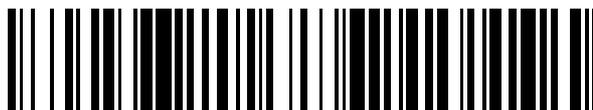


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 413**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/06** (2006.01)  
**C07C 69/675** (2006.01)  
**C07C 51/09** (2006.01)  
**C07H 13/04** (2006.01)  
**C12P 7/26** (2006.01)  
**C12P 7/62** (2006.01)  
**A61K 31/22** (2006.01)  
**A61K 31/765** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2004 PCT/US2004/018016**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2004 WO04108740**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2004 E 04754584 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 1648952**

54 Título: **Suplementos nutricionales y composiciones terapéuticas que comprenden derivados de (R)-3-hidroxibutirato**

30 Prioridad:

**03.06.2003 US 475848 P**  
**15.12.2003 US 529873 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.05.2018**

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%) OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, SUITE 325, 6011 EXECUTIVE BOULEVARD ROCKVILLE, MD 20852-3804, US y OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VEECH, RICHARD, L.;**  
**KING, MICHAEL, T. y**  
**CLARKE, KIERAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 670 413 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

Suplementos nutricionales y composiciones terapéuticas que comprenden derivados de (R)-3-hidroxiacetato

**Campo**

5 La divulgación se refiere a compuestos y composiciones que contienen derivados de (R)-3-hidroxiacetato efectivos para elevar las concentraciones en sangre de cuerpos cetónicos y para uso como suplementos nutricionales o en el tratamiento de afecciones médicas.

**Antecedentes**

10 Durante los períodos de privación de carbohidratos, el cuerpo utiliza la energía obtenida del metabolismo de las grasas. Durante el metabolismo de las grasas, las grasas se convierten en acetoacetato y ácido 3-hidroxiacetato, que se conocen como cuerpos cetónicos, y grandes cantidades de estas sustancias se acumulan en la sangre. Esta condición, que se conoce como cetosis, comúnmente ocurre durante la inanición. Cuando las concentraciones de cuerpos cetónicos en la sangre se elevan a los niveles que se encuentran en la inanición prolongada, proporcionan la mayor fuente de energía para el cerebro.

15 Se ha demostrado que la cetosis leve, en la que los cuerpos cetónicos son utilizados por el cuerpo como fuente de energía, tiene efectos terapéuticos en varios estados de enfermedad. Por ejemplo, la epilepsia refractaria se trató inicialmente con éxito por ayuno prolongado. En vista de este resultado, Russell Wilder, de la Clínica Mayo, propuso una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos, denominada "dieta cetogénica", para inducir cetosis y lograr los efectos beneficiosos de la inanición para tratar la epilepsia. La dieta cetogénica generalmente incluye cuatro partes de grasa por una parte de proteína con una ingesta mínima de carbohidratos.

20 El éxito de la dieta cetogénica en el tratamiento de la epilepsia se deriva de la capacidad del cerebro para metabolizar cuerpos cetónicos. Durante el ayuno prolongado, los ácidos grasos libres se convierten en el hígado a (R)-3-hidroxiacetato y acetoacetato para proporcionar energía al cerebro y preservar la masa muscular de la conversión en glucosa. En tales condiciones de ayuno, la concentración total de cetona en sangre se mantiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7 mM. Desafortunadamente, la capacidad del cerebro para usar cuerpos cetónicos no se ha explotado terapéuticamente más allá del uso de la dieta cetogénica para tratar la epilepsia. La dieta cetogénica tiene muchos inconvenientes, algunos de los cuales incluyen niveles elevados de triglicéridos, niveles de colesterol o ambos causados por la dieta alta en grasas. Además, la proporción de 4 a 1 de grasa a proteína es desagradable para muchos sujetos.

30 Se ha sugerido la inducción de cetosis leve como un posible tratamiento para varias enfermedades. Por ejemplo, la cetosis leve imita los efectos agudos de la insulina y, de este modo, puede ser útil para tratar diabéticos, particularmente diabéticos de tipo I resistentes a la insulina (Kashiwaya et al. Am. J. Cardiol. 1997, 80, 50A-64A).

35 Además, dado que el metabolismo de los cuerpos cetónicos produce un aumento del 28 % en el trabajo hidráulico producido por un corazón perfundido con cuerpo cetónico por unidad de oxígeno en proporción con un corazón perfundido con glucosa, se ha sugerido que la inducción de cetosis podría proporcionar algún beneficio cardiovascular en condiciones de hipoxia (Neech, R.L. The Therapeutic Implications of Ketone Bodies. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, en prensa).

40 El tratamiento de tejidos humanos con (R)-3-hidroxiacetato da como resultado varios efectos terapéuticos y nutricionales beneficiosos. Por ejemplo, la eficacia cardíaca y la eficacia metabólica del cerebro se aumentan y los efectos de los trastornos neurodegenerativos, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, se reducen. Además, (R)-3-hidroxiacetato puede servir como una fuente de energía fisiológica alternativa. De hecho, Cahill y sus colegas establecieron que más del 60 % de las necesidades de energía metabólica del cerebro pueden ser suplidas por cuerpos cetónicos como un sustituto de la glucosa. (Owen et al. J. Clin. Invest. 1967, 46, 1589-1595).

45 Además de ser un único sustrato metabólico de alta energía, el (R)-3-hidroxiacetato tiene aplicaciones terapéuticas potenciales que incluyen el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Estos usos potenciales aún no se han realizado debido a que no se ha desarrollado una forma apropiada para administrar (R)-3-hidroxiacetato o un precursor metabólico del mismo.

50 En teoría, el (R)-3-hidroxiacetato y el acetoacetato se podrían administrar directamente para alcanzar niveles elevados de cuerpos cetónicos en un sujeto. Sin embargo, la administración directa de estos compuestos es poco práctica y peligrosa. Por ejemplo, la administración directa de ya sea el (R)-3-hidroxiacetato o el acetoacetato en su forma ácida puede dar como resultado una acidosis significativa después de la rápida absorción desde el tracto gastrointestinal. La administración de la sal de sodio de estos compuestos también es inadecuada debido a una sobrecarga de sodio potencialmente peligrosa que acompañaría la administración de cantidades terapéuticamente relevantes de estos compuestos (Desrochers et al. J. Nutr. Biochem. 1995, 6, 111-118). Para eludir estos problemas, los investigadores han intentado administrar oligómeros de (R)-3-hidroxiacetato, reduciendo de ese modo la

proporción de sal a equivalentes de (R)-3-hidroxi-*butirato* (Patente de los Estados Unidos No. 6,136,862 de Hiraide et al).

5 Los derivados (R)-3-hidroxi-*butirato* anteriores para uso biológico generalmente contienen mezclas de diferentes productos. Por ejemplo, la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos publicada No. de serie 09/359,086 de Martin et al. (Publicación No. 20020013339, en lo que sigue "la publicación 339") describe mezclas de oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* definidos por pesos moleculares "aproximados". Los componentes de tales mezclas pueden tener efectos indeseables, incluso cuando uno o más componentes tienen un efecto deseado. Esta publicación divulga que alimentar a las ratas con una dieta que incluye mezclas de oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* que tienen un peso molecular promedio de 200 gramos por mol, elevaron las concentraciones en sangre de (R)-3-hidroxi-*butirato* a 0,65 mM y las concentraciones de acetoacetato a 0,05 mM. Una dieta similar que incluye oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* que tienen un peso molecular promedio mayor (1000 gramos por mol) solo eleva las concentraciones en sangre de (R)-3-hidroxi-*butirato* a 0,15 mM y las concentraciones de acetoacetato a 0,04 mM. Estos resultados indican que los oligómeros de mayor peso molecular divulgados en esta publicación no aumentan las concentraciones de cuerpos cetónicos tan eficazmente como los oligómeros de peso molecular más bajo.

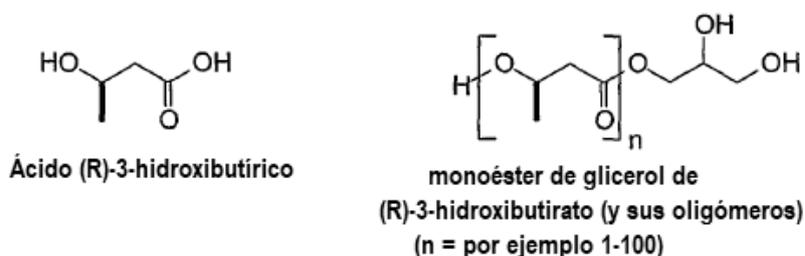
15 Otro enfoque para elevar las concentraciones de cuerpos cetónicos es administrar un precursor metabólico a un cuerpo cetónico. Un ejemplo de este enfoque lo divulga Neech en la Solicitud de Patente PCT publicada No. US99/21015. Esta publicación divulga un trímero cíclico de (R)-3-hidroxi-*butirato* (tríolido) como un precursor metabólico para (R)-3-hidroxi-*butirato*. Sin embargo, el tríolido no es hidrolizado eficientemente por las enzimas gástricas y, de este modo, solo se absorbe poco, lo que limita su utilidad como un precursor de (R)-3-hidroxi-*butirato*.  
 20 Los inconvenientes adicionales están asociados con otros precursores metabólicos propuestos para cuerpos cetónicos. Por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,380,244 de Martin et al. (la patente '244), discute el uso del 1,3-butanodiol racémico como un precursor metabólico del 3-hidroxi-*butirato* racémico. La patente '244 enseña, en la columna 2, línea 58, que "el diol no es adecuado para su uso como un nutriente intravenoso". Además, el componente inactivo de las mezclas racémicas puede causar efectos secundarios dañinos. Por ejemplo, los isómeros no fisiológicos, tales como (S)-3-hidroxi-*butirato* pueden actuar como inhibidores competitivos del transporte de cuerpos cetónicos. El transporte cuerpos cetónicos a través de la barrera hematoencefálica es un factor limitante del metabolismo de cuerpos cetónicos en el cerebro (Hawkins, R.A. et al. In Cerebral Metabolism and Neural Function; Passoneau, J.N., Hawkins, R.A., Lust, W.D., Welsh, F.A., Eds.; Williams & Wilkins, Baltimore, 1980, pp. 255-263), y, de este modo, debe evitarse la contaminación con isómeros no fisiológicos.

