

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 030**

51 Int. Cl.:

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 31/21 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/US2013/068545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071389**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13792209 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2914251**

54 Título: **Cuerpos cetónicos para proteger los tejidos del daño por radiación ionizante**

30 Prioridad:

05.11.2012 US 201261722630 P

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

02.04.2020

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

**6011 Executive Boulevard, Suite 325
Bethesda, MD 20892-7660, US y
TDELTA LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VEECH, RICHARD, L. y
CLARKE, KIERAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 752 030 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

Cuerpos cetónicos para proteger los tejidos del daño por radiación ionizante.

5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere a composiciones que contienen compuestos cetogénicos capaces de reducir los efectos adversos de la exposición a la radiación, así como a procedimientos para usar tales compuestos cetogénicos para reducir, mejorar o bloquear uno o más de los efectos adversos de la exposición a la radiación, tal como reducir, mejorar o bloquear el daño del tejido por radiación ionizante. En particular, la presente divulgación se refiere a ésteres y oligómeros de (*R*)-3-hidroxiacetato que son capaces de elevar los niveles en sangre de (*R*)-3-hidroxiacetato y acetoacetato a niveles suficientes para reducir, mejorar o bloquear dichos efectos adversos, particularmente la muerte celular por apoptosis causada por daño inducido por radiación ionizante, por ejemplo, de ADN y ARN.

15

Antecedentes

Desde hace tiempo, es bien sabido que la radiación daña los tejidos biológicos y las células. La deposición inicial de energía en las células irradiadas se produce en forma de átomos o moléculas ionizadas y excitadas distribuidas aleatoriamente en todas las células. Las ionizaciones causan cambios químicos en el área expuesta, produciendo moléculas cargadas o "ionizadas" altamente inestables. Estas experimentan rápidamente cambios químicos, produciendo radicales libres que reaccionan con los componentes celulares y provocan daños permanentes.

20

Como consecuencia inmediata del daño por radiación, las células pueden sufrir apoptosis, muriendo en interfase a las pocas horas de irradiación. Los cambios morfológicos habituales incluyen la pérdida de la estructura nuclear normal y la degradación del ADN. El daño en el ADN es importante para desencadenar la muerte celular programada. También se piensa que las vías de daño y señalización a las membranas están involucradas.

25

Una dosis suficientemente alta de radiación inhibirá la mitosis. La inhibición de la proliferación celular es un mecanismo por el cual la radiación mata a la mayoría de las células. A medida que la radiación mata las células al inhibir su capacidad de división, sus efectos en los organismos vivos se producen principalmente en tejidos con altas tasas de renovación o división celular, caracterizados por una alta actividad proliferativa.

30

El desarrollo de moléculas radioprotectoras eficaces es de gran importancia para las poblaciones potencialmente expuestas a la exposición accidental, intencional o militar a la radiación, incluida la radiación ionizante.

35

Sumario de la divulgación

Ahora se ha determinado sorprendentemente que la protección contra el daño por radiación se produce si se administran cetonas ((*R*)-3-hidroxiacetato o acetoacetato) o sustancias cetogénicas antes o después de la exposición a la radiación como se define en las reivindicaciones.

40

En la presente memoria descriptiva, este efecto se demuestra usando un éster de (*R*)-3-hidroxiacetato particularmente preferido que ahora se puede usar como agente radioprotector. Dichos agentes encuentran aplicación para minimizar, reducir y/o prevenir el daño tisular después de la exposición a la radiación intencional y accidental, así como para aumentar la eficacia terapéutica de las terapias de radiación al proteger el tejido no objetivo del daño por radiación incidental.

45

En la presente memoria descriptiva se proporcionan procedimientos para proteger el tejido animal del daño causado por la exposición a la radiación, que comprende poner en contacto el tejido con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que incluye uno o más ésteres cetónicos, protegiendo así el tejido del daño por radiación.

50

En diversas realizaciones, los procedimientos descritos incluyen la administración de uno o más derivados de (*R*)-3-hidroxiacetato y composiciones que incluyen estos derivados. Estos compuestos sirven como precursores de los cuerpos cetónicos, como el acetoacetato y el (*R*)-3-hidroxiacetato, y por lo tanto producen concentraciones circulantes elevadas de cuerpos cetónicos cuando se administran a un sujeto.

55

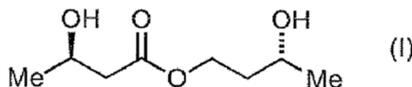
Ejemplos de derivados de (*R*)-3-hidroxiacetato adecuados para su uso en las composiciones y el procedimiento incluyen los enseñados por la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2006/0280721 (Veech) que son ésteres de (*R*)-3-hidroxiacetato y oligómeros de (*R*)-3-hidroxiacetato. Los compuestos de éster divulgados 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.

60

65

En la presente memoria descriptiva, también se describen usos de agentes para reducir, prevenir o tratar el daño celular por radiación, donde el agente es un éster cetónico, tal como uno o más ésteres de (*R*)-3-hidroxiobutirato.

- 5 En su realización más preferida, la presente divulgación proporciona un procedimiento para proporcionar un tratamiento para un sujeto que se sospecha que tiene riesgo de exposición a radiación no terapéutica que comprende administrar a ese sujeto una cantidad protectora de un éster cetónico, más preferentemente que éster es un éster (*R*)-1,3-butanodiol de (*R*)-3-hidroxiobutirato. Aún más preferentemente, el éster es un compuesto de fórmula I: 3-hidroxiobutil-(*R*)-3-hidroxiobutirato, monoéster, enseñado por los documentos WO2010/120300 y WO2010/021766.



- 15 Dicho éster se puede usar en forma de una composición enriquecida enantioméricamente como se describe en el documento WO2010/021766.

- 20 Preferentemente, el tratamiento es mediante administración oral o parenteral del compuesto o compuestos cetogénicos, opcionalmente junto con cualquier terapia de combinación, tal como elevar la concentración corporal de cetonas en sangre entre 0,1 mM y 20 mM, más preferentemente 0,2 mM y 10 mM, aún más preferentemente entre 2 mM y 8 mM.

- 25 Las dosis orales adecuadas del compuesto cetogénico incluirán entre 5 gramos y aproximadamente 500 gramos. Por ejemplo, el procedimiento puede emplear la administración de aproximadamente 70 miligramos a aproximadamente 5 gramos por kilogramo del peso corporal del sujeto, más preferentemente entre 0,5 y 2 gramos por kilogramo, aún más preferentemente de 130 gramos a aproximadamente 170 gramos por día para el sujeto.

- 30 Las características y ventajas anteriores y otras de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones que procede con referencia a las Figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 35 La **Figura 1** es un par de gráficos que ilustran la radioprotección celular mediante ésteres cetónicos. Las células de osteoblastos humanos (HOS) se trataron con ésteres cetónicos, ya sea pre- (panel izquierdo) o post- (panel derecho) radiación gamma ^{60}Co (0,6 Gy/min).

La **Figura 2** ilustra la protección cromosómica por los ésteres cetónicos.

- 40 La **Figura 3** es un par de gráficos e imágenes que ilustran la protección contra la radiación de protones después de la administración de cetonas. Las células HOS se trataron con ésteres cetónicos, ya sea pre- o post- radiación de protones (4 MeV). El tratamiento con cetonas antes de la radiación de protones aumentó la supervivencia celular (gráfico izquierdo) y mitigó el daño al ADN (gráfico derecho).

La **Figura 4** es un gráfico que ilustra la estabilidad del éster cetónico a pH 7.

- 45 La **Figura 5** es un gráfico que ilustra los niveles de metabolitos en sangre del éster cetónico (dosis de 5 gramos/kg, hombres).

Descripción detallada de varias realizaciones

I. Introducción

- 50 El daño tisular por radiación puede resultar de la interacción entre radiación de alta energía con agua en una oxidación electrónica simple de agua para formar el radical hidroxilo: $\text{H}_2\text{O} + \text{h}\nu \rightarrow \text{HO}^\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^-$. Alternativamente, los electrones pueden reaccionar con el oxígeno para formar el radical superóxido: $\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^\cdot$. Los radicales superóxido y los radicales hidroxilo pueden reaccionar entre sí en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa para formar el ión OH^- no tóxico y O_2 , $\text{HO}^\cdot + \text{O}_2^\cdot \rightarrow \text{OH}^- + \text{O}_2$. Los radicales superóxido pueden reaccionar con la superóxido dismutasa para formar el H_2O_2 menos tóxico: $\text{O}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. O_2 . El peróxido de hidrógeno a su vez puede sufrir una reacción catalizada por la catalasa $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Alternativamente, el peróxido de hidrógeno puede ser destruido por glutatión peroxidasa: $2\text{GSH} + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. El destructor terminal de los radicales de oxígeno es el glutatión, que está presente en la mayoría de las células a concentraciones de 5 mM y es responsable del mantenimiento de los grupos sulfhidrilo intracelulares en la forma reducida -SH. El glutatión mismo se mantiene en estado reducido por una reacción de casi equilibrio con la pareja citosólica $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$, que es el par redox más reducido en la célula con un potencial redox muy negativo de 0,42 V. El metabolismo de los cuerpos cetónicos reduce la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

- 60 Además de formarse por radiación ionizante, los radicales libres se pueden formar por el sistema de transporte de electrones mitocondrial, siendo la reacción cuantitativamente más importante la reacción no enzimática de la coenzima semiquinona Q de radicales libres. La cantidad de semiquinona Q disminuye por medio del metabolismo

incluye la incorporación de compuestos y agentes activos en dispositivos o construcciones implantables, como stents vasculares u otros depósitos, que liberan los agentes y compuestos activos durante intervalos de tiempo prolongados para efectos de tratamiento sostenidos.

- 5 La administración sistémica incluye cualquier vía de administración diseñada para distribuir un compuesto o composición activa ampliamente en todo el cuerpo a través del sistema circulatorio. Por lo tanto, la administración sistémica incluye, pero no se limita a la administración intraarterial e intravenosa. La administración sistémica también incluye, pero no se limita a, administración tópica, administración subcutánea, administración intramuscular o administración por inhalación, cuando dicha administración se dirige a la absorción y distribución
10 en todo el cuerpo por el sistema circulatorio.

