 30 min, TA). La estructura del nitrilo se confirmó mediante MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems) con HPA como matriz. Encontrado: 128,069 (MI), 129,075 (MI + H⁺). No se detectó ninguna señal relacionada con el material de partida.

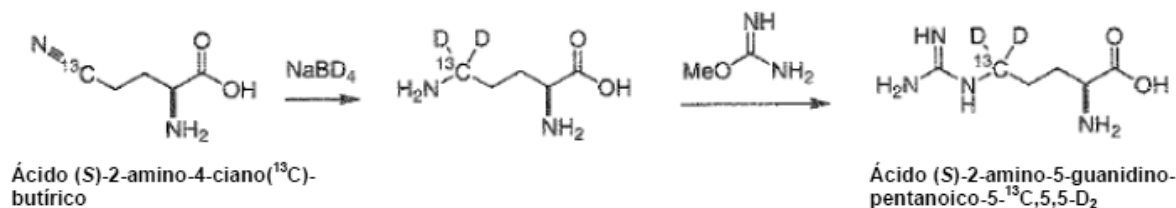
5

Ejemplo 3 – Lys-²H₂



Se disolvió ácido (S)-2-amino-5-cianopentanoico (Genolex, Rusia, 14,21 g, 100 mmol) en 100 ml de metanol. A esto, se añadió níquel de Raney, preparado a partir de 4 g de aleación (Ni al 30 %) de acuerdo con (Adkins H., *et al.*, *Org. Syntheses. Coll.* Vol. III, 1955, pág. 180), y se agitó la mezcla de reacción bajo deuterio (10132,5 kPa [100 atm]) a 90 °C durante 24 h. (TLC: *n*-butanol-piridina-ácido acético-agua: 15-10-3-12; visualización por vapor de yodo y fluorescamina). Se filtró la mezcla de reacción y se evaporó al vacío. Se volvió a disolver el producto en agua-etanol (3:1, 20 ml), seguido de la evaporación al vacío (x4) y luego se cristalizó en acetato de etilo, dando 11,55 g (78 %) del producto deuterado. La estructura de la lisina deuterada fue confirmada por MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con HPA como matriz. Encontrado: 148,088 (MI); 149,089 (MI + H⁺).

Ejemplo 4 – (5-¹³C,5,5-²H₂)-Arginina



20

Se disolvieron ácido (S)-2-amino-4-ciano(¹³C)-butírico (182 mg, 1,41 mmol) y CoCl₂ x 6H₂O (Aldrich, 670 mg, 2,82 mmol) en agua (6 ml), y se añadió NaBD₄ (Reakhim, Rusia; 540 mg, 14,1 mmol) en dos porciones durante 20 min. Se redujo el nitrilo en 30 min (control mediante TLC: *n*-butanol-piridina-ácido acético-agua: 15-10-3-12; detección de fluorescamina/UV para aminoácidos protegidos con Boc, visualización de vapor de yodo para aminoácidos no protegidos).