30 **Sumario**

En un primer aspecto, la invención proporciona compuestos para uso en tratamientos terapéuticos como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los compuestos divulgados sirven como precursores de cuerpos cetónicos, tales como acetoacetato y (R)-3-hidroxi-*butirato*, y de este modo producen elevadas concentraciones en sangre de cuerpos cetónicos cuando se administran a un sujeto.

35 Los derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato* comprenden (R)-3-hidroxi-*butil*-(R)-3-hidroxi-*butirato* y 2,3-dihidroxi-*propil*-(R)-3-hidroxi-*butirato*.

Otros ésteres que comprenden (R)-3-hidroxi-*butirato* y oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* también se pueden incluir con (R)-3-hidroxi-*butil*-(R)-3-hidroxi-*butirato* y 2,3-dihidroxi-*propil*-(R)-3-hidroxi-*butirato*. Los compuestos de éster divulgados adicionalmente incluyen ésteres derivados de alcoholes, tales como *altrosa*, *arabinosa*, *dextrosa*, *eritrosa*, *fructosa*, *galactosa*, *glucosa*, *glicerol*, *gulosa*, *idosa*, *lactosa*, *lixosa*, *manosa*, *ribitol*, *ribosa*, *ribulosa*, *sacarosa*, *talosa*, *treosa*, *xilitol*, *xilosa*, *galactosamina*, *glucosamina*, *manosamina*, *N-acetilglucosamina*, *manitol*, *sorbitol*, *treitol*, (S)-1,2-*propanodiol* y (R)-1,3-*butanodiol*. En la figura 1 se ilustran las estructuras de ácido (R)-3-hidroxi-*butírico* y un éster de ejemplo del mismo (un monoéster de glicerol).



45 Se divulgan en este documento nuevos procedimientos de producción de derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato*, particularmente ésteres de (R)-3-hidroxi-*butirato* y sus oligómeros, tales como el monoéster de glicerol ilustrado anteriormente. Los procedimientos de ejemplo emplean reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, un procedimiento usa polihidroxi-*butirato* despolimerasa para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato*. Otra reacción enzimática incluye la esterificación catalizada por lipasa en dióxido de carbono supercrítico. La esterificación

catalizada por lipasa puede permitir reacciones selectivas, esterificación regioselectiva y estereoselectiva. El uso de dióxido de carbono supercrítico supera las desventajas asociadas con los procedimientos de fabricación anteriores derivados de (R)-3-hidroxi-butirato mediante la sustitución de dióxido de carbono ambiental y fisiológicamente benigno por solventes orgánicos peligrosos.

5 Los procedimientos de ejemplo adicionales incluyen un procedimiento de preparación de (R)-3-hidroxi-butirato y oligómeros de los mismos a partir del ácido poli-(R)-3-hidroxi-butírico. En un aspecto del procedimiento, el ácido poli-(R)-3-hidroxi-butírico sufre una despolimerización catalizada por ácido. Por lo general, la reacción de despolimerización se lleva a cabo en dióxido de carbono supercrítico.

10 En otra realización, se producen (R)-3-hidroxi-butirato y oligómeros de los mismos a través de la despolimerización enzimática de ácido poli-(R)-3-hidroxi-butírico. En ciertos aspectos de esta realización, se usa una despolimerasa en dióxido de carbono supercrítico de producción de un producto que contiene (R)-3-hidroxi-butirato deseado.

15 Los derivados de (R)-3-hidroxi-butirato divulgados se pueden administrar para proporcionar y mantener una concentración en el cuerpo cetónico en sangre suficiente para superar o mejorar trastornos metabólicos, tales como deficiencias o resistencia a la insulina. Además, debido a que los derivados de (R)-3-hidroxi-butirato descritos se pueden usar para aumentar la eficacia metabólica, se pueden administrar por vía oral como un suplemento nutricional o dietético para mejorar el rendimiento físico. De hecho, debido a que los derivados de (R)-3-hidroxi-butirato divulgados pueden proporcionar una porción sustancial de la ingesta calórica de un sujeto, los derivados se formulan ventajosamente en un alimento o bebida. Alternativamente, las composiciones se pueden administrar por vía parenteral.

## 20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico de la concentración en sangre de cuerpos cetónicos frente al tiempo en ratas alimentadas con 1,8 gramos de un derivado de (R)-3-hidroxi-butirato por kilogramo de peso corporal.

### **Descripción detallada**

25 La divulgación describe composiciones para inducir cetosis elevando las concentraciones de cuerpos cetónicos en la sangre. Las presentes composiciones se pueden usar terapéuticamente para tratar varias enfermedades y también se pueden usar como suplementos nutricionales para aumentar la eficacia metabólica.

#### I. Términos

Las siguientes explicaciones de los términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación.

30 "Derivado" se refiere a un compuesto o porción de un compuesto que se deriva de o es teóricamente derivable de un compuesto original.

El término "grupo hidroxilo" está representado por la fórmula -OH.

35 El término "grupo alcoxi" se representa por la fórmula -OR, donde R puede ser un grupo alquilo, que incluye un grupo alquilo inferior, opcionalmente sustituido con un grupo alqueno, alquino, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado o heterocicloalquilo, como se define a continuación.

El término "éster" se representa por la fórmula -OC(O)R, donde R puede ser un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo, aralquilo, cicloalquilo, alquilo halogenado o heterocicloalquilo, como se define a continuación.

40 El término "grupo alquilo" se define como un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Un grupo "alquilo inferior" es un hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

El término "grupo alqueno" se define como un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono y fórmula estructural que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.

45 El término "grupo alquino" se define como un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono y una fórmula estructural que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono.

El término "grupo alquilo halogenado" se define como un grupo alquilo como se definió anteriormente con uno o más átomos de hidrógeno presentes en estos grupos sustituidos con un halógeno (F, Cl, Br, I).

5 El término "grupo cicloalquilo" se define como un anillo basado en carbono no aromático compuesto de al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. El término "grupo heterocicloalquilo" es un grupo cicloalquilo como se definió anteriormente donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye con un heteroátomo tal como, pero no limitado a, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo.

El término "grupo alifático" se define como que incluye grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, alquilo halogenado y cicloalquilo como se definió anteriormente. Un "grupo alifático inferior" es un grupo alifático que contiene desde 1 a 10 átomos de carbono.

10 El término "grupo arilo" se define como cualquier grupo aromático basado en carbono que incluye, pero no se limita a, benceno, naftaleno, etc. El término "aromático" también incluye "grupo heteroarilo", que se define como un grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Los ejemplos de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no limitado a, alquilo, alquinilo, alqueniilo, arilo, haluro, nitro, amino, éster, cetona, aldehído, hidroxilo, ácido carboxílico o alcoxilo, o el grupo arilo puede ser no sustituido.

15 El término "aralquilo" se define como un grupo arilo que tiene un grupo alquilo, como se definió anteriormente, unido al grupo arilo. Un ejemplo de un grupo aralquilo es un grupo bencilo.

"Esterificación" se refiere a la reacción de un alcohol con un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico para dar un éster.

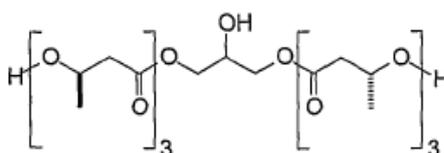
"Transesterificación" se refiere a la reacción de un éster con un alcohol para formar un nuevo compuesto de éster.

20 El "tratamiento" de una enfermedad o trastorno se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica o inhibe la aparición, el progreso o el desarrollo completo de la enfermedad.

25 El término "3-hidroxitirato" se usa de forma intercambiable con el término "ácido 3-hidroxitirato". A menos que se especifique lo contrario, se entiende que los términos "β-hidroxitirato" o "ácido β-hidroxitirato" también se pueden usar para referirse a este compuesto.

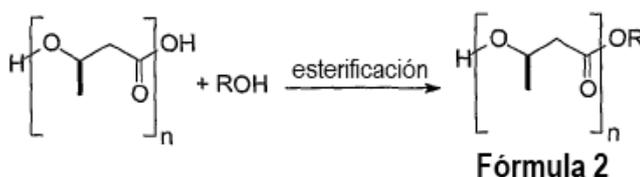
## II. Composiciones

30 Las composiciones pueden incluir derivados de (R)-3-hidroxitirato, tales como oligómeros de (R)-3-hidroxitirato. Los compuestos y composiciones particulares divulgados en este documento incluyen derivados de éster de oligómeros de (R)-3-hidroxitirato. Por ejemplo, uno de tales derivados de éster particulares divulgados en este documento tiene la fórmula 1. La fórmula se puede producir esterificando el alcohol polihidroxi glicerol con dos trímeros de (R)-3-hidroxitirato.



Fórmula 1

Más generalmente, los compuestos particulares divulgados en este documento tienen estructuras según la fórmula 2. El esquema 1 también ilustra que tales compuestos se producen por lo general por esterificación.