Analógico, derivado o mimético: un análogo es una molécula que difiere en la estructura química de un compuesto original, por ejemplo, un homólogo (que se diferencia por un incremento en la estructura química, como una diferencia en la longitud de una cadena de alquilo), un fragmento molecular, una estructura que difiere en uno o más grupos funcionales, un cambio en la ionización. Los análogos estructurales a menudo se encuentran utilizando relaciones cuantitativas de actividad de estructura (QSAR), con técnicas como las descritas en Remington (The Science and Practice of Pharmacology (La ciencia y práctica de la Farmacología), 19a. Edición (1995), capítulo 28). Un derivado es una molécula biológicamente activa derivada de la estructura base. Un mimético es una molécula que imita la actividad de otra molécula, como una molécula biológicamente activa. Las moléculas biológicamente activas pueden incluir estructuras químicas que imitan las actividades biológicas de un compuesto. Se reconoce que estos términos pueden superponerse en algunas circunstancias.

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos humanos y no humanos. Del mismo modo, el término sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

Grupo cicloalquilo: un anillo a base de carbono no aromático compuesto por al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

Derivado: Un compuesto o porción de un compuesto que se deriva de o es teóricamente derivable de un compuesto original.

Cantidad eficaz de un compuesto: una cantidad de compuesto suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Se puede administrar una cantidad eficaz de un compuesto en una dosis única, o en varias dosis, por ejemplo, diariamente, durante un ciclo de tratamiento. Sin embargo, la cantidad eficaz del compuesto dependerá del compuesto aplicado, el sujeto a tratar, la gravedad y el tipo de la afección, y la forma de administración del compuesto.

Éster: un término representado 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.

Esterificación: una reacción de un alcohol con un ácido carboxílico o un derivado de ácido carboxílico para dar un éster.

Grupo alquilo halogenado: 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).

Grupo heterocicloalquilo: un grupo cicloalquilo como se definió anteriormente donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo está sustituido con un heteroátomo tal como, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo.

Grupo hidroxilo: representado por la fórmula $-OH$.

Mamífero: este término incluye mamíferos humanos y no humanos. Del mismo modo, el término sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios, por ejemplo, humanos, primates no humanos, ratones, ratas, perros, gatos, caballos y vacas.

Parenteral: administrado fuera del intestino, por ejemplo, no a través del tracto alimentario. En general, las formulaciones parenterales son aquellas que se administrarán a través de cualquier modo posible, excepto la ingestión. Este término se refiere especialmente a las inyecciones, ya sea administradas por vía intravenosa, intratecal, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y diversas aplicaciones de superficie que incluyen la aplicación intranasal, intradérmica y tópica, por ejemplo.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en la presente

divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª edición (1995), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los compuestos aquí divulgados.

5 En general, la naturaleza del vehículo/portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales generalmente comprenden 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, tableta, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

15 **Agente farmacéutico:** un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto o una célula. La incubación incluye exponer una diana a un agente durante un período de tiempo suficiente para que el agente interactúe con una célula. El contacto incluye incubar un agente en forma sólida o líquida con una célula.

20 **Prevención o tratamiento:** la prevención se refiere a inhibir el desarrollo completo de algo (como una enfermedad, afección, etc.), por ejemplo, inhibir el desarrollo de daño tisular después de la radioterapia u otra exposición a la radiación energética. El tratamiento se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma después de que ha comenzado a desarrollarse.

25 **Radioprotector/Radioprotección:** una sustancia o composición citoprotectora que previene o disminuye el(los) efecto(s) de la radiación, particularmente en células, tejidos biológicos, órganos u organismos. Un radioprotector óptimo reduce el último sin comprometer significativamente al primero, y en sí mismo es mínimamente tóxico. Los agentes radioprotectores se pueden clasificar como protectores o mitigantes: los protectores se administran antes de la exposición a la radiación (por ejemplo, radioterapia (RT) o exposición accidental o no intencional) y están diseñados para prevenir lesiones inducidas por la radiación. La amifostina es el prototipo de protector, véase, por ejemplo, Kouvaris et al., 12:738-747, 2007. Los mitigantes se administran después de la exposición a la radiación, pero antes de la expresión fenotípica de la lesión y están destinados a mejorarla. Palifermin (Kepivance®, factor de crecimiento de queratinocitos, KGF; véase, por ejemplo, Speilberger et al., J. Support Oncol. 2:73-74, 2004) puede considerarse como el mitigante prototipo. El tratamiento es una estrategia predominantemente paliativa y de apoyo.

La radioprotección permite que las células y los tejidos sobrevivan, y se curen y crezcan óptimamente, a pesar de las lesiones causadas por la radiación. La radiación daña inherentemente los tejidos. El grado de muerte tisular secundaria y necrosis determina la cantidad de morbilidad y mortalidad. Los radioprotectores intentan reducir, minimizar o bloquear la capacidad de la lesión por radiación para provocar la muerte celular. La muerte celular y el daño tisular se pueden medir por muchos procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos utilizados *in vitro* e *in vivo* incluyen la evaluación bioquímica de la muerte celular mediante ensayos funcionales de apoptosis y necrosis (por ejemplo, fragmentación de ADN, activación de caspasa, escisión de PARP, exposición a anexina V, liberación de citocromo C, etc.), cambios morfológicos en células y tejidos, y fragmentación y pérdida nuclear. *In vivo*, el daño tisular se puede evaluar por pérdida de perfusión, cicatrización, descamación, alopecia, perforación y adherencias de órganos, etc.

50 **Radiación:** la radiación, como se usa el término en Física, es energía en forma de ondas o partículas subatómicas en movimiento emitidas por un átomo u otro cuerpo a medida que cambia de un estado de energía más alto a un estado de energía más bajo. Las fuentes comunes de radiación incluyen gas radón, rayos cósmicos del espacio exterior y rayos X médicos. La radiación se puede clasificar como radiación ionizante o no ionizante, dependiendo de su efecto sobre la materia atómica. El uso más común de la palabra "radiación" se refiere a la radiación ionizante. La radiación ionizante tiene suficiente energía para ionizar átomos o moléculas, mientras que la radiación no ionizante no. El material radiactivo es un material físico que emite radiación ionizante. Hay tres tipos comunes de radiación: la radiación alfa, beta y gamma. Todas son emitidas desde el núcleo de un átomo inestable. Los rayos X producidos por imágenes diagnósticas y metalúrgicas y equipos de detección de seguridad también son radiaciones ionizantes, al igual que los neutrones producidos por la generación de energía nuclear y las armas nucleares.

60 Las fuentes de exposición a la radiación incluyen, pero no se limitan a, radioterapia, guerra nuclear, accidentes de reactores nucleares y manipulación inadecuada de investigación o materiales radiactivos médicos.

65 **Dosis de radiación:** El rad es una unidad de dosis de radiación absorbida definida en términos de la energía realmente depositada en el tejido. Un rad es una dosis absorbida de 0,01 julios de energía por kilogramo de tejido. La unidad SI más reciente es el gray (Gy), que se define como 1 julio de energía depositada por kilogramo de

tejido. Por lo tanto, un gray es igual a 100 rad.

Para evaluar con precisión el riesgo de radiación, la energía de dosis absorbida en rad se multiplica por la efectividad biológica relativa (RBE) de la radiación para obtener la dosis biológica equivalente en rems. Rem significa "Röntgen Equivalente para el Hombre". En unidades SI, la energía de dosis absorbida en graises se multiplica por la misma RBE para obtener una dosis biológica equivalente en siéverts (Sv). El siévert es igual a 100 rem.

La RBE es un "factor de calidad", a menudo denotado por la letra Q, que evalúa el daño al tejido causado por un tipo particular y energía de radiación. Para las partículas alfa, Q puede ser tan alta como 20, de modo que un rad de radiación alfa es equivalente a 20 rems. La Q de la radiación de neutrones depende de su energía. Sin embargo, para las partículas beta, los rayos X y los rayos gamma, Q se toma como uno, de modo que el rad y el rem son equivalentes para esas fuentes de radiación, al igual que el gray y el siévert.

Envenenamiento por radiación: también llamado enfermedad por radiación o síndrome de radiación aguda, el envenenamiento por radiación implica daño al tejido biológico debido a la exposición excesiva a la radiación ionizante. El término se usa generalmente para referirse a problemas agudos causados por una gran dosis de radiación en un período corto, aunque esto también ha ocurrido con la exposición a largo plazo a radiación de bajo nivel. Muchos de los síntomas del envenenamiento por radiación son el resultado de la interferencia de radiación ionizante con la división celular. Beneficiosamente, esta misma interferencia permite el tratamiento de células cancerosas; tales células se encuentran entre las que se dividen más rápido en el cuerpo y, en ciertos casos, pueden destruirse mediante una dosis de radiación que las células normales adyacentes probablemente sobrevivan.

Los síntomas de intoxicación por radiación incluyen: reducción del recuento de glóbulos rojos y/o blancos, disminución de la función inmune (con mayor susceptibilidad a infecciones), náuseas y vómitos, fatiga, esterilidad, pérdida de cabello, quemaduras de tejidos y necrosis, daño gastrointestinal acompañado por sangrado interno, y así sucesivamente.

Terapia de radiación (radioterapia): el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad o afección hiperproliferativa) mediante la exposición de un sujeto o su tejido a una sustancia radiactiva. La radioterapia es el uso médico de la radiación ionizante como parte del tratamiento del cáncer para controlar las células malignas. La radioterapia se puede usar para el tratamiento curativo o adyuvante del cáncer. Se utiliza como tratamiento paliativo donde la cura no es posible y el objetivo es el control local de la enfermedad o el alivio sintomático.

Sujeto: organismos multicelulares vivos, incluidos organismos vertebrados, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos.

Terapéutico: un término genérico que incluye tanto el diagnóstico como el tratamiento.

Cantidad terapéuticamente eficaz: una cantidad de compuesto suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado.

Una cantidad eficaz de un compuesto puede administrarse en una dosis única, o en varias dosis, por ejemplo, diariamente, durante un ciclo de tratamiento. Sin embargo, la cantidad eficaz dependerá del compuesto aplicado, el sujeto a tratar, la gravedad y el tipo de la afección, y la forma de administración del compuesto. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo puede medirse como la concentración (moles por litro o molar-M) del ingrediente activo (como una molécula pequeña, péptido, proteína o anticuerpo) en sangre (*in vivo*) o un tampón (*in vitro*) que produce un efecto. Las cantidades de dosificación exactas variarán según el tamaño y otras características del sujeto a tratar, la duración del tratamiento, el modo de administración, etc.

Transesterificación: una reacción de un éster con un alcohol para formar un nuevo compuesto de éster.

Tratamiento de una enfermedad o trastorno: una frase que se usa para describir una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica o evita que la enfermedad aparezca, progrese o se desarrolle completamente.