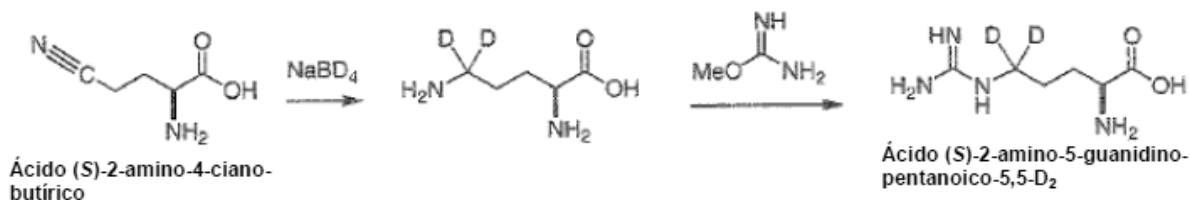
25

Se inactivó la mezcla de reacción mediante acidificación (HCl 1 M) seguida de acetona, y se purificó mediante intercambio iónico (Amberlite IR120P (H⁺), Aldrich). Se lavó la columna con agua hasta un pH neutro. A continuación, se recuperó el producto lavando la columna con NH₄OH (0,3 M) seguido de la evaporación. Se disolvió la ornitina -¹³C,²H₂ resultante (rendimiento: 158 mg, 83 %; MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con matriz HPA; encontrado: 135,071 (MI), 136,068 (MI + H⁺) en agua y se mezcló con un volumen igual de O-metilisourea 0,5 M (Kimmel, *supra*), pH 10,5, ajustada con NaOH. Tras 4-5 h, se añadió TFA al 1 % para detener la reacción (Bonetto *et al.*, *supra*). El compuesto se purificó mediante RP-HPLC (los tampones fueron A: TFA al 0,1 %/H₂O; B: TFA al 0,1 %/(MeCN al 80 %/H₂O al 20 %), B del 0 al 65 % durante 40 min, dando 140 mg (68 %); MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con matriz HPA; encontrado: 177,402 (MI), 178,655 (MI + H⁺).

30

35

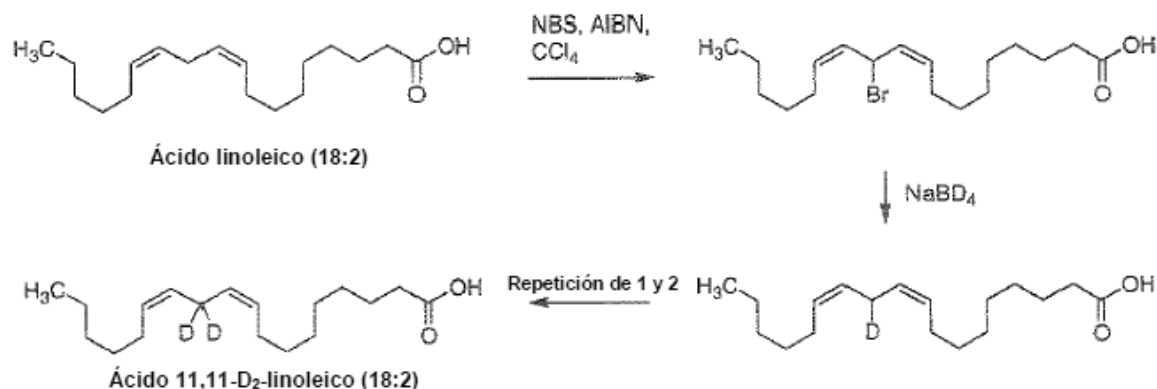
Ejemplo 5 – (5,5-²H₂)-Arginina



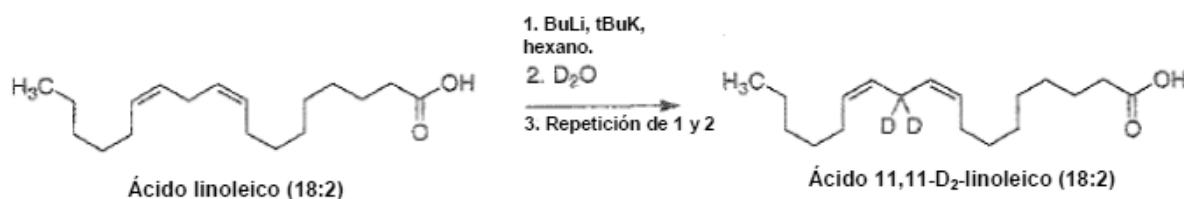
40

El compuesto del título se sintetizó usando el protocolo anterior, partiendo del ácido (S)-2-amino-4-ciano-butírico (Technohim, Rusia). MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con matriz HPA; encontrado: 176,377 (MI), 177,453 (MI + H⁺).