Fórmula 2

ESQUEMA 1

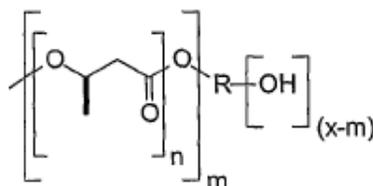
35 Con referencia al Esquema 1 y a la fórmula 2, n puede ser cualquier número entero, y por lo general es un número entero desde 1 a aproximadamente 100. Más por lo general, n es un número entero desde 1 a aproximadamente 10. Una ventaja de las composiciones divulgadas en este documento es que incluyen compuestos que tienen

estructuras definidas. Por ejemplo, los compuestos divulgados en este documento, tales como los compuestos según la fórmula 2, se pueden preparar de manera que los compuestos en una composición dada tengan el mismo número de derivados (R)-3-hidroxi-butarato (n); tales compuestos se denominan compuestos "definidos".

5 Con referencia a la fórmula 2, R puede ser cualquier grupo alquilo que, con el átomo de oxígeno del éster, constituya un grupo alcoxi compatible fisiológicamente tras la hidrólisis del éster. El término "fisiológicamente compatible" se refiere a alcoholes que son sustancialmente no tóxicos cuando se liberan in vivo a través de reacciones de escisión de esterasas o ésteres. Ciertos alcoholes son fisiológicamente compatibles a baja concentración, pero pueden provocar reacciones indeseadas si están presentes a una concentración alta. Por ejemplo, el etanol es fisiológicamente compatible a bajas concentraciones, pero no a altas concentraciones. De este modo, los derivados de éster etílico de (R)-3-hidroxi-butarato son útiles a las dosis más bajas divulgadas en este documento, pero pueden tener efectos no deseados a las dosificaciones más altas.

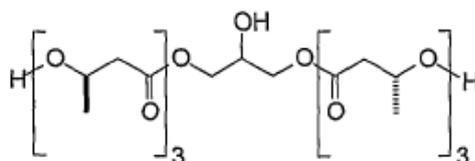
10 Los alcoholes fisiológicamente compatibles apropiados para formar ésteres con (R)-3-hidroxi-butarato y sus derivados incluyen alcoholes monohídricos y polihídricos. Los ésteres de alcoholes polihídricos entregan una densidad más alta de equivalentes de (R)-3-hidroxi-butarato por equivalente de derivado de (R)-3-hidroxi-butarato usando oligómeros de (R)-3-hidroxi-butarato más cortos. Los oligómeros más cortos generalmente se hidrolizan más fácilmente para dar concentraciones elevadas de (R)-3-hidroxi-butarato en la sangre. Ejemplos de alcoholes polihídricos apropiados para preparar tales ésteres incluyen carbohidratos y derivados de carbohidratos, tales como alcoholes de carbohidratos, ejemplos de carbohidratos incluyen, sin limitación, altrosa, arabinosa, dextrosa, eritrosa, fructosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, lactosa, lixosa, manosa, ribosa, sacarosa, talosa, treosa, xilosa y similares. Ejemplos adicionales de carbohidratos útiles para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-butarato incluyen derivados amino, tales como galactosamina, glucosamina y manosamina, incluyendo derivados de N-acetilo, tales como N-acetilglucosamina y similares. Los ejemplos de carbohidratos también incluyen derivados de carbohidratos, tales como alquil glucósidos. Los ejemplos de alcoholes de carbohidrato incluyen, sin limitación, glicerol, manitol, ribitol, sorbitol, treitol, xilitol y similares. Los enantiómeros de los carbohidratos enumerados anteriormente y los alcoholes de carbohidrato también se pueden usar para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-butarato según la fórmula 2.

La fórmula 3 representa (R)-3-hidroxi-butarato y sus oligómeros esterificados con alcoholes monohídricos o polihídricos para producir nuevos derivados de (R)-3-hidroxi-butarato.



Fórmula 3

30 Los alcoholes polihídricos se pueden acilar en uno o más grupos hidroxilo para producir los compuestos según la fórmula 3. Por ejemplo, con referencia a la fórmula 3, x representa el número de grupos hidroxilo presentes en el alcohol polihídrico (antes de la esterificación), m representa el número de oligómeros de (R)-3-hidroxi-butarato unidos a R a través de enlaces éster y n representa el número de residuos (R)-3-hidroxi-butarato por oligómero. De este modo, x-m es igual al número de grupos hidroxilo que quedan, si los hay, después de la esterificación. Por ejemplo, si R es un alcohol que tiene 5 grupos hidroxilo y tres están esterificados con (R)-3-hidroxi-butarato (haciendo n igual a 1), x es 5, m es 3 y x-m es igual a 2. El compuesto de fórmula 1 es otro ejemplo específico de un compuesto descrito por la fórmula 3, en la que n es 3, m es 2 y x es 3.



Fórmula 1

40 Con referencia continuada a la fórmula 3, R se puede derivar de un alcohol polihídrico que contiene cualquier número (x) de grupos hidroxilo, aunque por lo general x es menor que aproximadamente 100. R se puede derivar, por ejemplo, de un grupo polisacárido. Tales grupos tienen por lo general de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 grupos hidroxilo. R puede ser un monosacárido que tiene 4 o 5 grupos hidroxilo. De este modo, R puede tener desde 1 a 5 grupos (R)-3-hidroxi-butarato u oligómeros de (R)-3-hidroxi-butarato unidos mediante

enlaces éster. R puede contener más de 5 hidroxilos, por ejemplo, cuando R es un derivado de oligosacárido. R puede ser un diol (x igual a 2), tal como 1,2-propanodiol o un triol (x igual a 3), tal como 1,3-butanodiol, glicerol o treitol.

5 Con referencia continua a la fórmula 3, m puede ser cualquier número entero que sea menor que o igual a x. De este modo, m por lo general es un número entero desde 1 a aproximadamente 100, y más por lo general m varía desde 2 a aproximadamente 20. Los ejemplos particulares de los compuestos divulgados tienen valores de m desde 1 a aproximadamente 8. De forma similar, n puede ser cualquier número entero, y por lo general es entero desde 1 a aproximadamente 100. Más por lo general n es un número entero desde 1 a aproximadamente 20. En particular, los compuestos n están entre 1 y 10.

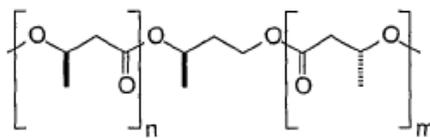
10 Los compuestos divulgados de ejemplo según la fórmula 3 se describen en la tabla 1, dada a continuación.

Tabla 1

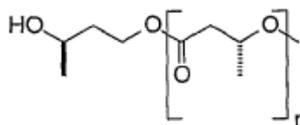
Alcohol/número de hidroxilos (x)	Residuos de (R)-3-hidroxi- <i>t</i> butirato (n)	enlaces éster (m)
(R) 1,3-butanodiol/2	3	1
(R) 1,3-butanodiol/2	3	2
glicerol/3	3	2
glicerol/3	3	3
glucosa/5	1	5
galactosa/5	5	1
galactosa/5	3	4
manitol/6	2	6
sacarosa/7	1	7
sacarosa/7	3	7
sacarosa/7	6	1

15 En la fórmula 3 y en la tabla 1, cada oligómero de (R)-3-hidroxi-*t*butirato se ha identificado que contiene el mismo número de residuos de (R)-3-hidroxi-*t*butirato, sin embargo, esto no es necesario. Por ejemplo, un alcohol polihídrico se puede esterificar con dos o más oligómeros de (R)-3-hidroxi-*t*butirato que contienen diferentes números de residuos de (R)-3-hidroxi-*t*butirato. Algunos ejemplos de tales compuestos tienen la fórmula 4, en la que m y n no son iguales.

20 Con referencia continua a la fórmula 4, el alcohol polihídrico usado para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-*t*butirato según esta fórmula es (R)-1,3-butanodiol. Este diol se puede acilar selectivamente con (R)-3-hidroxi-*t*butirato y oligómeros de los mismos en uno o ambos grupos hidroxilo. De este modo, los ejemplos de compuestos descritos incluyen compuestos según las fórmulas 4 y 5, que se muestran a continuación. Como se indicó anteriormente, n y m pueden ser iguales o diferentes y tienen los valores numéricos establecidos con respecto a la fórmula 3.



Fórmula 4



Fórmula 5

Debido a que los derivados de (R)-3-hidroxi butirato según las fórmulas 4 y 5 liberan (R)-1,3-butanodiol in vivo, que se oxida a (R)-3-hidroxi butirato y acetoacetato en el hígado, (R)-1,3-butanodiol es un alcohol fisiológicamente compatible particularmente útil para preparar derivados de (R)-3-hidroxi butirato.

- 5 Proporcionar cuerpos cetónicos como ésteres de (R)-3-hidroxi butirato ofrece varias ventajas sobre las composiciones conocidas anteriores. Por ejemplo, los presentes ésteres no están contaminados con cantidades significativas de un estereoisómero no fisiológico. De este modo, los presentes compuestos no provocan efectos secundarios indeseados ni sufren una inhibición competitiva por el estereoisómero no fisiológico. Las composiciones pueden incluir mezclas de derivados de (R)-3-hidroxi butirato. Por ejemplo, dos o más derivados de éster de (R)-3-hidroxi butirato según las fórmulas 2, 3 o 4 se pueden formular y administrar en la misma composición. Por lo general, estos derivados diferentes tienen diferentes grupos R, de modo que se mitigan los posibles efectos secundarios indeseados de la liberación de alcohol in vivo. Tales derivados de (R)-3-hidroxi butirato que incluyen diferentes grupos R se pueden administrar en cualquier proporción útil. Por ejemplo, cuando se administran dos derivados de (R)-3-hidroxi butirato diferentes, se pueden administrar en cantidades iguales o en cantidades diferentes, tales como en una proporción desde aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1. A modo de ejemplo, otras proporciones útiles incluyen proporciones de 2:1, 3:1 y 4:1 de diferentes derivados de (R)-3-hidroxi butirato.