En condiciones suficientes para: Una frase que se utiliza para describir cualquier entorno que permita la actividad deseada.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Los términos singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a

menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, B o A y B. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan con fines de descripción. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación, se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

10 III. Descripción general de varias realizaciones

En la presente memoria descriptiva se proporciona un procedimiento para proteger el tejido humano o animal del daño causado por la exposición a la radiación, cuyo procedimiento comprende poner en contacto el tejido con una cantidad eficaz, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz, de un agente que incluye un éster cetónico, protegiendo así el tejido de daño por radiación. En ciertas realizaciones, este procedimiento se emplea como un procedimiento para proteger al personal expuesto a una sustancia radiactiva o radiación ionizante, y el procedimiento comprende poner en contacto el tejido del personal con la cantidad eficaz, tal como la cantidad terapéuticamente eficaz, del agente.

Se contempla en varios ejemplos que el contacto se realiza al menos un día antes, o durante o durante varios días o semanas después de la exposición a la radiación. Por ejemplo, en algunos casos el agente se administra antes de la exposición a la radiación, durante la exposición a la radiación y/o dentro de las dos semanas posteriores a la exposición a la radiación. En otros casos, el agente se administra dentro de días, como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, preferentemente 6 días o más, incluidos 1 a 3 días, 2 a 4 días, antes de la exposición a la radiación, durante la exposición a la radiación, y/o dentro de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más, incluidos 1 a 3 días, 2 a 4 días después de la exposición a la radiación.

En los ejemplos de los procedimientos descritos, la radiación comprende una dosis aguda o crónica de radiación ionizante o no ionizante. Por ejemplo, la radiación ionizante en algunos casos resulta de la fisión nuclear o fusión o de radioisótopos. En otros casos, la radiación ionizante comprende rayos X. En otros casos, la radiación ionizante comprende radionucleidos.

También se contempla que los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son útiles cuando la exposición a la radiación comprende rayos X de diagnóstico, radioterapia, una exploración por tomografía computarizada (CT), una mamografía, una exploración de radionúclidos o un procedimiento radiológico intervencionista bajo CT o guía por fluoroscopia. En otras realizaciones, la exposición a la radiación comprende radionucleidos incorporados en el tejido por la ingestión de alimentos o agua contaminados, exposición no médica o no intencional a la radiación ionizante de un arma nuclear, exposición no médica o no intencional a un derrame radiactivo, y/o radiación cósmica, incluida la exposición a la radiación asociada a vuelos espaciales.

En diversas realizaciones, el agente se administra por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, transdérmica, intranasal o rectal.

En la presente memoria descriptiva, también se proporciona el uso de un agente para reducir, prevenir o tratar el daño celular por radiación, donde el agente es al menos un éster de (R)-3-hidroxi butirato. Los compuestos de éster (R)-3-hidroxi butirato revelados incluyen los ésteres descritos anteriormente para otros aspectos de la divulgación.

40 IV. Compuestos y composiciones radioprotectores

La presente divulgación describe compuestos y composiciones radioprotectores capaces de minimizar, reducir y/o prevenir el daño tisular después de la exposición intencional y accidental a la radiación, así como aumentar la eficacia terapéutica de las terapias de radiación al proteger el tejido no objetivo del daño por radiación incidental. Estos agentes también encuentran aplicación en el aumento de la ablación tumoral en un paciente sometido a radioterapia. También se proporcionan composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un sujeto que sufre, o se cree que sufre, una lesión por radiación, la composición farmacéutica que comprende: una cantidad farmacológicamente eficaz de agente radioprotector, o un análogo funcional del mismo, o composición farmacéutica como se identifica en la presente memoria descriptiva, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona además un procedimiento para tratar o prevenir lesiones por radiación en un sujeto que lo necesita o que potencialmente lo necesita, comprendiendo el procedimiento: administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende: al menos un agente radioprotector que eleva las concentraciones corporales de cetona, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular en el que la lesión por radiación comprende lesión por irradiación.

Se proporcionan particularmente composiciones para el tratamiento de un sujeto que se sospecha que tiene riesgo de exposición a radiación no terapéutica. Este riesgo puede haber sido antes del tratamiento, en el momento del

tratamiento o dentro de unas pocas horas después del tratamiento, según lo establecido para el procedimiento de tratamiento anterior.

5 Los radioprotectores ejemplares descritos en la presente memoria descriptiva incluyen los descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2012/015392, tales como acetoacetato, (*R*)-3-hidroxi-
 10 butirato, sales, ésteres y oligómeros de estos y conjugados de estos con otros restos fisiológicamente aceptables, tales como como carnitina y otros aminoácidos. Otros materiales aceptables son precursores metabólicos de cetonas como (*R*)-1,3-butandiol, triacetina, ácidos grasos libres y triglicéridos. Patentes de Estados Unidos N.º 4,579,955, 4,771,074, 4,997,976, 5,126,373, 5,420,335, 6,207,856 y 6,306,828, Solicitudes Internacionales N.º WO 00/15216, WO 00/04895, y WO 00/14985, Patentes Japonesas N.º JP 5009185, JP 2885261 y Gueldry et al. Alabama. (1994) Metabolic Brain Disease (Enfermedad cerebral metabólica) Vol. 9, N.º 2 se enseñan como que divulgan materiales cetogénicos adecuados.

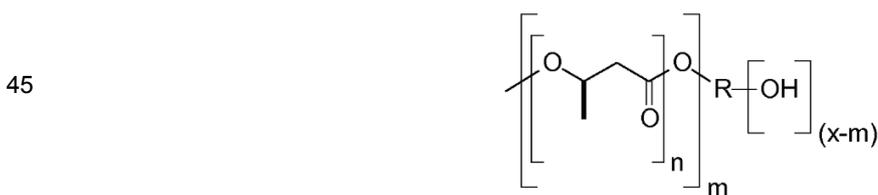
15 Los radioprotectores ejemplares descritos en la presente memoria descriptiva incluyen aquellos ésteres cetónicos, tales como los ésteres de derivados de (*R*)-3-hidroxi-
 20 butirato son los descritos anteriormente.

Los compuestos y composiciones radioprotectores particulares descritos en la presente memoria incluyen derivados de éster de (*R*)-3-hidroxi-
 25 butirato monomérico y derivados de éster u oligómeros no esterificados que incluyen una pluralidad de residuos (*R*)-3-hidroxi-
 30 butirato de acuerdo con las Fórmulas 1 y 2. Con referencia a las Fórmulas 1 y 2, n puede ser cualquier número entero, y usualmente es un número entero de 1 a aproximadamente 100. Más usualmente, n es un número entero de 1 a aproximadamente 10. Una ventaja de las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva es que incluyen compuestos que tienen estructuras definidas. Por ejemplo, las composiciones que contienen compuestos de acuerdo con las Fórmulas 1 y 2 se pueden preparar de manera que los compuestos en una composición dada tengan el mismo número de derivados (*R*)-3-hidroxi-
 35 butirato(n); tales compuestos se denominan compuestos "definidos".

Con referencia a las Fórmulas 1 y 2, R puede ser cualquier grupo alcoxi fisiológicamente compatible. El término "fisiológicamente compatible" se refiere a alcoholes que son sustancialmente no tóxicos cuando se liberan *in vivo* mediante reacciones de escisión de esterasa o éster. Ciertos alcoholes son fisiológicamente compatibles a baja concentración, pero pueden provocar reacciones no deseadas si están presentes a alta concentración. Por ejemplo, el etanol es fisiológicamente compatible a bajas concentraciones, pero no a altas concentraciones. Por lo tanto, los derivados de éster etílico (*R*)-3-hidroxi-
 40 butirato son útiles en las dosis más bajas descritas en la presente memoria descriptiva, pero pueden tener efectos no deseados en las dosis más altas.



Fórmula 1



Fórmula 2

La Fórmula 2, anterior, representa (*R*)-3-hidroxi-
 55 butirato y sus oligómeros esterificados con alcoholes monohidroxílicos o polihídricos para producir nuevos derivados (*R*)-3-hidroxi-
 60 butirato. Los alcoholes polihídricos pueden acilarse en uno o más grupos hidroxilo. Por ejemplo, con referencia a la Fórmula 2, x representa el número de grupos hidroxilo presentes en el alcohol polihídrico, m representa el número de oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-
 65 butirato unidos a R mediante enlaces éster y n representa el número de residuos de (*R*)-3-hidroxi-
 70 butirato por cada oligómero. Por ejemplo, si R es un alcohol que tiene 5 grupos hidroxilo y tres están esterificados con (*R*)-3-hidroxi-
 75 butirato (haciendo n igual a 1), x es 5, m es 3 y x-m es igual a 2.

Con referencia a la Fórmula 2, R puede contener cualquier número (x) de grupos hidroxilo. En varias realizaciones, R es un monosacárido que tiene 4 o 5 grupos hidroxilo. De este modo, en estas realizaciones, R puede tener de 1 a 5 grupos (*R*)-3-hidroxi-
 80 butirato u oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-
 85 butirato unidos mediante un enlace éster. En otras realizaciones, R contiene más de 5 hidroxilos, por ejemplo, cuando R es un derivado de oligosacárido. En realizaciones ejemplares, R es un diol (x igual a 2), tal como 1,2-propanodiol o un triol (x es igual a 3), tal como 1,3-butanodiol, glicerol o treitol. Los compuestos divulgados ejemplares de acuerdo con la Fórmula 2 se describen

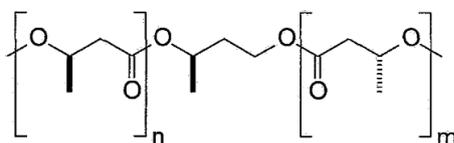
en la Tabla 1, dada a continuación.

Tabla 1

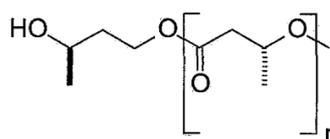
Alcohol/número de hidroxilos (x)	Residuos de (<i>R</i>)-3-hidroxi- <i>butirato</i> (n)	Enlaces éster (m)
(<i>R</i>)-1,3-butanediol / 2	3	1
(<i>R</i>)-1,3-butanediol / 2	3	2
glicerol / 3	3	3
glucosa / 5	1	5
galactosa / 5	5	1
galactosa / 5	3	4
manitol / 6	2	6
sacarosa / 7	1	7
sacarosa / 7	3	7
sacarosa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

En la Fórmula 2, los oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* incluyen el mismo número de residuos de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*; sin embargo, esto no es necesario. Por ejemplo, un derivado de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* puede incluir dos o más oligómeros diferentes que tienen diferentes longitudes.