45

Ejemplo 6 – Ácido 11,11-di-deutero-linoleico (18:2)

- 5 Se disolvió ácido linoleico (7 g, 25 mmol, Aldrich) en 25 ml de tetracloruro de carbono secado sobre P₂O₅. Se añadieron *N*-bromosuccinimida (4,425 g, 25 mmol, desecada durante la noche sobre P₂O₅) y 0,05 g de AIBN, y se agitó la mezcla de reacción en un matraz con un condensador inverso con calentamiento suave hasta que se inició la reacción según lo manifestado por una ebullición intensa (si el reflujo es demasiado intenso, el calentamiento debe disminuir). Cuando la succinimida dejó de acumularse en la superficie, se continuó el calentamiento durante
- 10 otros 15 min (aproximadamente 1 h en total). Se enfrió la mezcla de reacción hasta la TA, y se separó el precipitado por filtración y se lavó con CCl₄ (2 x 5 ml). Se evaporaron las fracciones orgánicas combinadas, y se añadió el ácido 11-bromolinoleico obtenido gradualmente a una solución de NaBD₄ (390 mg, 10 mmol) en 30 ml de isopropanol. Después de una agitación durante la noche, se añadió lentamente una solución diluida de HCl hasta que no se produjo más gas de deuterio. Tras un tratamiento convencional, se bromó el ácido mono-deuterado y se redujo de nuevo, proporcionando un derivado di-deuterado diano (p.e. 230-231 °C/15 mm; 4,4 g; 63 %). MALDI-TOF MS: derivado de mono-bromo; encontrado: 358,202; 360,191 (doblete, aproximadamente 1:1, MI); derivado di-deuterado, encontrado: 282,251 (MI).

Ejemplo 7

- Se sintetizó ácido 11,11-D₂-linoleico (18:2) tratando el ácido linoleico con un equivalente de una mezcla de BuLi-tBuK (Sigma-Aldrich) en hexano, seguido de la inactivación con D₂O. Para mejorar los rendimientos, este procedimiento debe repetirse 3-4 veces. Se encontró que este procedimiento también genera una cantidad detectable de producto alfa-deuterado (FAB MS, iones Xe, tioglicerina: encontrado: 283,34 (72; MI + 1)⁺, 284,33 (11; derivado alfa-monodeuterado, MI + 1)⁺, 285,34 (10; derivado alfa-dideuterado, MI + 1)⁺; la naturaleza de los máximos de "284" y "285" se estableció usando MS/MS. La sustitución en la posición alfa se puede prevenir utilizando protección de orto-éster transitoria (Corey y Raju, *Tetrahedron Lett.* (1983) 24: 5571), pero esta etapa encarece la preparación.

Ejemplo 8 – 8-D-Desoxiquanosina a partir de desoxiquanosina

- Se disolvió desoxiquanosina (268 mg, 1 mmol, Aldrich) en 4 ml de D₂O. Se añadió Pd/C al 10 % (27 mg, 10 % en peso del sustrato, Aldrich), y se agitó la mezcla a 160 °C en un tubo sellado bajo atmósfera de H₂ durante 24 h.

Después de enfriar hasta la TA, se filtró la mezcla de reacción usando un filtro de membrana (Millipore Millex®-LG). Se lavó el catalizador filtrado con agua hirviendo (150 ml), y se evaporaron las fracciones acuosas combinadas al vacío, dando desoxiguanósido-*d* en forma de un sólido blanco (246 mg, 92 %). La estructura del nucleósido se confirmó mediante MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems), con HPA como matriz. Encontrado: 268,112 (M).

Ejemplo 9 - 8-D-desoxiguanosina a partir de 8-bromodesoxiguanosina



Se añadió catalizador de Pd/C al 7 %, preparado a partir de PdCl₂ como se describe en Chiriak et al., (1999) 42: 377-385, a una solución de 8-bromodesoxiguanosina (Sigma) y NaOH en agua. Se agitó la mezcla en D₂ (202,65 kPa [2 atm]) a 30 °C. Se separó el catalizador por filtración, y la mezcla de reacción se neutralizó con HCl 2 N. El procedimiento proporciona un rendimiento del aproximadamente 85-90 % del producto. Se pueden emplear otros agentes reductores, tales como NaBD₄ (véase la síntesis de ácido D,D-linoleico).