De manera similar, se pueden formular diferentes derivados de (R)-3-hidroxi butirato que tienen diferentes grupos (R)-3-hidroxi butirato oligoméricos en la misma composición. Tales formulaciones son útiles para adaptar la velocidad de liberación de (R)-3-hidroxi butirato debido a que los oligómeros que tienen longitudes diferentes tienden a exhibir velocidades de liberación diferentes, exhibiendo los oligómeros más largos generalmente velocidades de liberación más lentas.

Las composiciones divulgadas en este documento son por lo general no tóxicas, estériles y libres de pirógenos, particularmente libres de endotoxinas. Las composiciones se pueden evaluar en cuanto a su pureza determinando sus propiedades físicas, como es conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden analizar el color, el pH, la esterilidad, la presencia de endotoxinas, la toxicidad y la estabilidad. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la espectrometría de masas y la RMN, particularmente la RMN de protón, son técnicas particularmente útiles para evaluar la pureza. Las composiciones se pueden formular en una forma de sabor agradable para su administración como un aditivo o suplemento alimenticio. Tales formas de sabor agradable son por lo general exentas de olor o están enmascaradas o recubiertas, como es conocido para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica. Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir componentes adicionales, tales como portadores. Los portadores farmacéuticamente aceptables útiles para estas formulaciones son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15<sup>a</sup> Edición (1975), describe composiciones y formulaciones apropiadas para la administración farmacéutica de los compuestos divulgados en este documento.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente contienen fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes reguladores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Cuando los compuestos divulgados se administran por vía oral, particularmente cuando se administran como un suplemento nutricional, los compuestos se pueden mezclar con una base de producto alimenticio. Tales mezclas pueden estar en forma de una emulsión o una mezcla con alimentos sólidos. Por ejemplo, barras de salud, sin

limitación, se pueden preparar combinando diversos excipientes, tales como aglutinantes, rellenos, aromatizantes, colorantes y similares, junto con uno o más derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato*, y mezclando a una consistencia de masa plástica. La masa luego se extruye o se moldea para formar formas de "barra de caramelo" que luego se secan o se dejan solidificar para formar el producto final.

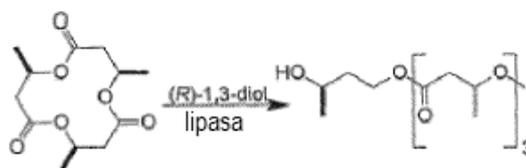
- 5 Alternativamente, los compuestos se pueden administrar por vía oral en una forma de dosificación líquida como una solución, emulsión o suspensión. La forma de dosificación líquida puede contener, por ejemplo, solventes apropiados, conservantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, diluyentes, edulcorantes, agentes de fusión y agentes colorantes y saborizantes, que son conocidos para los expertos en la técnica. Los compuestos también se pueden agregar a formulaciones de vitaminas líquidas y bebidas que contienen electrolitos. Las bebidas pueden ser en forma de bebidas energéticas, bebidas deportivas, bebidas de frutas, bebidas cítricas, bebidas carbonatadas, mezclas de bebidas secas, otros medios apropiados para beber o combinaciones de los mismos.

- 10 Para mantener concentraciones elevadas de cuerpos cetónicos en sangre durante un período de 24 horas, se pueden usar formulaciones de liberación retardada. La liberación de los derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato* se puede controlar mediante un número de técnicas de formulación. Por ejemplo, se pueden usar técnicas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de película, microencapsulación y similares para retardar la liberación de los derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato*, como es conocido para los expertos en la técnica.

### III. Procedimientos de preparación de derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato*

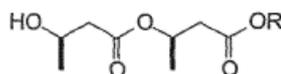
- Los derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato* divulgados se pueden producir usando técnicas químicas, técnicas enzimáticas, organismos transgénicos o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, los polímeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* (ácido poli-(R)-3-hidroxi-*butírico*), tales como polímeros de origen natural, que están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, se convierten en el trímero cíclico favorecido termodinámicamente (tríolido) por el procedimiento de Seebach et al. Véase, Seebach et al., Eur. J. Biochem. 1994, 224, 317-328; Helv. Chim. Acta 1982, 65, 495-503; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 434, 435.

- 25 El tríolido es un intermedio versátil que se puede convertir a varios derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato* diferentes. Los derivados de éster de ejemplo, tales como los según las fórmulas 2 y 3, se pueden producir a partir del tríolido por procedimientos químicos y/o quimioenzimáticos. En un ejemplo de un procedimiento quimioenzimático, el tríolido se trata con una lipasa en presencia de (R)-1,3-butanodiol para proporcionar el nuevo producto éster que se muestra en el Esquema 2, dado a continuación.



ESQUEMA 2

- 30 Procedimientos adicionales de fabricación de derivados de (R)-3-hidroxi-*butirato* incluyen oligómeros lineales esterificantes o transesterificantes de (R)-3-hidroxi-*butirato* y oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* cíclicos transesterificantes que contienen cuatro o más residuos de (R)-3-hidroxi-*butirato*. Por ejemplo, los oligómeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* que tienen una longitud definida se pueden producir mediante despolimerización enzimática de ácido poli-(R)-3-hidroxi-*butírico*. Específicamente, Wang et al. (Biomacromolecules 2002, 3, 838-834) han informado las condiciones de producción del dímero de (R)-3-hidroxi-*butirato* mediante despolimerización. El dímero de (R)-3-hidroxi-*butirato* se puede esterificar con un alcohol para producir, por ejemplo, los compuestos según la fórmula 6.



Fórmula 6

- Los polímeros de (R)-3-hidroxi-*butirato* (ácido poli-(R)-3-hidroxi-*butírico*) se pueden convertir en (R)-3-hidroxi-*butirato* y/u oligómeros de los mismos mediante despolimerización catalizada con ácido. En un aspecto, la despolimerización se realiza en dióxido de carbono supercrítico que incluye agua como un cosolvente. El pH del agua en contacto con el dióxido de carbono supercrítico es de aproximadamente 2,9 debido a la formación de ácido carbónico, que puede acelerar la reacción de despolimerización (Toews, et al. Anal. Chem. 1995, 67, 4040). Opcionalmente, se puede añadir un catalizador ácido al dióxido de carbono supercrítico para promover la reacción de despolimerización. Los catalizadores ácidos apropiados son conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácidos orgánicos, tales como ácido 4-toluenosulfónico.

En otro ejemplo de despolimerización catalizada por ácido, se usa un ácido de Lewis para promover la reacción de despolimerización. Por ejemplo, Seebach et al. *Helv. Chim. Acta* 1982, 65, 495-503, divulgan un protocolo de transesterificación catalizado con titanio de producción de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato de etilo a partir del ácido poli-(R)-3-hidroxi-*n*-butírico.

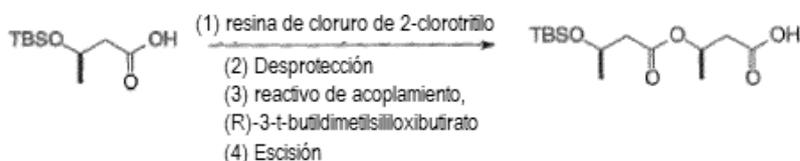
5 Otro procedimiento químico de producción de oligómeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato a partir del ácido poli-(R)-3-hidroxi-*n*-butírico se realiza mediante hidrogenación directa del polímero. Por ejemplo, se pone en contacto ácido poli-(R)-3-hidroxi-*n*-butírico con un catalizador de hidrogenación, tal como un catalizador de metal noble, o un catalizador de cromito, tal como cromito de cobre, en presencia de hidrógeno a presión elevada. Este procedimiento se puede  
10 realizar en dióxido de carbono supercrítico. El uso de dióxido de carbono supercrítico produce varias ventajas sobre los solventes convencionales. Específicamente, el residuo de solvente tóxico no se introduce en las composiciones divulgadas y se evitan costosos costes de eliminación y limpieza de solvente. Estas ventajas son particularmente relevantes para los agentes terapéuticos divulgados en la actualidad.