En ciertas realizaciones, un alcohol polihídrico para incorporación en derivados de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* es (*R*)-1,3-butanediol. Este diol puede acilarse selectivamente con (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y oligómeros del mismo en uno o ambos grupos hidroxilo. Por lo tanto, las realizaciones ejemplares incluyen compuestos de acuerdo con las Fórmulas 3 y 4, mostradas a continuación. Con respecto a la Fórmula 3, n y m pueden ser iguales o diferentes.



Fórmula 3



Fórmula 4

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

En una realización, las composiciones incluyen mezclas de derivados (*R*)-3-hidroxi-*butirato*. Por ejemplo, dos o más derivados de éster (*R*)-3-hidroxi-*butirato* de acuerdo con las Fórmulas 1, 2 o ambos pueden formularse y administrarse en la misma composición.

Las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva usualmente son no tóxicas, estériles y libres de pirógenos, particularmente libres de endotoxinas. Las composiciones pueden formularse en una forma agradable para la administración como un aditivo o suplemento alimenticio. Dichas formas apetecibles son usualmente inodoros o están enmascaradas o recubiertas como conocen los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica. Las formulaciones adecuadas se describen en el documento WO 11/101171. Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir componentes adicionales, tales como vehículos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para estas formulaciones son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19a. edición (1995), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los compuestos aquí descritos.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, saborizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según sea apropiado, que son conocidos por los expertos en la técnica. Los compuestos también se pueden agregar a formulaciones de vitaminas líquidas y bebidas que contienen electrolitos. Las bebidas pueden estar en forma de bebidas energéticas, bebidas deportivas, bebidas de frutas, bebidas cítricas, bebidas gaseosas, mezclas de bebidas secas, otros medios de bebida adecuados o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones en las que los compuestos descritos se administran por vía oral, particularmente cuando se administran como un suplemento nutricional, los compuestos se pueden mezclar con una base alimenticia. Dichas mezclas pueden estar en forma de una emulsión o una mezcla con alimentos sólidos. Por ejemplo, las barras saludables, sin limitación, se pueden preparar combinando varios excipientes, como aglutinantes, rellenos, saborizantes, colorantes y similares, junto con uno o más derivados (*R*)-3-hidroxiturato, y mezclándolos en una masa plástica con consistencia. La masa se extrude o se moldea para formar formas de "barra de caramelo" que luego se secan o se dejan solidificar para formar el producto final.

Para la administración tópica, los compuestos se pueden mezclar, por ejemplo, con un agente de suministro líquido para administración local. Los agentes utilizados terapéuticamente son fácilmente solubles o suspendibles en agua y solución salina, y como tales serían útiles para el suministro ya que el agua o la solución salina no causan efectos adversos en los tejidos biológicos. Esto permite que se administren dosis suficientemente altas localmente o sistémicamente, sin toxicidad secundaria del vehículo de suministro.

En general, las formulaciones se preparan combinando el(los) agente(s) terapéutico(s) de manera uniforme e íntima con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. Posteriormente, si es necesario, el producto se transforma en la formulación deseada. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo parenteral, y en algunas realizaciones es una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijos, triglicéridos de cadena media (MCT) y oleato de etilo también son útiles en la presente memoria descriptiva.

Con el fin de mantener concentraciones elevadas de cetonas en sangre durante un período de 24 horas, se pueden usar formulaciones de liberación retardada. La liberación de los derivados (*R*)-3-hidroxiturato puede controlarse mediante una serie 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-hidroxiturato, como es conocido por los expertos en la técnica. En el caso del éster cetónico preferido de Fórmula I, esto en sí mismo proporciona una generación sostenida de cetosis durante un período de horas.

También se contempla la aplicación de los agentes radioprotectores proporcionados a través de un autoinyector. Por lo tanto, otra realización es la composición farmacéutica que comprende un agente radioprotector descrito que está contenido en un autoinyector. Un autoinyector es un dispositivo médico diseñado para administrar una dosis única de un medicamento en particular (generalmente para salvar vidas), a veces también descrito como una jeringa precargada para autoinyección o inyección por personal no médico.

Los autoinyectores son, por ejemplo, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos N.º 6,149,626, 6,099,504, 5,957,897, 5,695,472, 5,665,071, 5,567,160, 5,527,287, 5,354,286, 5,300,030, 5,102,393, 5,092,843, 4,894,054, 4,678,461 y 3,797,489.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un autoinyector de este tipo útil para el tratamiento de lesiones por (ir)radiación independientemente de si la radiación es emitida por sustancias radiactivas (radioisótopos), tales como uranio, radón y plutonio, o si es producida por fuentes hechas por el hombre, como máquinas de rayos X y radioterapia. También se proporcionan autoinyectores que comprenden una composición farmacéutica que consiste en un agente radioprotector y un excipiente adecuado.

Los agentes terapéuticos también pueden administrarse directamente como parte de un procedimiento quirúrgico u otro procedimiento médico, o al lado de la cama por un médico tratante. El producto de calidad farmacológica puede diluirse, por ejemplo, en solución salina estéril y administrarse mediante inyección con jeringas estériles de 1 cc y agujas de pequeño calibre (calibre 25 y menor) a un sujeto que necesita radioprotección. Alternativamente, un lecho de herida puede irrigarse, por ejemplo, con una solución salina u otra solución terapéuticamente efectiva que contenga una concentración (dosificación) conocida de fármaco o compuesto, o una combinación de los mismos. De este modo, se puede obtener un control preciso y la localización de los efectos terapéuticos.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para una descripción general amplia de los sistemas de administración de proteínas, véase Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems (Péptidos terapéuticos y proteínas: sistemas de formulación, procesamiento y administración), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, 1995. Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas.

Como alternativa, el compuesto puede administrarse en un gel, crema, loción, pomada u otra forma adecuada que se aplica al tejido hasta aproximadamente 90 minutos antes de la irradiación o tratamiento y permanece en el tejido durante y opcionalmente después del tratamiento.

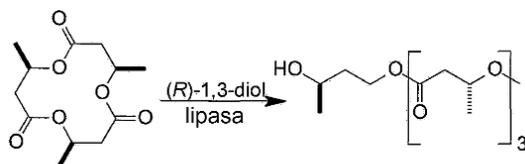
Se pueden usar las mismas dosis y concentraciones cuando el agente radioprotector se administra después de la irradiación y/o el tratamiento radioterapéutico. Las tres administraciones (antes, durante y después del tratamiento de radioterapia) se pueden usar solas o en cualquier combinación de dos o las tres administraciones, según sea necesario.

Los agentes radioprotectores divulgados que incluyen al menos un éster cetónico son estables a temperatura ambiente y pueden almacenarse para su uso en caso de un evento radiológico tal como una bomba nuclear terrorista o un mal funcionamiento de una central nuclear. Por ejemplo, los sujetos expuestos a radiación entre 50 y 400 rad inclusive pueden tratarse con un agente radioprotector divulgado que incluye uno o más ésteres cetónicos a 150 gramos/sujeto/día durante 1 a 5 días o más de 5 días si es necesario. Si los sujetos no son capaces de recibir la administración oral (quemaduras o lesiones muy graves), se les puede administrar un agente radioprotector divulgado, como la sal de sodio de D-β-hidroxitirato, por vía intravenosa.

V. Procedimientos para preparar derivados de (R)-3-hidroxitirato

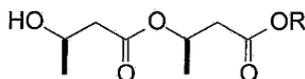
Los derivados de (R)-3-hidroxitirato divulgados utilizados como radioprotectores en la presente memoria pueden producirse usando técnicas químicas, técnicas enzimáticas, organismos transgénicos o combinaciones de los mismos, incluidos los descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º US-2006-0280721-A1. En una realización, los polímeros de (R)-3-hidroxitirato (ácido poli-(R)-3-hidroxitirato), tales como los polímeros naturales, que están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, se convierten en el trímero cíclico (tríolido) favorecido termodinámicamente por el procedimiento de Seebach y colaboradores. Véase, Seebach et al., Eur. J. Biochem. 1994, 224, 317-328; Helv. Chim. Acta 1982, 65, 495-503; y Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992, 31, 434, 435.

El tríolido es un producto intermedio versátil que se puede convertir en varios derivados diferentes de (R)-3-hidroxitirato. Los derivados de éster ejemplares, tales como los de acuerdo con la Fórmula 1 y 2, 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 de éster que se muestra en el Esquema 1, a continuación.



Esquema 1

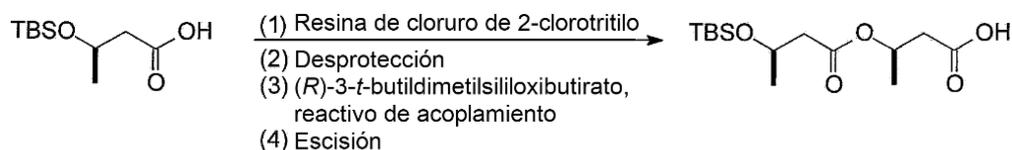
Los procedimientos adicionales para preparar derivados de (R)-3-hidroxitirato incluyen oligómeros lineales esterificantes o transesterificantes de (R)-3-hidroxitirato y oligómeros cíclicos de (R)-3-hidroxitirato transesterificantes que contienen cuatro o más residuos de (R)-3-hidroxitirato. Por ejemplo, los oligómeros de (R)-3-hidroxitirato que tienen una longitud definida pueden producirse por despolimerización enzimática del ácido poli-(R)-3-hidroxitirato. Específicamente, Wang et al. (Biomacromoléculas 2002, 3, 838-834) han reportado condiciones para producir el dímero de (R)-3-hidroxitirato por medio de despolimerización. El dímero de (R)-3-hidroxitirato puede esterificarse con un alcohol para producir, por ejemplo, compuestos de acuerdo con la Fórmula 5.