Los siguientes Ejemplos 10 a 12 ilustran la utilidad de la invención. Con el fin de establecer un intervalo de posibles sustituciones de isótopos pesados para la invención (del isótopo ligero al 100 % al isótopo pesado al 100 %, así como la protección localizada del sitio, como se muestra en las Fig. 1-4, usando compuestos como los mostrados anteriormente), y para ensayar la posible toxicidad de grandes cantidades de isótopos pesados en un organismo, se ensayó la influencia del carbono pesado (¹³C) y bloques de construcción específicamente "protegidos" de biopolímeros (componentes de ácido nucleico (nucleósidos), lípidos y aminoácidos) en la esperanza de vida de un nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Estudios previos del organismo modelo *C. elegans* han empleado casi exclusivamente el cultivo en una dieta bacteriana. Dicho cultivo introduce el metabolismo bacteriano como una preocupación secundaria en los estudios toxicológicos de fármacos y medio ambiente (pueden emplearse cepas bacterianas deficientes en metabolitos específicos para evaluar la influencia de determinados nutrientes esenciales sobre la longevidad de los nematodos). El cultivo axénico de *C. elegans* puede evitar estos problemas, sin embargo, algunos trabajos previos sugieren que el crecimiento axénico no es saludable para *C. elegans*. (Szewczyk et al., *Journal of Experimental Biology* 209, 4129-4193 (2006)). Para la presente invención, se emplearon dietas tanto de NGM como axénicas en combinación con componentes nutracéuticos enriquecidos isotópicamente.

Ejemplo 10

Se usó ¹³C₆-glucosa (99 % de enriquecimiento; Sigma) como fuente de alimentación de carbono para el cultivo de *Escherichia coli*; el control era idéntico excepto para ¹²C₆-glucosa. Se cultivaron *C. elegans* (N₂, tipo silvestre) sobre un medio convencional (peptona, sales y colesterol) sembrado con *Escherichia coli* preparado como se ha descrito anteriormente. El único componente que contenía carbono aparte de *E. coli* era ¹²C-colesterol (Sigma; un precursor hormonal que es esencial para *C. elegans*), puesto que el derivado de ¹³C correspondiente no estaba disponible. Por lo tanto, los nematodos se cultivaron en una dieta "pesada" y "ligera" (control) en el intervalo de temperaturas de 15 a 25 °C, en agrupaciones de 50-100 gusanos cada una. Los animales de ambas dietas se desarrollaron normalmente con todas las características principales muy similares.

Los datos de longevidad se analizaron usando el paquete de software Prism (software GraphPad, EE.UU.), de acuerdo con procedimientos publicados (Larsen et al., *Genetics* 139: 1567 (1995)). Se encontró que los animales de la dieta "pesada" tienen un aumento de la esperanza de vida del aproximadamente 10 % (en un experimento típico, 14 días para los animales de ¹²C frente a 15,5 días para los gusanos alimentados con ¹³C, a 25 °C).

Ejemplo 11

Se adaptó la composición básica de los medios axénicos usados de (Lu y Goetsch, *Nematologica* (1993) 39:303-311). Se prepararon componentes hidrosolubles y solubles en TEA (vitaminas y factores de crecimiento), sales, aminoácidos no esenciales, sustituyentes de ácido nucleico, otros factores de crecimiento y la fuente de energía como se describe (0,5 l de x 2). A esto, se añadió una mezcla de aminoácidos esenciales, que contenía (para 0,5 l como x 2): 0,98 g de L-(D₂)-Arg (véase anteriormente); 0,283 g de L-Hys; 1,05 g de L-(D₂)-Lys (véase más abajo); 0,184 g de L-Trp; 0,389 g de L-Met; 0,717 g de L-Thr; 1,439 g de L-Leu; 0,861 g de L-Ile; 1,02 g de L-Val y 0,623 g de L-Phe. Antes de la adición del resto de componentes, se agitó esta mezcla a 55 °C durante 4 horas hasta que se

formó una solución transparente, y después se enfrió hasta la temperatura ambiente.