En otra realización, el (R)-3-hidroxi-*n*-butirato se prepara a partir de acetoacetato de etilo, que está disponible fácilmente a partir de diversas fuentes comerciales. Por ejemplo, como es conocido para los expertos en la técnica,  
15 el acetoacetato de etilo se puede reducir estereoespecíficamente usando técnicas químicas o enzimáticas para dar el producto de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato deseado. De forma similar, el acetoacetato de etilo se puede reducir en el carbono de carboxilato ya sea antes o después de la reducción estereoespecífica para proporcionar (R)-1,3-butanodiol. Los beta cetoésteres, tales como acetoacetato de etilo, se pueden reducir estereoespecíficamente tanto enzimáticamente, usando por ejemplo una deshidrogenasa, como químicamente usando diversos catalizadores como es bien conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, Brown et al. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 1577-1583; *J. Org. Chem.* 1989, 54, 4504-4511, describen la reducción estereoespecífica de tales compuestos beta cetoéster usando complejos de alquil borano. Procedimientos adicionales apropiados que emplean complejos catalíticos de rutenio han sido revisados por Everaere et al. *Adv. Synth. Catal.* 2003, 345, 67-77. Un sistema catalítico para preparar enzimáticamente (R)-3-hidroxi-*n*-butirato a partir de acetoacetato de etilo descrito en la sección de ejemplos a continuación. Los polímeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato se pueden convertir en oligómeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato útiles y derivados de los mismos usando catálisis enzimática. Estos procedimientos enzimáticos también se pueden usar para producir los compuestos intermedios de compuestos que contienen (R)-3-hidroxi-*n*-butirato útiles. Por ejemplo, numerosas enzimas polihidroxi-*n*-alcanoatos despolimerasas se producen en diversas bacterias y se pueden expresar como es conocido para los expertos en la técnica. Para una revisión, véase Jendrossek, D. *Extracellular PHA Depolymerases - the Key Enzyme of PHADegradation*, h: *Biopolymers. Part 3b, Polyesters*, (Steinbuchel and Doi Eds.) pp. 41-83. Wiley-NCH, Weinheim. Las enzimas despolimerasas útiles incluyen la familia PhaZ1-PhaZ7, del subgrupo EC 3.1.1.75, que son producidas por la bacteria que degrada el polihidroxi-*n*-alcanoato *Paucimonas lemoignei* se pueden usar para convertir el ácido poli-(R)-3-hidroxi-*n*-butírico en (R)-3-hidroxi-*n*-butirato y oligómeros de los mismos. PhaZ5, por ejemplo, se puede producir por expresión en *Bacillus subtilis*, como se describe por Braaz et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 209, 237-241. De manera similar, PhaZ7 se puede producir a partir de *Paucimonas lemoignei* tal como lo describen Handrick et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 36215-36224 y Braaz et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 224, 107-112, y se usó para producir los derivados (R)-3-hidroxi-*n*-butirato oligoméricos útiles. La despolimerasa y las condiciones para la despolimerización se pueden seleccionar por los expertos habituales en la técnica en base al producto o mezcla de productos deseados. Por ejemplo, puede ser deseable producir oligómeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato, tales como dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros y similares, mientras se minimiza la presencia del monómero de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato. PhaZ7, por ejemplo, favorece el pentámero (R)-3-hidroxi-*n*-butirato. El monómero de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato también puede ser el producto deseado. Se ha demostrado que los oligómeros y derivados éster de los mismos que contienen siete o menos unidades de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato producen concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre particularmente deseables tras la administración oral. Sin embargo, los octámeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato y oligómeros superiores y sus derivados también son útiles como productos terapéuticos y suplementos nutricionales.  
45

Los procedimientos de preparación de oligómeros superiores de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato pueden emplear técnicas de despolimerización enzimática, como se discutió anteriormente, o pueden usar técnicas convencionales de química de síntesis. Por ejemplo, se puede preparar (R)-3-hidroxi-*n*-butirato oligomérico por esterificación iterativa de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato según el procedimiento enseñado por la Patente de los Estados Unidos No. 5,625,030 de Williams et al. (Williams). Tales compuestos (R)-3-hidroxi-*n*-butirato oligoméricos se pueden esterificar con un alcohol fisiológicamente compatible mediante los procedimientos divulgados por Williams, y los revisados en Haslam, E. *Tetrahedron* 1980, 36, 2409-2434. De este modo, los oligómeros de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato que tienen cualquier longitud se pueden preparar y usar para producir los derivados de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato terapéuticos divulgados en este documento.  
50  
55

En un ejemplo, se prepara un oligómero (R)-3-hidroxi-*n*-butirato como se muestra en el Esquema 2, a continuación. Con referencia al Esquema 2, el derivado de (R)-3-*t*-butildimetilsililoxibutirato se puede preparar en las condiciones divulgadas por Greene and Wuts in *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; Wiley-Interscience, New York, (1999). La etapa uno en el Esquema 2 está uniendo el derivado de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato protegido a un soporte sólido como lo enseñan Barlos and coworkers (Barlos et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 3947; *ibid.* 3943). La etapa 2 es la desprotección selectiva del derivado de (R)-3-hidroxi-*n*-butirato unido al soporte sólido. Las condiciones apropiadas para esta reacción incluyen usar fuentes de fluoruro como lo enseñan Greene and Wuts, un reactivo de  
60

ejemplo para esta reacción es TAS-F, que está disponible comercialmente en Aldrich, Milwaukee, Wisconsin (Véase, Roush et al. J. Org. Chem. 1998, 63, 6436. Otros reactivos apropiados para llevar a cabo la etapa 2 en el Esquema 2, que incluyen otras fuentes de fluoruro, son bien conocidos para los expertos en la técnica de la química de síntesis. Con referencia a la etapa 3, un segundo derivado de (R)-3-hidroxi-butarato se introduce mediante una reacción de condensación. Las condiciones apropiadas para esta condensación incluyen el uso de un reactivo de carbodiimida, tal como diisopropilcarbodiimida (DIC) o dicitclohexilcarbodiimida, opcionalmente en combinación con una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP). Condiciones de reacción adicionales apropiadas para la etapa 3 se describen en la patente de Williams. Opcionalmente, las etapas 2 y 3 se pueden repetir cualquier número de veces para proporcionar oligómeros de (R)-3-hidroxi-butarato de una longitud deseada. La escisión de la etapa 4 implica el tratamiento del derivado de (R)-3-hidroxi-butarato unido al soporte sólido con un ácido, por lo general un ácido débil, tal como ácido acético. Las condiciones específicas implican tratar el soporte sólido con una mezcla de ácido acético, trifluoroetanol, diclorometano (proporción 2: 2: 6) durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente.



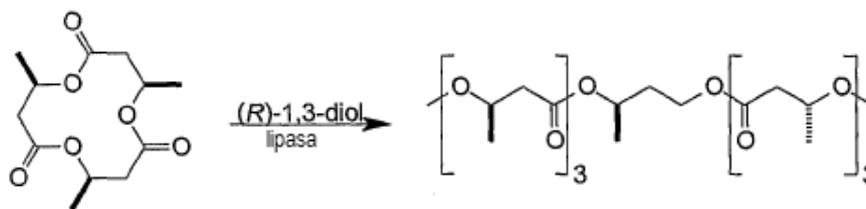
### Esquema 3

Uno o más equivalentes del producto proporcionado en el Esquema 2 se pueden esterificar con un alcohol fisiológicamente compatible. Por ejemplo, si el alcohol es un alcohol polihídrico, la estequiometría de la reacción se puede elegir de modo que cada grupo hidroxilo del alcohol se esterifique con el derivado dimérico de (R)-3-hidroxi-butarato. La esterificación de los derivados (R)-3-hidroxi-butarato oligoméricos definidos producidos como se describe en este documento se puede esterificar como se enseña en la publicación '339. Además, se divulgan numerosas condiciones de esterificación apropiadas por la patente de Williams, y otras condiciones son bien conocidas para los expertos en la técnica. La eliminación del grupo sililo del compuesto de éster resultante usando las condiciones descritas por Greene and Wuts, proporcionan el derivado de (R)-3-hidroxi-butarato deseado.

Otro procedimiento químico de preparación de oligómeros que contienen dos o más residuos de (R)-3-hidroxi-butarato usa (R)-3-hidroxi-butarato como material de partida. Por ejemplo, Seebach y colaboradores describen el uso del derivado de cloruro de ácido correspondiente de 3-hidroxi-butarato para ensamblar oligómeros de 3-hidroxi-butarato en solución (Seebach et al. Helv. Chim. Acta 1988, 71, 155-167). Los cloruros de ácido también se pueden formar a partir de oligómeros de 3-hidroxi-butarato. Por ejemplo, el cloruro de ácido del compuesto dimérico preparado según el Esquema 2, anterior, se puede preparar según el procedimiento de Seebach et al. El cloruro de ácido correspondiente puede hacerse reaccionar con alcoholes fisiológicamente compatibles para proporcionar, después de la desprotección, ejemplos de nuevos derivados de (R)-3-hidroxi-butarato.

Los diversos alcoholes para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-butarato se pueden producir mediante cualquier procedimiento que proporcione el alcohol fisiológicamente compatible deseado. Un alcohol, (R)-1,3-butanodiol de ejemplo, se puede producir a partir de (R)-3-hidroxi-butarato por reducción de la unidad estructural del ácido carboxílico. Los reactivos y los procedimientos para reducir el grupo ácido carboxílico se encuentran en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, NCH publishers, 1989, pp. 432-434. Esta ruta es particularmente conveniente porque el (R)-3-hidroxi-butarato está fácilmente disponible como un único enantiómero de varias fuentes. Por ejemplo, el (R)-3-hidroxi-butarato se puede producir por despolimerización enzimática de su polímero de origen natural. Para procedimientos de ejemplo, véase Shang et al. Appli. Environ. Microbiol. 1994, 60, 1198-1205, y la Patente de los Estados Unidos No.6,472,188 de Lee et al. El material de partida de ácido poli-(R)-3-hidroxi-butírico para los procedimientos de despolimerización se puede producir mediante cualquiera de varios procedimientos, ejemplos de los cuales se enseñan en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,569,595 de Dennis y 6,492,134 de Aquin.

En otro ejemplo, la esterificación catalizada por lipasa de (R)-1, 3-butanodiol con el compuesto de triolido produce el nuevo diol biesterificado según el Esquema 3, a continuación. Las vías de reacción del Esquema 1 y del Esquema 3 se pueden seleccionar usando diferentes enzimas lipasas y/o condiciones de reacción variables, tales como concentración de reactivo y estequiometría, como es conocido para los expertos en la técnica.