Fórmula 5

- En una realización, los polímeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* (ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico*), se convierten en (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y/u oligómeros de los mismos mediante despolimerización catalizada por ácido. En un aspecto, la despolimerización se realiza en dióxido de carbono supercrítico que incluye agua como cosolvente. El pH del agua en contacto con dióxido de carbono supercrítico es 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 agregar un catalizador ácido al dióxido de carbono supercrítico para promover la reacción de despolimerización. Los expertos en la técnica conocen catalizadores ácidos adecuados 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, describe un protocolo de transesterificación catalizada con titanio para producir (*R*)-3-hidroxi-*butirato* de etilo a partir de ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico*.
- En otra realización, el (*R*)-3-hidroxi-*butirato* se prepara a partir de acetoacetato de etilo, que está fácilmente disponible en varias fuentes comerciales. Por ejemplo, como saben los expertos en la técnica, el acetoacetato de etilo puede reducirse estereoespecíficamente usando técnicas químicas o enzimáticas para proporcionar el producto (*R*)-3-hidroxi-*butirato* deseado. De manera similar, el acetoacetato de etilo puede reducirse en el carbono carboxilato antes o después de la reducción estereoespecífica para proporcionar (*R*)-1,3-butanodiol. Los beta cetoésteres, como el acetoacetato de etilo, se pueden reducir estereoespecíficamente tanto enzimáticamente, usando, por ejemplo, una deshidrogenasa, y químicamente usando diversos catalizadores, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, Brown et al. J. Org. Chem 1989, 54, 1577-1583; y J. Org. Chem 1989, 54, 4504-4511, describen la reducción estereoespecífica de tales compuestos beta cetoésteres utilizando complejos de alquil borano. Los procedimientos adecuados adicionales que emplean complejos catalíticos de rutenio fueron revisados por Everaere et al. Adv. Sintetizador Catal. 2003, 345, 67-77. En la sección de ejemplos a continuación, se describe un sistema catalítico para preparar enzimáticamente (*R*)-3-hidroxi-*butirato* a partir de acetoacetato de etilo.
- En una realización, los polímeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* se convierten en oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* útiles y derivados de los mismos mediante el uso de catálisis enzimática. Estos procedimientos enzimáticos también se pueden usar para producir productos intermedios de compuestos útiles que contienen (*R*)-3-hidroxi-*butirato*. Por ejemplo, se producen numerosas enzimas de polihidroxi-*alcanoato* despolimerasa en diversas bacterias y se pueden expresar como es conocido por los expertos en la técnica. Para una revisión, véase Jendrossek, D. Extracellular PHA Depolymerases - the Key Enzyme of PHA Degradation (Depolimerasas de PHA extracelulares: la enzima clave de la degradación de PHA). En: Biopolímeros. Parte 3b, Poliésteres, (Steinbüchel y Doi Eds.) págs. 41-83. 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-*alcanoato* *Paucimonas lemoignei* se puede usar para convertir ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico* en (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y oligómeros de los mismos. PhaZ5, por ejemplo, se puede producir a través de la expresión en *Bacillus subtilis*, como lo describen Braaz et al. FEMS Microbiol. Lett. 2002, 209, 237-241. De manera similar, PhaZ7 se puede producir a partir de *Paucimonas lemoignei* como se describe por Handrick et al. J. Biol. Chem 2001, 276, 36215-36224 y Braaz et al. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 224, 107-112, y se utiliza para producir derivados oligoméricos (*R*)-3-hidroxi-*butirato* útiles. Los expertos en la técnica pueden seleccionar la despolimerasa y las condiciones para la despolimerización en función del producto o la mezcla de productos deseados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, es deseable producir oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*, tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y similares, mientras se minimiza la presencia de monómero de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*. PhaZ7, por ejemplo, favorece el pentámero de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*. En ciertas otras realizaciones, el monómero de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* es el producto deseado. Se ha demostrado que los oligómeros y sus derivados éster que contienen siete o menos unidades (*R*)-3-hidroxi-*butirato* producen concentraciones corporales de cetonas en sangre particularmente deseables tras la administración oral. Sin embargo, los octámeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y oligómeros superiores y derivados de los mismos también son útiles como suplementos terapéuticos y nutricionales.
- Los procedimientos para preparar oligómeros superiores de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* pueden emplear técnicas de despolimerización enzimática, como se discutió anteriormente, o pueden usar técnicas convencionales de química sintética. Por ejemplo, el (*R*)-3-hidroxi-*butirato* oligomérico se puede preparar por esterificación iterativa de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* de acuerdo con el procedimiento enseñado por la Patente de Estados Unidos N.º 5,625,030 de Williams et al. Dichos compuestos oligoméricos de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* pueden esterificarse con un alcohol fisiológicamente compatible mediante los procedimientos descritos por Williams y los revisados en Haslam, E. Tetrahedron 1980, 36, 2409-2434. Por lo tanto, los oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* que tienen cualquier longitud se pueden preparar y usarse para producir los derivados terapéuticos de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* descritos en la presente memoria.
- En un ejemplo, se prepara un oligómero de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* como se muestra en el Esquema 2, a continuación. Con referencia al Esquema 2, el derivado de (*R*)-3-*t*-butildimetilsililoxi-*butirato* se puede preparar en las condiciones descritas por Greene y Wuts en: Grupos protectores en síntesis orgánica, 3a ed.; Wiley-Interscience, Nueva York,

(1999). La primera etapa en el Esquema 2 es unir el derivado de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato protegido a un soporte sólido como lo enseñaron Barlos y colaboradores (Barlos et al. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 3947; *ibid.* 3943). La etapa 2 es la desprotección selectiva del derivado sólido de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato unido al soporte. Las condiciones adecuadas para esta reacción incluyen el uso de fuentes de fluoruro como lo enseñan Greene y Wuts, un reactivo ejemplar para esta reacción es TAS-F, que está disponible comercialmente en Aldrich, Milwaukee, Wisconsin (véase, Roush et al. J. Org. Chem. 1998, 63, 6436). Los expertos en la técnica de la química sintética conocen bien otros reactivos adecuados para llevar a cabo la etapa 2 del Esquema 2, incluidas otras fuentes de fluoruro. Con referencia a la etapa 3, un segundo derivado de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato se introduce mediante una reacción de condensación. Las condiciones adecuadas para esta condensación incluyen el uso de un reactivo de carbodiimida, como diisopropilcarbodiimida (DIC) o dicitclohexilcarbodiimida, opcionalmente en combinación con una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP). En la patente de Williams se describen opcionalmente, las etapas 2 y 3 se pueden repetir cualquier número de veces para proporcionar oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato de una longitud deseada. Etapa 4, escisión, implica el tratamiento del derivado sólido de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato unido al soporte con un ácido, usualmente un ácido débil, como el ácido acético. Las condiciones específicas implican tratar el soporte sólido con una mezcla de ácido acético, trifluoroetanol y diclorometano (relación 2:2:6) durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente.



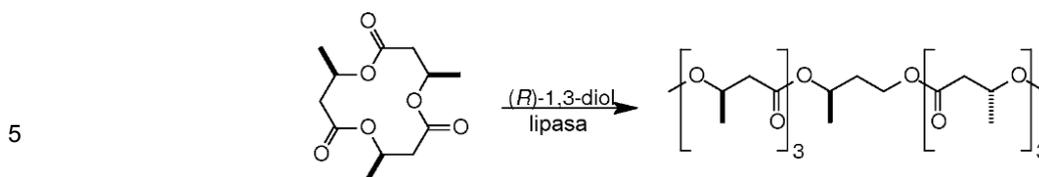
Esquema 2

Uno o más equivalentes del producto proporcionado en el Esquema 2 pueden esterificarse 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-*n*-butirato. La esterificación de los derivados oligoméricos definidos de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato producidos como se describe en la presente memoria descriptiva puede esterificarse como se describe en la solicitud de Patente de los Estados Unidos con N.º de Serie 09/359,086, de Martin et al. Además, la patente de Williams describe numerosas condiciones de esterificación adecuadas, y los expertos en la técnica conocen bien otras condiciones. La eliminación del grupo sililo del compuesto éster resultante usando las condiciones descritas por Greene y Wuts, proporciona el derivado de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato deseado.

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

Los diversos alcoholes para preparar derivados de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato se pueden producir por cualquier procedimiento que proporcione el alcohol fisiológicamente compatible deseado. Se puede producir un alcohol ejemplar, (*R*)-1,3-butanodiol, a partir de (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato por reducción del resto de ácido carboxílico. Los reactivos y procedimientos para reducir el grupo ácido carboxílico se encuentran en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations (Transformaciones orgánicas completas), VCH publishers, 1989, pp. 432-434. Esta vía es particularmente conveniente porque el (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato está fácilmente disponible como un enantiómero único de varias fuentes. Por ejemplo, el (*R*)-3-hidroxi-*n*-butirato se puede producir a través de la despolimerización enzimática de su polímero natural. Para procedimientos ejemplares, véase Shang et al. Appl. Reinar. Microbiol 1994, 60, 1198-1205, y la Patente de Estados Unidos N.º 6,472,188 de Lee et al. El material de partida de ácido poli-*n*-butírico para los procedimientos de despolimerización se puede producir por cualquiera de varios procedimientos, ejemplos de los cuales se enseñan en las Patentes de Estados Unidos N.º 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 tríodo produce el nuevo diol bis-esterificado de acuerdo con el Esquema 3, a continuación. Las vías de reacción del Esquema 1 y el Esquema 3 pueden seleccionarse usando diferentes enzimas lipasa y/o condiciones de reacción variables, tales como concentración de reactivo y estequiometría, como se conoce por los expertos en la técnica.



Esquema 3

10 Usualmente, 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 eficientemente 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
15 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 por solventes orgánicos en productos
farmacéuticos o nutricionales puede ser un problema grave. Por lo tanto, es deseable que los productos
farmacéuticos y nutricionales estén libres de contaminación por solventes, lo que introduce complicaciones y
20 gastos adicionales.

Los intentos previos de usar precursores metabólicos de cuerpos cetónicos, tales como derivados de (*R*)-3-
hidroxibutirato, también han sido infructuosos en parte debido a los procedimientos utilizados para preparar tales
derivados. Los procedimientos actuales para preparar derivados de (*R*)-3-hidroxibutirato también limitan el uso de
25 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 para preparar derivados de (*R*)-3-hidroxibutirato supera los inconvenientes de usar solventes
orgánicos usando fluidos supercríticos, particularmente dióxido de carbono supercrítico como medio de reacción.
30 Los fluidos supercríticos son, por definición, a una temperatura y presión mayores 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 generalmente operan a temperaturas entre aproximadamente 32 °C y
49 °C y presiones entre aproximadamente 7.370 y 24.000 kPa. Los solventes supercríticos, particularmente el
35 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 documento ejemplar para
realizar reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5,783,627
de Kao et al. A diferencia de los solventes orgánicos convencionales, se puede permitir que el dióxido de carbono
se evapore simplemente sin dejar un residuo contaminante. Por lo tanto, el uso de dióxido de carbono simplifica
40 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
45 cosolventes polares y no polares. Los ejemplos de cosolventes orgánicos polares incluyen metanol, etanol,
tetrahydrofurano, acetona y similares. Los ejemplos de cosolventes no polares adecuados incluyen hexanos,
ciclohexano, tolueno y similares.