- 5 Se cultivaron *C. elegans* (N₂, tipo silvestre) sobre un medio. Para el experimento de control, los nematodos se cultivaron en un medio preparado como anteriormente, pero que contenía L-Arg y L-Lys convencional en lugar de los análogos deuterados, en el intervalo de temperaturas de 15 a 25 °C, en agrupaciones de 50-100 gusanos cada una. Los datos de longevidad se analizaron usando el software Prism, como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 12

- 10 Se enriqueció una dieta de ¹²C-NGM con 5,5-di-deutero-arginina y 6,6-di-deutero-lisina, ácido 11,11-di-deutero-linoleico (18:2) y 8-D-desoxiguanosina. Se cultivaron *C. elegans* sobre un medio convencional (peptona, sales y colesterol) sembrado con *Escherichia coli* preparado como se ha descrito anteriormente, a lo que se añadieron derivados “reforzados” con deuterio (véase lo expuesto anteriormente), a una concentración total de 1 g/l de cada compuesto deuterado. De este modo, los nematodos se cultivaron sobre una dieta “pesada” y “ligera” (control –
15 mediante el que se usaron L-arginina, L-lisina, ácido linoleico (18:2) y desoxiguanosina no deuterados en lugar de análogos deuterados a concentraciones de 1 g/l) en el intervalo de temperaturas de 15 a 25 °C, en agrupaciones de 50 a 100 gusanos cada una. Los datos de longevidad se analizaron usando el paquete de software Prism, como se describe en el Ejemplo 10.

REIVINDICACIONES

1. Una composición nutritiva para su uso en un método de aumento de la resistencia a procesos perjudiciales o degradantes mediados por especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno o radiación, que comprende:

un nutriente esencial, que es un ácido graso, un ácido nucleico, un nucleótido, un aminoácido o un péptido, en el que al menos un H intercambiable es ^2H o al menos un átomo de C es ^{13}C ; en el que el nutriente esencial se sintetiza químicamente y se modifica isotópicamente;

en el que el nutriente esencial se incorpora en un constituyente corporal a un organismo cuando es ingerido por el organismo; y

en el que el organismo es un ser humano o un animal.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, siendo esta una composición inyectable.

3. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial es o comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Val, Trp, Thr, Ile, Met, His, Leu, Lys y Arg.