Esquema 4

Por lo general, las lipasas llevan a cabo sus reacciones habituales, la hidrólisis de enlaces éster, en solventes acuosos. Sin embargo, en solventes orgánicos, donde el agua está sustancialmente excluida, las lipasas pueden catalizar eficazmente las reacciones de esterificación. Estas enzimas se pueden usar para esterificar una amplia variedad de sustratos y también pueden catalizar reacciones de transesterificación. Desafortunadamente, el uso de solventes orgánicos tiene varios inconvenientes, particularmente para aplicaciones farmacéuticas y de la industria alimentaria. Por ejemplo, los solventes orgánicos son costosos y, a menudo, inflamables. Además, muchos solventes orgánicos son tóxicos y, por lo tanto, la contaminación con solventes orgánicos en productos farmacéuticos o nutricionales puede ser un problema grave. De este modo, es importante garantizar que los productos farmacéuticos y nutricionales estén libres de contaminación por solventes, lo que introduce complicaciones y gastos adicionales.

Los intentos anteriores de usar precursores metabólicos de cuerpos cetónicos, tales como derivados de (R)-3-hidroxiobutirato, también han sido infructuosos en parte debido a los procedimientos usados para preparar tales derivados. Los procedimientos actuales de preparación de derivados de (R)-3-hidroxiobutirato también limitan el uso de estos compuestos debido al alto costo del producto y la introducción de la contaminación del producto inherente a los procedimientos. Por ejemplo, las preparaciones de tales derivados que emplean solventes orgánicos son costosas y pueden contaminar el producto con residuos de solventes tóxicos.

Una realización de fabricación de derivados de (R)-3-hidroxiobutirato supera los inconvenientes de usar solventes orgánicos usando fluidos supercríticos, particularmente dióxido de carbono supercrítico como medio de reacción. Los fluidos supercríticos son, por definición, a una temperatura y presión superiores o iguales a la temperatura y presión críticas del fluido. La presión crítica del dióxido de carbono es de aproximadamente 7,370 kilopascales (kPa) y la temperatura crítica es de aproximadamente 31 grados Celsius (°C), por lo que las aplicaciones supercríticas que usan dióxido de carbono por lo general funcionan a temperaturas entre 32 °C y 49 °C y presiones entre aproximadamente 7.370 y 24.000 kPa. Los solventes supercríticos, particularmente el dióxido de carbono supercrítico, brindan muchas ventajas sobre los solventes orgánicos convencionales. Por ejemplo, el dióxido de carbono es un medio de reacción ambientalmente benigno. Un procedimiento de ejemplo para realizar reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos se divulga por la Patente de los Estados Unidos No. 5,783,627 de Kao et al. A diferencia de los solventes orgánicos convencionales, se puede dejar que el dióxido de carbono simplemente se evapore sin dejar un residuo contaminante. De este modo, el uso de dióxido de carbono simplifica los protocolos de eliminación y purificación.

En ciertos ejemplos, el medio de reacción puede incluir dióxido de carbono supercrítico y un cosolvente. El cosolvente puede incluir agua y/o uno o más cosolventes orgánicos. Los tipos de cosolventes orgánicos incluyen cosolventes polares y no polares. Los ejemplos de cosolventes orgánicos polares incluyen metanol, etanol, tetrahidrofurano, acetona y similares. Los ejemplos de cosolventes no polares apropiados incluyen hexanos, ciclohexano, tolueno y similares.

Tanto los procedimientos enzimáticos como no enzimáticos de preparación de los derivados de (R)-3-hidroxiobutirato divulgados en este documento se pueden realizar en dióxido de carbono supercrítico. Sin embargo, el dióxido de carbono supercrítico tiene un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5. Este pH ácido puede desnaturalizar algunas proteínas, anulando así su actividad catalítica. De este modo, en un aspecto del procedimiento de fabricación de derivados de (R)-3-hidroxiobutirato, se usan lipasas estabilizadas, tales como las lipasas de cristal de enzima reticulado (CLEC). Los ejemplos de procedimientos de preparación de y el uso de tales lipasas estabilizadas se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,618,710 de Navia et al. y 6,211,422 de DeSimone et al.

En otro aspecto, las lipasas sensibles al pH se pueden usar dentro de su rango de pH efectivo incorporando una solución reguladora en el sistema de solventes. Los ejemplos de sistemas de soluciones reguladoras para intervalos de pH particulares los proporcionan Ellis and Morrison (Methods Enzymol. 1982, 87, 405) y por McLellan (Anal. Biochem. 1982, 126, 94). Los expertos en la técnica conocen las soluciones reguladoras adicionales apropiadas para un intervalo de pH dado.

Las lipasas apropiadas para preparar derivados de (R)-3-hidroxi-  
 5 butirato se pueden seleccionar basándose en el derivado deseado. Por ejemplo, las lipasas pueden cribarse para la capacidad de catalizar una reacción deseada mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 1, a continuación. Las lipasas apropiadas para el cribado para determinar el catalizador óptimo se divulgan por Whitesides and Wong (1994, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Elsevier, Oxford), Gross et al. (Chem. Rev. 2001, 101, 2097-2124) y Michor et al. (Biotechnology Letters 1996, 18, 79-84). Una fuente para lipasas apropiadas es Biocatalytics, Inc., Pasadena, CA, que vende un conjunto para el cribado de lipasas con el nombre comercial "Chirazyme". Actualmente se cree que la lipasa pancreática porcina (PPL), la lipasa de *P. cepacia* (lipasa PC) y *Pseudomonas* sp. lipasa (PSL) son lipasas particularmente útiles para preparar ésteres de (R)-3-hidroxi-  
 10 butirato. Las lipasas inmovilizadas son útiles para preparar ésteres de (R)-3-hidroxi-  
 butirato.

Las lipasas inmovilizadas proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, renovación catalítica y facilidad de purificación del producto. Las lipasas se pueden inmovilizar sobre cualquier sustrato, con ejemplos típicos que incluyen superficies de vidrio o de oro, perlas de polímero, sílice, Celite y similares. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,080,402 de Reetz et al. y 6,398,707 de Wu et al describen técnicas de inmovilización de lipasa útiles.  
 15 En otras alternativas, los derivados de (R)-3-hidroxi-  
 butirato divulgados en este documento se pueden producir, o pueden producirse intermedios en los derivados, mediante microorganismos. Por ejemplo, se puede usar ácido poli (R)-3-hidroxi-  
 butírico como material de partida para producir compuestos según las Fórmulas 1 y 2. Los genes responsables de producir ácido poli (R)-3-hidroxi-  
 20 butírico se han clonado y expresado, y este material se puede producir en varios microorganismos diferentes bajo una variedad de condiciones. Véase, Rhie and Dennis, Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 2487-2492. El ácido poli (R)-3-hidroxi-  
 butírico se puede convertir en los compuestos terapéuticos divulgados en este documento por procedimientos químicos, procedimientos enzimáticos y combinaciones de los mismos. Los derivados de poli (R)-3-hidroxi-  
 butirato también se pueden producir completamente en microorganismos.

#### IV. Procedimientos para usar derivados de (R)-3-hidroxi- 25 butirato

Los derivados de (R)-3-hidroxi-  
 25 butirato divulgados permiten el tratamiento de varias enfermedades que se benefician de niveles elevados de cuerpos cetónicos. Por ejemplo, una variedad de trastornos neurológicos, que incluyen epilepsia y mioclonos, y enfermedades neurodegenerativas en particular, que incluyen, sin limitación, aquellas tales como enfermedad del Alzheimer, demencia vascular, demencia senil tipo cuerpo de Lewy, demencia corporal Lafora, enfermedad de Parkinson, síndrome de encefalopatía mitocondrial, miopatía acidosis láctica y accidente cerebrovascular (Síndrome MELAS), la enfermedad de Pick y la distrofia muscular, y sus efectos asociados se pueden tratar eficazmente con los presentes derivados de (R)-3-hidroxi-  
 30 butirato. Debido a que las composiciones divulgadas también se pueden usar como un producto alimenticio para imitar los efectos de una dieta cetogénica, las composiciones también son útiles para tratar la obesidad.

Los estados distróficos musculares se pueden tratar usando los compuestos y composiciones divulgados. Por ejemplo, las distrofias musculares de Duchenne y Becker, la ataxia de Friedreich, la epilepsia mioclónica asociada al síndrome de fibras rojas rasgadas (MERRF), el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de Leigh y el desgaste muscular pueden tratarse administrando los derivados de (R)-3-hidroxi-  
 35 butirato divulgados en este documento.

Muchas enfermedades, que incluyen varias enumeradas anteriormente, tienen efectos secundarios causados por el daño debido a la producción excesiva de radicales libres y pueden tratarse usando los derivados de (R)-3-  
 40 hidroxi-  
 butirato divulgados en este documento. Por ejemplo, el daño de los radicales libres ha estado implicado en trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig) y la enfermedad de Alzheimer. Las enfermedades adicionales en las que se produce un daño excesivo por radicales libres generalmente incluyen condiciones hipóxicas y una variedad de otros trastornos. Más específicamente, los trastornos en los que está implicado un daño excesivo de radicales libres incluyen isquemia, lesión por reperfusión isquémica (tal como lesión por reperfusión coronaria o cerebral), isquemia o infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares (tales como un accidente cerebrovascular tromboembólico o hemorrágico) que pueden conducir a isquemia en el cerebro, isquemia operatoria, hemorragia traumática (por ejemplo, un accidente cerebrovascular hipovolémico que puede provocar hipoxia o anoxia del CNS), lesión por resucitación, traumatismo de la médula espinal, enfermedades inflamatorias, trastornos autoinmunes (tales como artritis reumatoidea o lupus eritematoso sistémico), síndrome de Down, Enfermedad de Hallervorden-Spatz, corea de Huntington, enfermedad de Wilson, angiopatía diabética (tal como enfermedad vascular periférica o degeneración retiniana), uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), que incluye bronquitis crónica y enfisema, asma, neoplasia, enfermedad de Crohn, intestino inflamatorio enfermedad y pancreatitis. El daño de los radicales libres también está implicado en una variedad de trastornos relacionados con la edad, particularmente en afecciones oftálmicas tales como cataratas o degeneración macular relacionada con la edad.  
 55

De este modo, otra ventaja de las composiciones divulgadas es la reducción del daño de los radicales libres. El metabolismo de las presentes composiciones reduce el daño de los radicales libres al oxidar la coenzima Q. La principal fuente de radicales libres mitocondriales es la forma semiquinona de la coenzima Q, que resulta de una reducción electrónica de la quinona. La semiquinona reacciona directamente con las moléculas de oxígeno para formar el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). En el metabolismo de cuerpos cetónicos, la concentración de la forma  
 60

semiquinona de la coenzima Q se reduce. De este modo, las presentes composiciones son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a radicales libres.