Tanto los procedimientos enzimáticos como los no enzimáticos para preparar derivados de (*R*)-3-hidroxibutirato
descritos en la presente memoria se pueden realizar en dióxido de carbono supercrítico. Sin embargo, el dióxido
50 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. Por lo tanto, en un aspecto del procedimiento
para elaborar derivados de (*R*)-3-hidroxibutirato, se usan lipasas estabilizadas, tales como lipasas de cristal
enzimático reticulado (CLEC). Ejemplos de procedimientos para fabricar y usar tales lipasas estabilizadas se
describen en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5,618,710 de Navia et al. y 6,211,422 de DeSimone et al.

55 En otro aspecto, las lipasas sensibles al pH se pueden usar dentro de su intervalo de pH efectivo incorporando un
tampón en el sistema solvente. Ellis y Morrison (Methods Enzymol. 1982, 87, 405) y McLellan (Anal. Biochem.
1982, 126, 94) proporcionan ejemplos de sistemas de tampón para intervalos de pH particulares. Los tampones
adecuados adicionales para un intervalo de pH dado son conocidos por los expertos en la técnica.

60 Las lipasas adecuadas para preparar derivados de (*R*)-3-hidroxibutirato se pueden seleccionar en base al derivado
deseado. Por ejemplo, las lipasas pueden seleccionarse para determinar la capacidad de catalizar una reacción
deseada mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 1, a continuación. Las lipasas adecuadas para la detección
para determinar el catalizador óptimo se describen en Whitesides y Wong (1994, Enzymes in Synthetic Organic
Chemistry (Las enzimas en la química orgánica sintética), Elsevier, Oxford), Gross et al., (Chem. Rev. 2001, 101,
65 2097-2124) y Michor et al. (Biotechnology Letters 1996, 18, 79-84). Una fuente de lipasas adecuadas es

Biocatalytics, Inc., Pasadena, CA, que vende un conjunto de detección de lipasas bajo el nombre comercial de "CHIRAZYME". Actualmente se cree que la lipasa pancreática porcina (PPL), la lipasa de *P. cepacia* (lipasa PC) y la lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL) son lipasas particularmente útiles para preparar ésteres de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*.

5 Las lipasas inmovilizadas son útiles para preparar ésteres de (*R*)-3-hidroxi-*butirato*. Las lipasas inmovilizadas proporcionan ventajas en eficiencia, renovación catalítica y facilidad de purificación del producto. Las lipasas se pueden inmovilizar en cualquier sustrato, con ejemplos típicos que incluyen superficies de vidrio u oro, perlas de polímero, sílice, celita y similares. Las Patentes de los Estados Unidos N.º 6,080,402 de Reetz et al. y 6,398,707 de Wu et al., describen técnicas útiles de inmovilización de lipasas.

10 En otras realizaciones, los derivados (*R*)-3-hidroxi-*butirato* descritos en la presente memoria pueden ser producidos, o intermedios a los derivados pueden ser producidos, por microorganismos. Por ejemplo, en una realización, el ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico* se usa como material de partida para producir compuestos de acuerdo con las Fórmulas 1 y 2. Los genes responsables de producir ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico* se han clonado y expresado, y este material puede producirse en varios microorganismos diferentes bajo una variedad de condiciones. Véase, Rhee y Dennis, Appl. Environ. Microbiol 1995, 61, 2487-2492. El ácido poli-(*R*)-3-hidroxi-*butírico* se puede convertir en los compuestos terapéuticos descritos en la presente memoria descriptiva por procedimientos químicos, procedimientos enzimáticos y combinaciones de los mismos. En otra realización, los derivados de poli-(*R*)-3-hidroxi-*butirato* se producen completamente en microorganismos.

VI. Usos terapéuticos

25 El uso creciente de radionucleidos en la medicina nuclear diagnóstica y terapéutica, así como la presencia de radiactividad artificial y natural en el medio ambiente, enfatiza la necesidad de agentes radioprotectores para la protección de células, tejidos y organismos antes, durante, y después de la exposición a la radiación. Los agentes radioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva permiten la supervivencia de los organismos vivos en condiciones letales de exposición a la radiación y proporcionan una reducción del daño celular y tisular por la exposición a niveles no letales de radiación.

30 Los agentes radioprotectores recientemente identificados descritos en la presente memoria descriptiva, administrados antes, durante y/o después de la exposición a la radiación, pueden eliminar o reducir la gravedad de los efectos celulares nocivos causados por la exposición a la radiación ionizante ambiental, como el resultado de una explosión nuclear, un derrame de material radiactivo, muy cerca del material radiactivo y similares. Los agentes también proporcionan una protección espectacular del tejido normal expuesto a la radiación terapéutica utilizada para la terapia contra el cáncer.

35 La presente invención proporciona procedimientos que protegen las células y los organismos vivos de los efectos celulares nocivos al prevenir o eliminar estos efectos o al reducir su gravedad. De acuerdo con la presente invención, los organismos vivos a proteger pueden exponerse con un agente que aumenta los cuerpos cetónicos antes, después o durante la exposición de la célula a la radiación. Las células pueden ser tratadas directamente por el agente radioprotector, tal como aplicando una solución de un agente radioprotector de la divulgación a la célula o administrando un agente radioprotector a un mamífero, como se ha descrito. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden proporcionar un efecto protector en la célula y los organismos vivos que elimina o reduce la gravedad de los efectos celulares perjudiciales que, de otro modo, serían causados por la exposición.

Se reconocerá que cualquiera y todos los folículos de tejido, piel o cabello pueden tratarse o protegerse tópicamente de acuerdo con la presente invención.

50 **Radioprotectores para prevenir o tratar el daño por radiación**

Los agentes radioprotectores de la presente divulgación se pueden usar para minimizar o prevenir el daño de la exposición a la radiación solar experimentado por astronautas, pilotos, otro personal de vuelo y viajeros frecuentes. Los agentes radioprotectores también se pueden utilizar para proteger contra la exposición accidental a la radiación de las instalaciones de energía nuclear, otras instalaciones generadoras de radiación, incluidas las destinadas a la irradiación de alimentos, o como resultado de la detonación de una bomba atómica u otro dispositivo que libera radiación o radioisótopos. Además, se pueden usar para conferir protección al personal involucrado en la limpieza de tales accidentes por radiación o instalaciones de eliminación. Los agentes radioprotectores de la presente invención también son útiles para reducir los efectos tóxicos de los radionucleidos inhalados o ingeridos y para reducir la toxicidad de la radiación producida por dispositivos electrónicos de naturaleza no ionizante de la radiación: tales como teléfonos celulares y microondas.

65 Los procedimientos radiológicos intervencionistas de rápido crecimiento tales como la dilatación de los vasos estenosados, la recanalización o las angioplastias vasculares también se beneficiarían del uso de radioprotectores.

Además, la terapia y las pruebas de diagnóstico que utilizan radiación están prohibidas para las mujeres embarazadas, las mujeres que podrían estar embarazadas y las mujeres capaces de quedar embarazadas para evitar dañar al feto en el útero. Esto a menudo puede impedir el tratamiento o diagnóstico necesario para estas mujeres. Por consiguiente, los agentes radioprotectores que no son tóxicos y altamente efectivos pueden administrarse a tales mujeres para conferir protección a las mujeres y a cualquier posible feto por encima y más allá de cualquier dispositivo de protección mecánica convencional contra la radiación. Esto también puede proporcionar un nivel de seguridad a aquellas mujeres que amamantan a sus bebés.

10 Radioprotectores para mejorar la radioterapia

Además, se cree que los agentes radioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva proporcionan una protección selectiva de las células normales, y no de las células cancerosas, durante la radioterapia contra el cáncer. Por ejemplo, estos agentes, administrados a un paciente con cáncer antes o durante la radioterapia, proporcionarán protección a las células normales, no cancerosas, al tiempo que permitirán que el tratamiento con radiación destruya las células cancerosas. Por lo tanto, los agentes radioprotectores proporcionarían un efecto protector selectivo sobre las células normales en comparación con las células tumorales y eliminarían o reducirían la gravedad de los efectos secundarios perjudiciales u otros efectos secundarios perjudiciales de la radioterapia en las células y tejidos normales.

Por lo tanto, los agentes radioprotectores son útiles para eliminar o reducir la gravedad de los efectos celulares nocivos en las células normales causados por la radioterapia contra el cáncer y las pruebas de diagnóstico que utilizan radiación.

Por ejemplo, el tratamiento de tumores malignos mediante el uso de radiación a menudo está limitado debido al daño a las células no tumorales. El daño a las células no tumorales puede comprometer la eficacia de la radioterapia. La consideración dominante en el establecimiento de las dosis de radiación para la radioterapia contra el cáncer es la evaluación de la tolerancia del tejido u órgano normal más radiosensible en el campo del tratamiento. Esta evaluación, junto con la dosis de radiación esperada requerida para erradicar un tumor, determina la viabilidad de la estrategia de tratamiento y si se debe intentar una cura o paliación. A menudo, las dosis máximas tolerables son insuficientes para erradicar el tumor. Por lo tanto, el uso de un agente radioprotector como los proporcionados en la presente memoria aumentaría en gran medida la dosis tolerable y, por lo tanto, las perspectivas de erradicación de tumores y tratamiento del cáncer.

Más particularmente, se proporcionan en la presente memoria descriptiva procedimientos para proteger las células no cancerosas, o normales, de un mamífero de los efectos celulares nocivos causados por la exposición del mamífero a radiación ionizante. Los agentes radioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva proporcionan protección de las células normales durante la exposición intencional a la radiación, como durante la radioterapia o los procedimientos de diagnóstico, tales como rayos X y tomografías computarizadas. Se cree que las células cancerosas, si están protegidas, están protegidas en menor medida que las células normales. A pesar de una protección moderada *in vitro*, las células cancerosas se vuelven más sensibles a la radiación *in vivo*, lo que resulta en una mayor ablación tumoral por radioterapia. Por lo tanto, los inventores proporcionan procedimientos mediante los cuales los efectos celulares nocivos sobre las células no cancerosas causados por la exposición del mamífero a la radiación se eliminan o reducen en cuanto a gravedad o extensión.