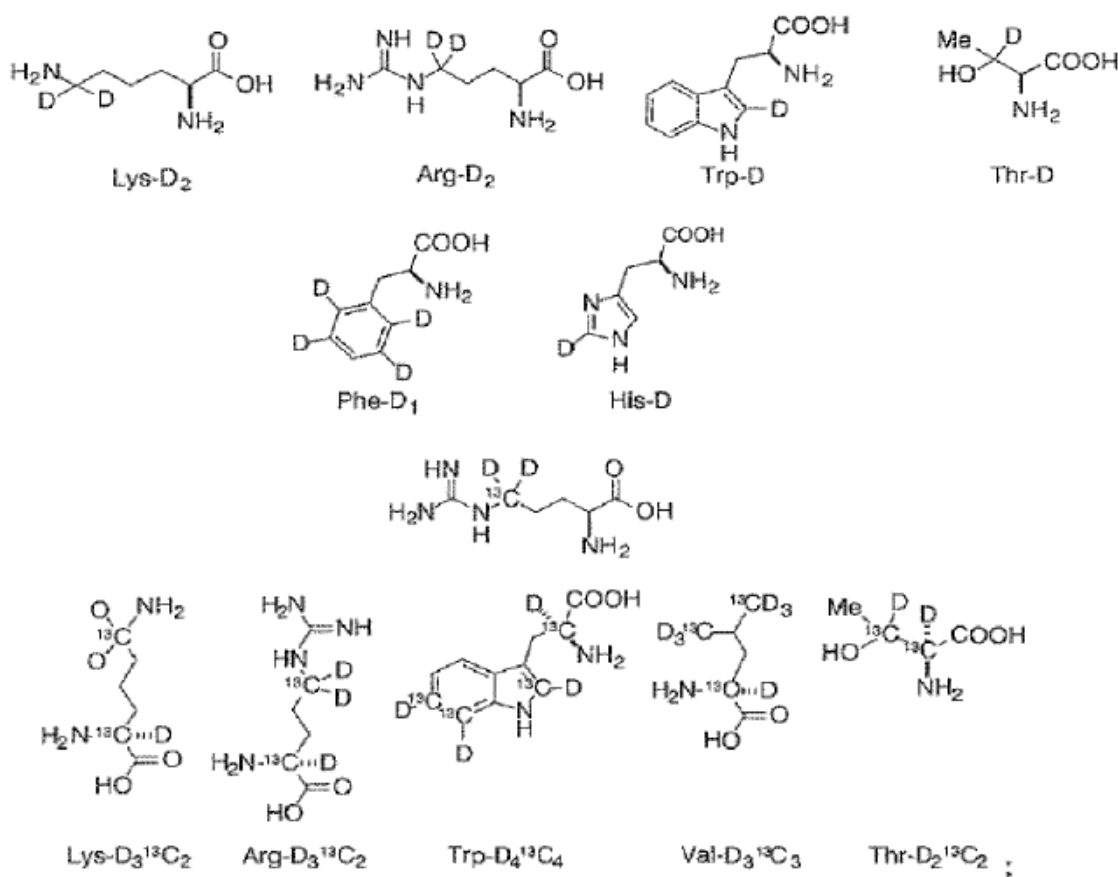
4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial es ácido graso ω -3 u ω -6.

5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial es ácido 11,11- D_2 -linoleico.

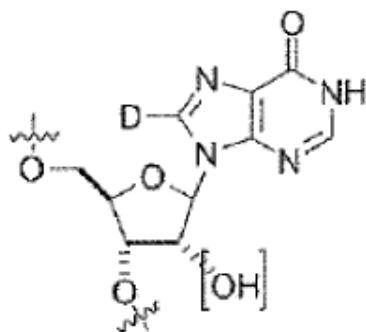
6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ^2H reemplaza a un hidrógeno sensible a la oxidación del nutriente esencial.

7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial es 2,6-diaminohexanoico-6,6- D_2 .

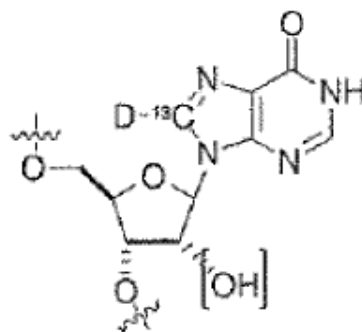
8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:



una base de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:



[d]G-D



[d]G-D, ¹³C

o

- 5 un ácido graso es un ácido graso ω -3 y ω -6 que tiene una sustitución parcial o total de deuterio.
9. La composición para el uso de la reivindicación 6, en la que la oxidación es carbonilación enzimática.
10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para ralentizar el envejecimiento.
11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el nutriente esencial no es degradado por enzimas de la ruta P450.
12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de una píldora.