La eficacia metabólica se potencia mediante los derivados de (R)-3-hidroxiacetato divulgados. De este modo, los compuestos se pueden administrar a un sujeto para mejorar la eficacia del ejercicio y el rendimiento deportivo. Además, las afecciones que incluyen, sin limitación, estados hipóxicos, angina de pecho, isquemia coronaria y daño orgánico secundario a oclusión de vasos coronarios, claudicación intermitente, demencia multiinfarto, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad de altura y fallo cardíaco pueden tratarse usando los compuestos divulgados.

Las presentes composiciones también se pueden usar para tratar afecciones tales como tumores, particularmente tumores cerebrales, tales como astrocitoma. De hecho, se ha demostrado que el control metabólico reduce la angiogénesis y el crecimiento en un modelo de tumor cerebral experimental (Mukherjee et al. Br. J. Cancer 2002, 86, 1615-1621).

Los trastornos del metabolismo de la glucosa, tales como la diabetes tipo I, se pueden tratar usando derivados de (R)-3-hidroxiacetato como fuente de cuerpos cetónicos. Por ejemplo, trastornos tales como la resistencia a la insulina, incluida la diabetes de tipo II, pueden tratarse eficazmente usando los compuestos. De manera similar, condiciones hipoglucémicas y/o hipocéticas como resultado de trastornos metabólicos, tales como el síndrome de acil coenzima A deshidrogenasa, deficiencia de carnitina palmitoil transferasa tipos I y II (CPT-I y II), enfermedad urinaria de jarabe de arce (MSUD) o resultante de otras afecciones, tales como adenoma pancreático o hiperplasia, se pueden tratar usando los compuestos y composiciones divulgados. Los trastornos adicionales del metabolismo de la glucosa que se pueden tratar usando los derivados de (R)-3-hidroxiacetato divulgados incluyen, sin limitación, leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall y episodios de hipoglucemia. La deficiencia de Glut-1, un trastorno del transporte de glucosa asociado con un defecto en la proteína de transporte de glucosa asociada al cerebro, también se puede tratar usando los derivados de (R)-3-hidroxiacetato divulgados en este documento.

La concentración en sangre de cuerpos cetónicos puede mantenerse a un nivel terapéutico o nutricionalmente eficaz administrando la cantidad apropiada del derivado de (R)-3-hidroxiacetato basado en el trastorno que se va a tratar y/o los requisitos de peso y energía del sujeto.

Usando los derivados de (R)-3-hidroxiacetato divulgados en este documento, los efectos terapéuticos y nutricionales deseados pueden mantenerse sin recurrir a la dieta cetogénica. Durante el metabolismo normal de estos derivados, los cuerpos cetónicos, específicamente, (R)-3-hidroxiacetato y acetoacetato, se liberan a la sangre. Por lo general, las concentraciones terapéuticas de cetonas en sangre (medidas como la suma de (R)-3-hidroxiacetato y acetoacetato) varían desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mM, más por lo general desde aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 mM, y para algunos trastornos, se encuentra que los niveles de cetona en sangre desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 mM son terapéuticos. Por ejemplo, actualmente se cree que las concentraciones de cuerpos cetónicos superiores a aproximadamente 4 mM producen una respuesta terapéutica en la epilepsia refractaria (Gilbert et al., J. Child Neurol. 2000, 15, 787-790). Sin embargo, ciertos trastornos se benefician de incrementos relativamente pequeños en la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre. Por ejemplo, Van Hove et al. observaron efectos terapéuticos en niños afectados con deficiencia de CoA deshidrogenasa mediante la administración oral de sodio-3-hidroxiacetato racémico. Los efectos terapéuticos se correlacionaron con concentraciones máximas en sangre de 0,19 mM a 0,36 mM de concentración total de (R)-3-hidroxiacetato y acetoacetato (Van Hove et al., Lancet 2003, 361, 1433-1435).

Las concentraciones terapéuticas de cuerpos cetónicos en sangre observadas por Van Hove et al., se pueden producir en un hombre de 70 kilogramos usando desde aproximadamente 5 a aproximadamente 70 gramos por día de equivalentes de (R)-3-hidroxiacetato. Sin embargo, las concentraciones de cetonas en sangre observadas en un hombre en ayunas son mayores, por lo general desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 7 mM. Un hombre de 70 kilogramos en ayunas produce aproximadamente 150 gramos de cuerpos cetónicos por día, produciendo de este modo la concentración de cuerpo cetónico en sangre desde aproximadamente 5 a aproximadamente 7 mM. De este modo, para lograr las concentraciones de cuerpos cetónicos observados bajo ayuno a largo plazo o la dieta cetogénica, un hombre de 70 kilogramos consumirá aproximadamente 150 gramos de equivalentes de (R)-3-hidroxiacetato por día. La cantidad total consumida depende del peso corporal y el efecto deseado. Por lo general, el peso de los equivalentes de (R)-3-hidroxiacetato consumidos o administrados por día varía desde aproximadamente 5 gramos a aproximadamente 300 gramos, y más por lo general de 10 gramos a aproximadamente 200 gramos. La cantidad administrada puede expresarse más convenientemente en términos de gramos de equivalentes de (R)-3-hidroxiacetato por día por kilogramo de peso corporal, que por lo general estará en el intervalo desde aproximadamente 70 miligramos a aproximadamente 5 gramos por kilogramo de peso corporal. Más por lo general, la cantidad de equivalentes de hidroxiacetato por día variará desde aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 4 gramos por kilogramo de peso corporal, y lo más por lo general desde aproximadamente 1,5 gramos a aproximadamente 3 gramos por kilogramo de peso corporal.

De este modo, cuando los derivados de (R)-3-hidroxiacetato descritos se usan en cantidades mayores, proporcionarán una porción significativa de la ingesta calórica de los sujetos. De este modo, los derivados de (R)-3-

hidroxibutirato divulgados se pueden administrar como productos alimenticios. De hecho, en este documento se describe el uso de los derivados de (R)-3-hidroxibutirato divulgados como un producto alimenticio o suplemento nutricional para mejorar el rendimiento.

## V. Ejemplos

- 5 La divulgación anterior se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Cualquier ejemplo que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

### Ejemplo 1

10 Este Ejemplo describe un protocolo para determinar la capacidad de las lipasas para catalizar una reacción deseada específica. Se prepara una rejilla de moléculas de sustrato en tubos de ensayo disolviendo cada sustrato hasta una concentración final de 0,1 mM en CH<sub>3</sub>CN y mezclando con solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,5). Luego se añade una enzima a cada pocillo de microtitulación y la mezcla se incuba durante 30 minutos. La mezcla de reacción en cada tubo se extrae tres veces con diclorometano, los extractos orgánicos se combinan, se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentran a aproximadamente 0,1 ml usando una corriente de nitrógeno. Las muestras concentradas se analizan luego usando cromatografía de capa fina analítica (TLC). De acuerdo con lo anterior, cada muestra se aplica a una placa de TLC de sílice (disponible en E. Merck, Darmstadt) y se desarrolla en una mezcla de diclorometano:metanol (99:1). Las placas de TLC desarrolladas se visualizan usando luz UV y carbonización con una tinción de p-anisaldehído (18 ml de p-anisaldehído, 7,5 ml de ácido acético glacial, 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 675 ml de etanol absoluto).

### Ejemplo 2

20 Este Ejemplo describe la síntesis del triolido de ácido (R)-3-hidroxibutírico. El procedimiento sigue el protocolo de Seebach et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 434. Una mezcla de ácido poli-(R)-3-hidroxibutírico (50 g) y ácido 4-toluenosulfónico monohidratado (21,5 g, 0,113 mol) en tolueno (840 ml) y 1,2-dicloroetano (210 ml) se agitó y se calentó a reflujo durante 20 horas bajo una trampa Dean-Stark. La solución de color marrón resultante se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con una solución semisaturada de carbonato de sodio y con una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El residuo de color marrón semisólido resultante se destiló usando un aparato Kugelrohr para producir un sólido de color blanco (18,1 g) a 120-130 °C a 0,15 torr. Por encima de 130 °C, un sólido ceroso comenzó a destilar y la destilación se detuvo. El material destilado tenía un punto de fusión de 100-102 °C. La recristalización en hexano proporcionó cristales incoloros (15,3 g) que tenían un punto de fusión de 107-108 °C.  $[\alpha]_D^{25} -35,1$  (c = 1,005, CHCl<sub>3</sub>), (lit. = -33,9). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,30 (d, 9H, -CH<sub>3</sub>); 2,4-2,6 (m, 6H; -CH<sub>2</sub>-); 5,31 - 5,39 (M, 3H; HC-O). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ = 20,86 (CH<sub>3</sub>); 42,21 (CH<sub>2</sub>); 68,92 (CH); 170,12 (CO). Análisis elemental: calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>: C, 55,81; H 7,02; Encontrado: C, 55,67; H, 7,15.