45 VII. Terapias de combinación

El daño inmediato causado por la radiación está mediado por la formación de radicales libres altamente reactivos dentro de la célula, tales como los radicales hidroxilo, peróxido y carbonato. Estos reaccionan rápidamente con macromoléculas sensibles como el ADN para causar daño celular permanente y eventual muerte celular. Los radioprotectores químicos limitan este daño inmediato al neutralizar directamente los radicales reactivos. Los radioprotectores incorporados en la presente divulgación no están dirigidos a este daño químico inmediato, pero permiten que la célula repare el daño inmediato sin desencadenar una respuesta suicida. Por lo tanto, serían útiles las combinaciones de las presentes realizaciones con protectores químicos, tales como tioles, que actúan eliminando directamente los radicales libres. Dicha combinación sería particularmente útil en casos en los que es posible la advertencia anticipada de la exposición a la radiación, pero puede tener menos ventaja después de la exposición, donde los radioprotectores químicos son menos eficaces.

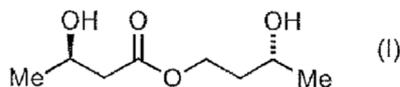
La divulgación anterior se explica adicionalmente por medio del siguiente ejemplo.

60 **Ejemplo**

Este ejemplo demuestra cómo los cuerpos cetónicos protegen los tejidos del daño causado por la radiación ionizante.

Los procedimientos utilizados en los estudios de células cultivadas fueron los mismos que fueron reportados previamente en Miller A.C. et al., Int. J. de Radiation Biol. 1997, 72: 211-18. La composición de éster utilizada fue el mono-*R*-3-hidroxi-butiril-*R*-1,3 butanodiol enriquecido enantioméricamente en la posición 1 de *R*-1,3 butanodiol.

5



10

15

20

25

Se realizaron estudios usando osteoblastos cultivados expuestos a radiación gamma con y sin éster (*R*)-1,3-butanodiol de (*R*)-3-hidroxi-butirato como se describe en la presente memoria descriptiva para determinar el efecto de los ésteres cetónicos en el daño por radiación. La Figura 1 es un par de gráficos que ilustran la radioprotección celular mediante ésteres cetónicos en los que las células de osteoblastos cultivadas en seres humanos se trataron antes o después de la radiación gamma ^{50}Co (0,6 Gy/min) con un éster cetónico. La Figura 2 ilustra la protección cromosómica por los ésteres cetónicos. La Figura 3 es un par de gráficos que ilustran la protección contra la radiación de protones después de la administración de cetonas en las que las células de osteoblastos cultivadas en seres humanos se trataron con radiación pre- o post- protón (4 MeV) con un éster cetónico. La Figura 4 es un gráfico que ilustra la estabilidad del éster cetónico a pH 7. La Figura 5 es un gráfico que ilustra los niveles de metabolitos en sangre del éster cetónico. Los datos presentados muestran que la administración de ésteres cetónicos después de la administración de radiación también aumenta la recuperación celular. Por lo tanto, los estudios actuales indican que las cetonas o sustancias cetogénicas administradas antes o después de la exposición a la radiación causan una disminución dramática en el daño por radiación. Sin limitarse a una teoría particular, se contempla que el metabolismo de las cetonas que aumenta el contenido celular de la acetil CoA, un metabolito esencial necesario para lograr la acetilación por medio de enzimas de histona acetilasa (HAT), posiblemente esté involucrado en el rescate posterior a la irradiación.

30

35

40

45

50

55

60

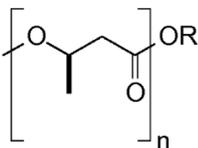
65

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente seleccionado de un éster de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y un oligómero de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* de Fórmula 1 o Fórmula 2, dadas a continuación:

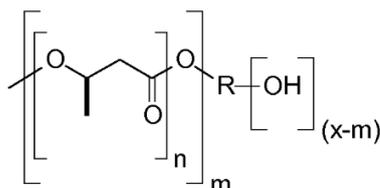
5



10

Fórmula 1

15



20

Fórmula 2

25

en las que R es un residuo de un alcohol polihídrico que tiene x grupos hidroxilo, m representa el número de oligómeros de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* unidos a R mediante enlaces éster y n es el número de residuos de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* por oligómero de 1 a 100;

para su uso en un procedimiento para proteger el tejido animal del daño causado por la exposición a la radiación, que comprende poner en contacto el tejido con una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición, protegiendo así el tejido del daño por radiación.

30

2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se emplea como un procedimiento para proteger al personal expuesto a una sustancia radiactiva o radiación ionizante, que comprende poner en contacto el tejido del personal con la cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente.

35

3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que poner en contacto comprende administrar a un sujeto que lo necesita el agente dentro de las dos semanas previas a la exposición a la radiación, durante la exposición a la radiación, y/o dentro de las dos semanas posteriores a la exposición a la radiación.

40

4. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la radiación comprende una dosis aguda o crónica de radiación ionizante o no ionizante.

45

5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se emplea como un procedimiento para mejorar la ventana terapéutica para la radioterapia en un sujeto, que comprende poner en contacto el tejido del sujeto con la cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente antes de la radioterapia.

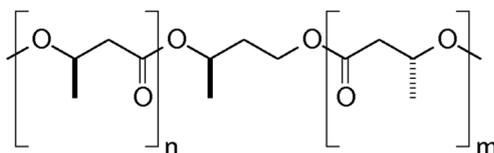
50

6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en la que la exposición a la radiación comprende rayos X de diagnóstico, radioterapia, una exploración por tomografía computarizada (CT), una mamografía, una exploración de radionúclidos o un procedimiento radiológico intervencionista bajo CT o guía por fluoroscopia.

55

7. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el éster es un éster de (*R*)-3-hidroxi-*butirato* y un alcohol seleccionado de 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.

60

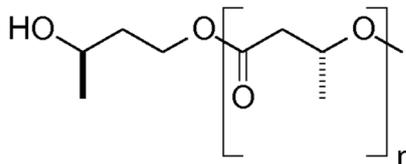


65

en la que n y m son 1 o más.

9. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que el éster de R-3-hidroxibutirato está de acuerdo con la fórmula:

5



10

en la que n es 1 o más.

- 15 **10.** La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el agente se administra por vía tópica, bucal, intraocular, oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, transdérmica, intranasal, rectal, peritoneal o por inhalación.
- 20 **11.** La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la administración del compuesto aumenta la concentración de cuerpos cetónicos en sangre entre 0,1 mM y 20 mM.
- 12.** La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la administración del compuesto aumenta la concentración de cuerpos cetónicos en sangre entre 0,2 mM y 10 mM.
- 25 **13.** La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la administración comprende administrar de aproximadamente 5 gramos a aproximadamente 70 gramos del compuesto.
- 30 **14.** La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la administración comprende administrar de aproximadamente 70 miligramos a aproximadamente 5 gramos por kilogramo del peso corporal del sujeto.
- 35 **15.** La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la administración comprende administrar 130 gramos a aproximadamente 170 gramos por día al sujeto.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