15

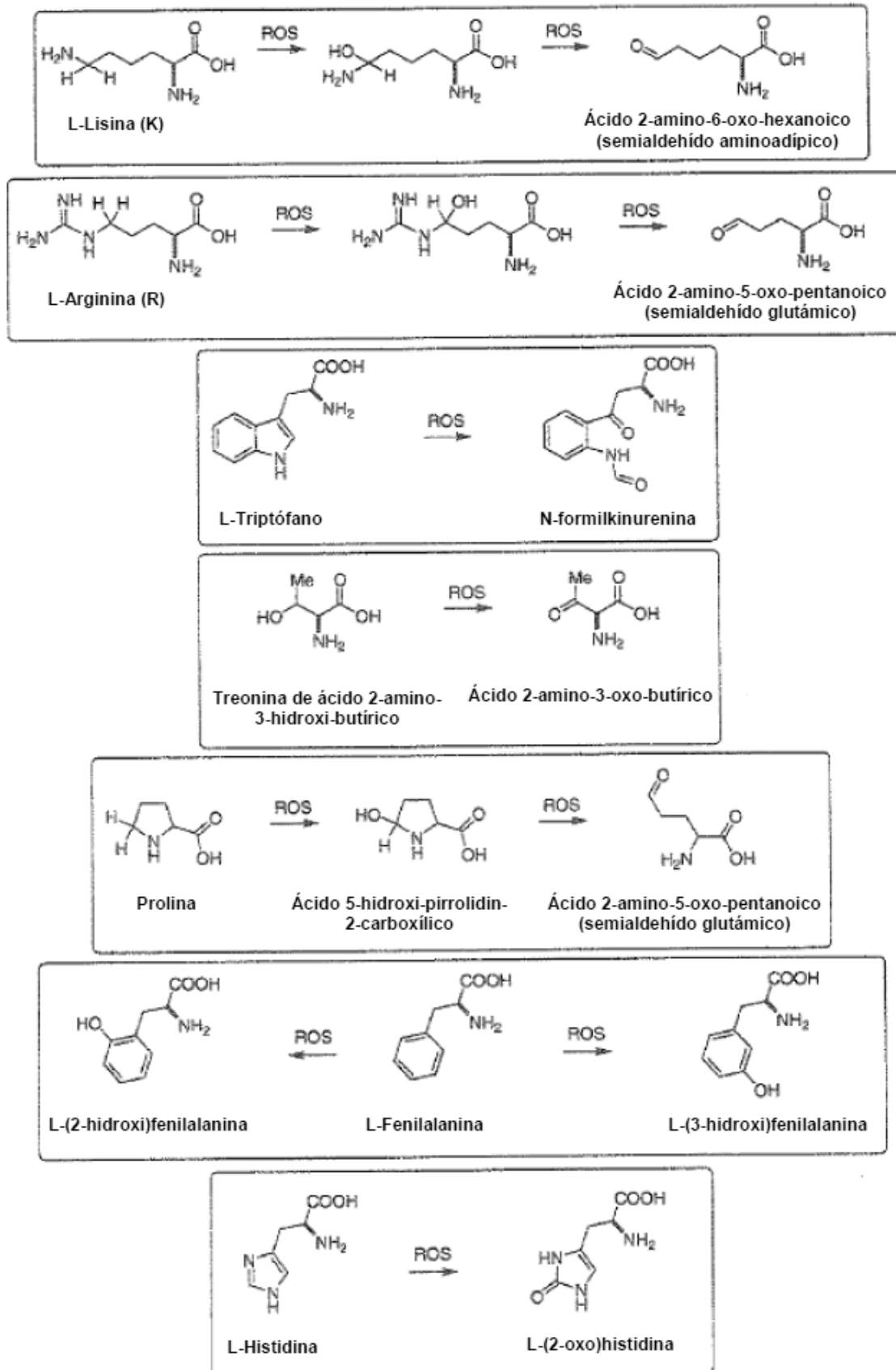


Figura 1

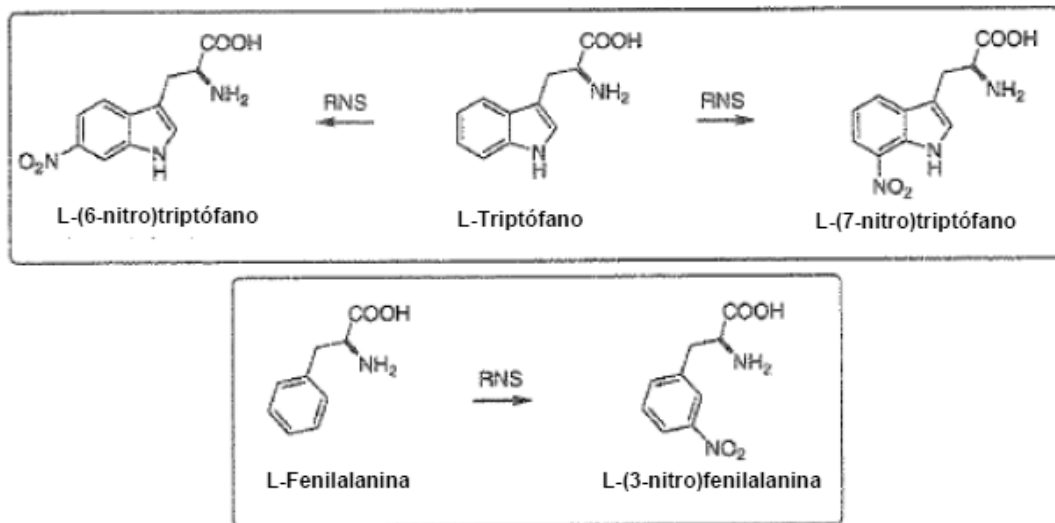


Figura 2