### Ejemplo 3

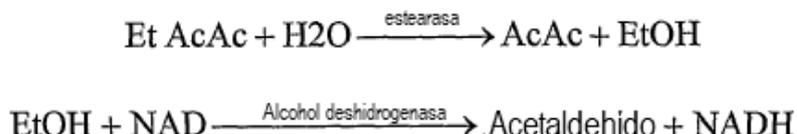
35 Este Ejemplo describe la preparación de (R)-1,3-butanodiol a partir del ácido poli-(R)-3-hidroxibutírico mediante despolimerización reductiva. El procedimiento sigue el protocolo de Seebach et al. *Helv. Chim. Acta* 1982, 65, 495-503. LiAlH<sub>4</sub> (10 g, 0,264 mmol) se suspende en tetrahidrofurano (460 ml) y se enfría a 15 °C. Se añade ácido poli-(R)-3-hidroxibutírico (30 g, 0,349 mmol) lentamente (durante 40 minutos). La mezcla se agita luego a temperatura ambiente durante 90 minutos y luego se calienta a reflujo durante 5 horas. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla se enfría a 0 °C y la reacción se inactiva mediante la adición cuidadosa (gota a gota) de 10 ml de agua, seguido de 30 ml de una solución de NaOH al 10 % y 30 ml de agua. El precipitado de color blanco formado se elimina por filtración, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 150 ml x 30 minutos), se separa por filtración y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y los volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se destiló a presión reducida para proporcionar 26,55 g (85 %) de (R)-1,3-butanodiol analíticamente puro.

### Ejemplo 4

Este Ejemplo describe la preparación enzimática de ácido (R)-3-hidroxibutírico a partir de acetoacetato de etilo. La reacción neta produce un equivalente cada uno del ácido (R)-3-hidroxibutírico y el etanol a partir de un equivalente de acetoacetato de etilo (y agua). El procedimiento utiliza dos enzimas, una esterasa para hidrolizar el acetoacetato de etilo a acetoacetato y etanol y la β-hidroxibutirato deshidrogenasa para reducir estereoselectivamente el grupo β-ceto para formar el ácido (R)-3-hidroxibutírico. Ambas enzimas están disponibles comercialmente de Biocatalytics and Sigma Chemical Co.

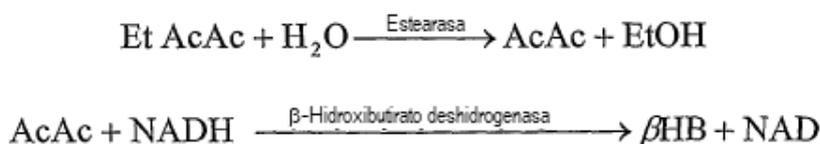
55 Primero, se demostró la formación de etanol a partir de acetoacetato de etilo de la siguiente manera: se preparó un cóctel de etanol que contenía 2-amino-2-metilpropanol, pH 9,9 (0,93 M) y NAD (3,3 mM) y se añadieron 50 microlitros del cóctel de etanol a los pocillos en una microplaca. Se preparó un cóctel de reacción de esterasa que contenía imidazol pH 7 (0,1 M), MgCl<sub>2</sub> (0,005 M) y esterasa aislada de hígado de cerdo (EC 3.1.1.1, 13U), y diversos

- 5 pocillos recibieron etanol, esterasa y/o acetoacetato de etilo estándar a volumen total de 100 microlitros. Se estableció una referencia a 340 nm y se añadió alcohol deshidrogenasa de levadura para iniciar una reacción. La placa se leyó luego en un modo cinético a 340 nm. En pocillos que contienen etanol estándar y en pocillos que contienen acetoacetato de etilo y esterasa se observó un aumento en la absorbancia que indica la producción de NADH mediante el siguiente esquema.



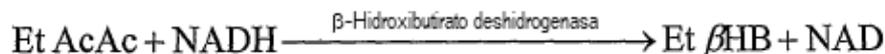
Los pocillos que contienen solo acetoacetato de etilo o esterasa se comportan igual que los blancos de agua. Este experimento indica que ni la esterasa ni el acetoacetato de etilo contienen cantidades apreciables de etanol y que la esterasa del hígado de cerdo escinde eficazmente el éster para producir el acetoacetato y el etanol.

- 10 Se preparó el ácido (R)-3-hidroxi-butírico a partir de acetoacetato de etilo de la siguiente manera: se preparó un cóctel de reacción de esterasa como antes (imidazol pH 7 (0,1 M), MgCl<sub>2</sub> (0,005 M) y esterasa aislada de hígado de cerdo (3.1.1.1, 13U)). Se añadió acetoacetato de etilo (~0,1 M) a temperatura ambiente y la solución se colocó en el banco de laboratorio. Después de 20 minutos, se transfirieron alícuotas de 10 o 20 microlitros de la solución que contenía lipasa a una microplaca que contenía 100 microlitros de un cóctel de acetoacetato que contenía imidazol
- 15 pH 7 (0,1 M) y NADH (0,25 mM). Después de establecer una absorbancia de referencia a 340 nm, se añadió β-hidroxi-butirato deshidrogenasa a la microplaca y se leyó la placa en un modo cinético. Se observó una disminución en la absorbancia que indica una pérdida de NADH en el pocillo, y que evidencia la conversión de acetoacetato a (R)-3-hidroxi-butirato como se describe en el siguiente esquema de reacción.



#### 20 Ejemplo 5

Este Ejemplo describe la preparación de (R)-3-hidroxi-butirato de etilo a partir de acetoacetato de etilo. A los pocillos en una microplaca se añadieron 50 microlitros de una solución de pH 7 que contenía imidazol (0,1 M) y NADH (0,3 mM). Se añadió acetoacetato de etilo (3,9 mM) a los pocillos de reacción, se añadió agua a los pocillos de control y se estableció una referencia. Todos los pocillos recibieron β-hidroxi-butirato deshidrogenasa y la absorbancia UV en los pocillos se siguió cinéticamente. Se observó una disminución en la absorbancia que indica la oxidación de NADH como se describe en la siguiente ecuación:



#### Ejemplo 6

- 30 Este Ejemplo describe la administración oral del compuesto producido en el Esquema 3 a ratas y la medición de los niveles de cetona en sangre resultantes. Cuatro ratas Wistar se dejaron en ayunas durante la noche y se alimentaron con 1,8 gramos del compuesto por kilogramo mediante alimentación por sonda. 24 horas antes de la sonda nasogástrica, se insertó una cánula en la aurícula derecha de cada rata. Las cánulas se usaron para extraer muestras de sangre para el control de cuerpos cetónicos durante el experimento. Los resultados, en la concentración en sangre de cuerpos cetónicos frente al tiempo después de la alimentación, se muestran en la Figura
- 35 1. Con referencia a la Figura 1, se observan aumentos en el (R)-3-hidroxi-butirato y el acetoacetato en suero. La concentración máxima de (R)-3-hidroxi-butirato se produce aproximadamente 45 minutos después de la alimentación por sonda nasogástrica, y la concentración máxima de acetoacetato se produce aproximadamente una hora después de la alimentación forzada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un compuesto seleccionado entre (R)-3-hidroxiutil-(R)-3-hidroxiutilirato y 2,3-dihidroxiutilil -(R)-3-hidroxiutilirato para su uso en el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal de un sujeto en necesidad de tal tratamiento para elevar la concentración en sangre de cuerpos cetónicos en el sujeto mediante la administración oral de dicho compuesto para tratar un trastorno neurológico.
2. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el trastorno neurológico comprende la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Pick, la esclerosis lateral amiotrófica o la epilepsia.
- 10 3. Un compuesto seleccionado de (R)-3-hidroxiutil-(R)-3-hidroxiutilirato y 2,3-dihidroxiutilil -(R)-3-hidroxiutilirato para uso en el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal de un sujeto en necesidad de dicho tratamiento para elevar la concentración en sangre de cuerpos cetónicos en el sujeto mediante la administración oral de dicho compuesto para tratar un trastorno del metabolismo de la glucosa.
4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno del metabolismo de la glucosa comprende resistencia a la insulina.
- 15 5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el trastorno del metabolismo de la glucosa comprende leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes tipo II o episodios de hipoglucemia.
- 20 6. Un compuesto para uso en el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal de un sujeto que tiene una afección seleccionada de un estado hipóxico, angina de pecho, claudicación intermitente, accidente cerebrovascular, enfermedad de altura o insuficiencia cardíaca en la que el tratamiento terapéutico eleva la concentración sanguínea de cuerpos cetónicos en el sujeto por administración oral de dicho compuesto para aumentar la eficacia metabólica, en el que el compuesto se selecciona de (R)-3-hidroxiutil-(R)-3-hidroxiutilirato y 2,3-dihidroxiutilil -(R)-3-hidroxiutilirato.
7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 6 para mejorar la eficacia del ejercicio en un sujeto que necesita dicho tratamiento terapéutico.
- 25 8. Un compuesto para uso en el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal de un sujeto que necesita dicho tratamiento para mejorar el rendimiento cognitivo en el que el tratamiento terapéutico eleva la concentración sanguínea de cuerpos cetónicos en el sujeto por administración oral de dicho compuesto en el que el compuesto se selecciona de (R)-3-hidroxiutil-(R)-3-hidroxiutilirato y 2,3-dihidroxiutilil -(R)-3-hidroxiutilirato.
- 30 9. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8 para mejorar la eficacia del ejercicio en un sujeto que necesita dicho tratamiento terapéutico.

**FIG. 1**  
**Cetonas en sangre media después del éster (1,8 g/kg)**