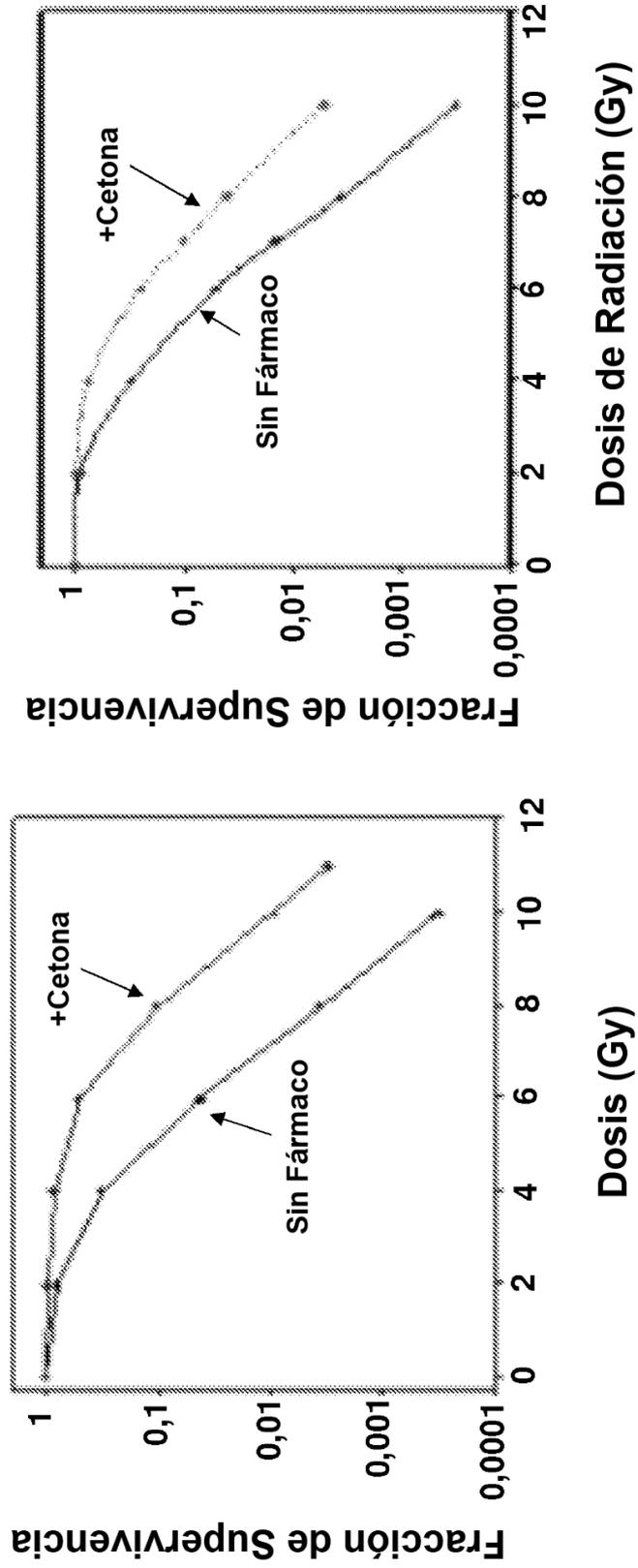
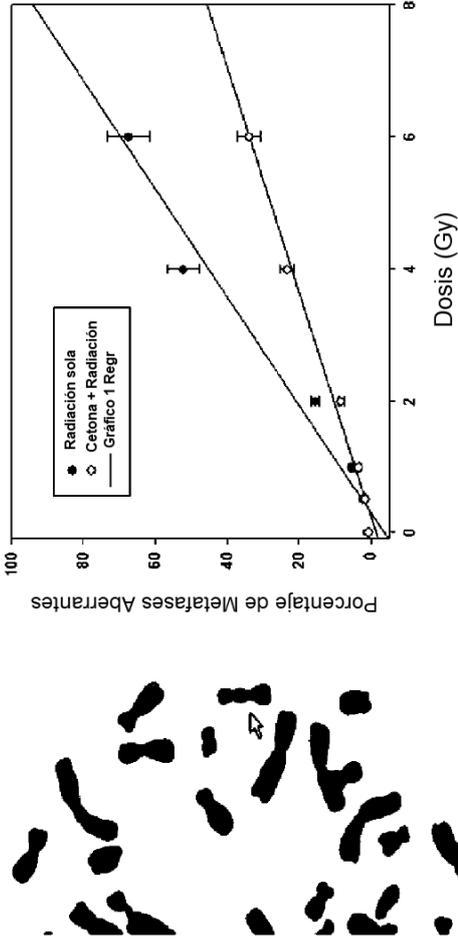
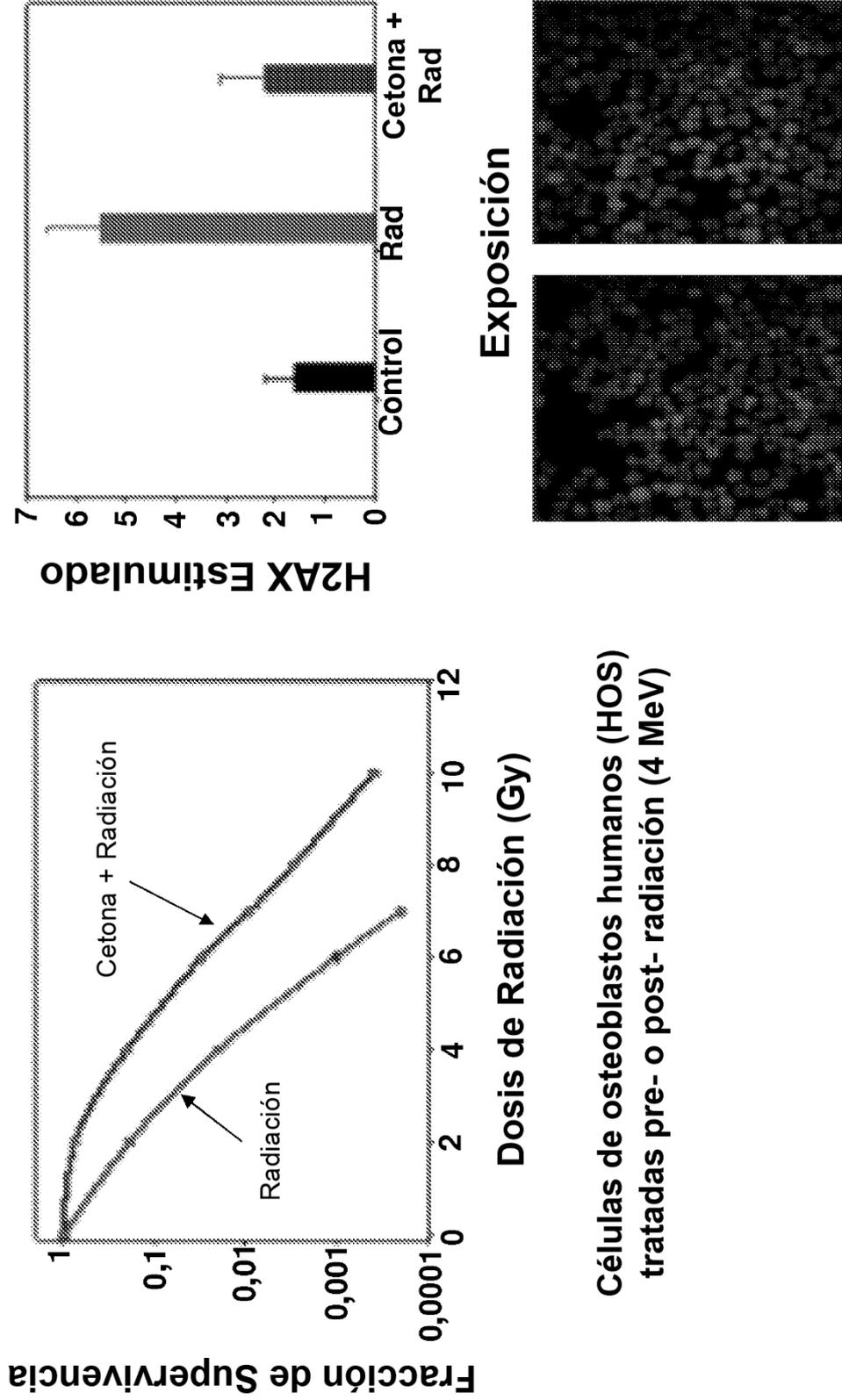


FIG. 2



Dosis (Gy)	Radiación Gamma				Radiación Gamma + Cetona			
	Células Aberrantes (%)	Fragmentos	Rupturas	Anillos + Dicéntricos	Células Aberrantes (%)	Fragmentos	Rupturas	Anillos + Dicéntricos
0	0,66 ± 0,055	0,07 ± 0,0008	0,019 ± 0,002	0,006 ± ---	0,66 ± 0,07	0,007 ± 0,0009	0,016 ± 0,0002	0,00 ± 0,0
1	5,9 ± 0,61	0,11 ± 0,01	0,002 ± 0,0002	0,0013 ± 0,0002	3,1 ± 0,33	0,05 ± 0,006	0,013 ± 0,0002	0,00 ± 0,0
2	14,4 ± 1,22	0,3 ± 0,033	0,006 ± 0,0007	0,0129 ± 0,002	5,0 ± 0,52	0,118 ± 0,022	0,018 ± 0,0002	0,003 ± 0,0004
3	28,5 ± 2,15	0,61 ± 0,05	0,0105 ± 0,002	0,0279 ± 0,003	11,4 ± 1,22	0,23 ± 0,028	0,022 ± 0,0003	0,005 ± 0,0004
4	55,5 ± 5,58	1,1 ± 0,12	0,016 ± 0,002	0,0356 ± 0,004	19,5 ± 1,29	0,30 ± 0,031	0,0039 ± 0,0004	0,017 ± 0,002

FIG. 3



Células de osteoblastos humanos (HOS) tratadas pre- o post- radiación (4 MeV)

FIG. 4

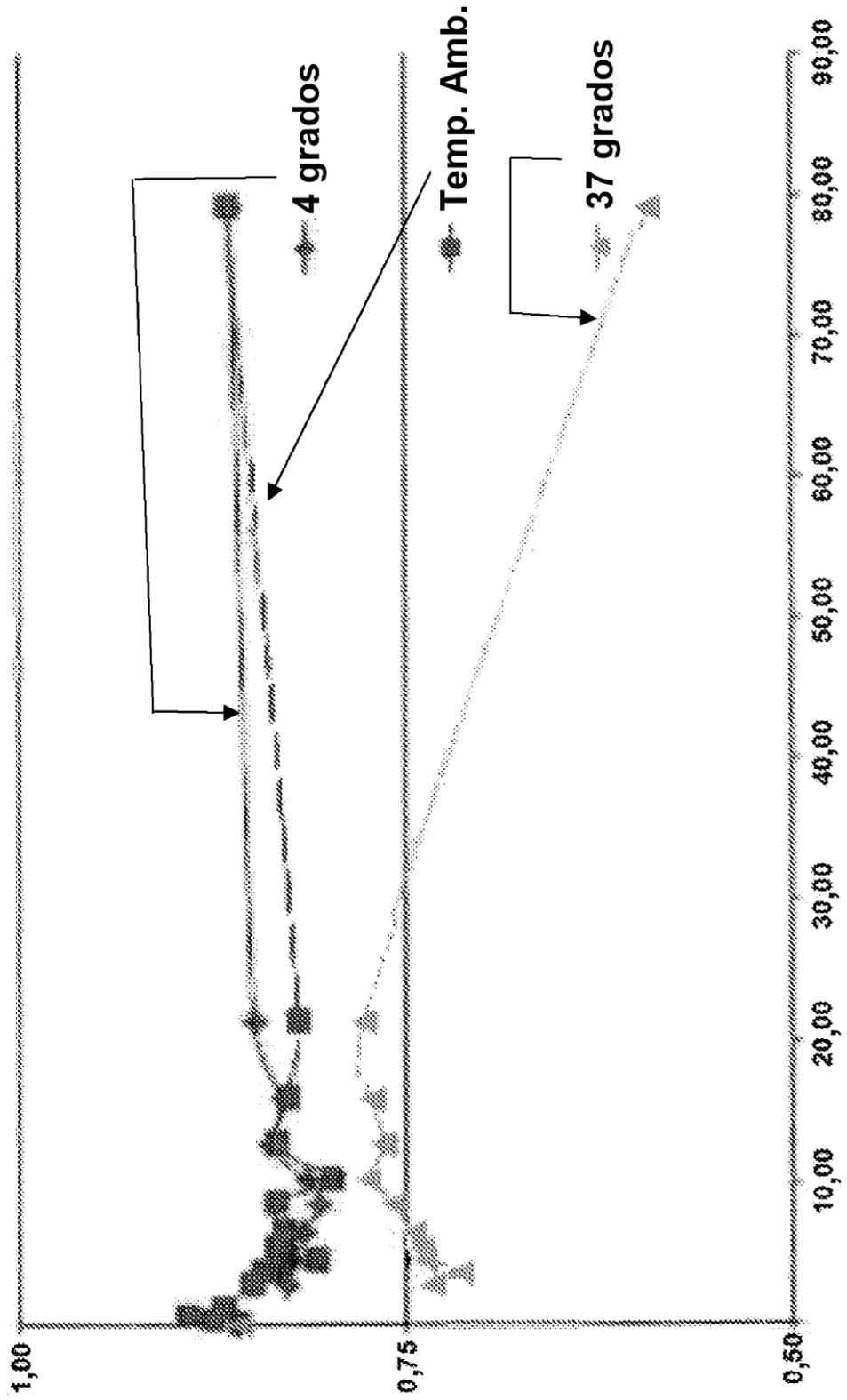


FIG. 5
Estabilidad de Éster Cetónico a pH 7
- efecto de la temperatura