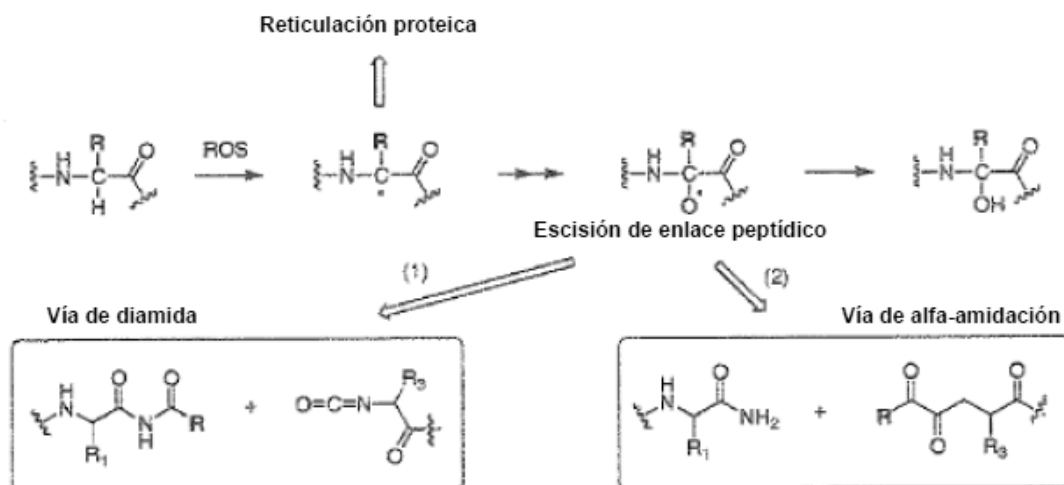


Figura 3

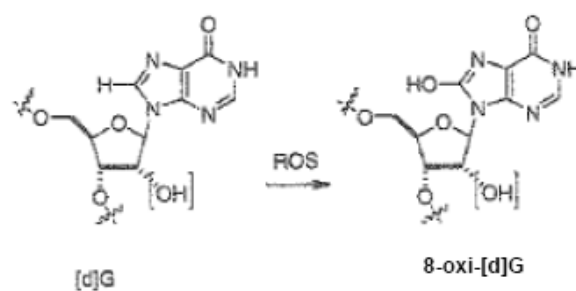


Figura 4