

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 106**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/201 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61P 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2017 PCT/GR2017/000064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018 WO18083508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2017 E 17808129 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3534891**

54 Título: **Composiciones orales con efecto inmunomodulador sobre células citolíticas naturales**

30 Prioridad:

07.11.2016 GR 20160100572

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

04.10.2022

73 Titular/es:

GELADAKI, VARVARA (100.0%)

13 Kastamonis Street

14121 Neo Iraklio Attikis, GR

72 Inventor/es:

GELADAKI, VARVARA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 924 106 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones orales con efecto inmunomodulador sobre células citolíticas naturales

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones orales para su uso en un método para el tratamiento de abortos espontáneos repetidos (AER) o de fracasos de implantación repetidos (FIR) tras la fecundación *in vitro* (FIV) en mujeres subfértiles con aumento en el número y/o citotoxicidad de células NK.

Antecedentes de la invención

- 10 Las células citolíticas naturales (NK, *natural killer*) son un grupo específico de linfocitos grandes granulares (LGG) que desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias innatas, pero también son importantes al influir en las respuestas inmunitarias adaptativas y en la regulación inmunitaria (Herberman RB. Role of human natural killer cell responses in health and disease. Clin Diagn Lab Immunol 1994;1:125-33). Forman el 1-2 % del tejido linfoide que se encuentra principalmente en el bazo. En la sangre periférica, las células NK constituyen del 5 al 15 % de todos los linfocitos y del 70 al 95 % de los LGG (Stites DP, Terre AI, Parslow TG. Basic and clinical immunology. 8ª edición, Appleton y Lange, Norwalk, Conn, 1994).

- 15 Las células NK expresan en su superficie una serie de marcadores, siendo los más característicos las moléculas CD16 y CD56 (Caligiuri M. Human natural killer cells. Blood. 2008;112:461-9). En función de la expresión relativa de CD16 y CD56, las células NK pueden subdividirse en diferentes subpoblaciones. Los dos subconjuntos principales son CD56dim CD16bright (expresión baja de CD56, expresión alta de CD16) y CD56bright CD16dim/- (expresión alta de CD56, expresión baja o nula de CD16). Las células CD56dim CD16bright, que representan al menos el 90 % de todas las células NK de sangre periférica, tienen función citotóxica. Tras su activación, liberan perforina y granzimas de sus gránulos, mientras se desplazan a lugares de inflamación en respuesta a quimiocinas liberadas durante la inflamación por las células endoteliales e inmunitarias innatas (Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. Cell Death Differ 2008;15:226-33). Las células CD56bright CD16dim/- constituyen la mayoría de las células NK en los tejidos linfoides secundarios, y son solo débilmente citotóxicas antes de la activación, pero, sobre el efecto de las citocinas, inmediatamente producen grandes cantidades de INF- γ y pueden tener propiedades inmunorreguladoras (Poll A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J, CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset Immunology abril de 2009;126(4):458-65). Estas células constituyen la principal población celular de leucocitos endometriales (CD56 eGL: granulocitos endometriales), posiblemente después de la diferenciación local (Hiby SE1, King A, Sharkey AM, Loke YW, Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing, Mol Immunol. Abril de 1997; 34(5):419-30).

- 35 Las células de tipo NK (CD56^{bright} CD16^{dim/-}) son la población dominante de células deciduales desde las primeras etapas del embarazo hasta el primer trimestre. Existen pruebas de que su proliferación y diferenciación está sincronizada con la fase secretora del ciclo menstrual cuando los estrógenos y la progesterona preparan el endometrio para un posible embarazo. Durante esta fase, los leucocitos del estroma uterino aumentan en gran medida (25 % desde el 5 %) como resultado de la afluencia de células NK desde la sangre u otros tejidos o de la reprogramación y diferenciación de las células del estroma endometrial a células NK (Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. Semin Reprod Med 2007; 25:445-53. Santoni A, Carlino C, Gismondi A. Uterine NK cell development, migration and function. Reprod Biomed Online 2008; 16:202-10). Si se produce un embarazo, las células de tipo NK aumentan rápidamente y se distribuyen ampliamente por toda la decidua que se encuentra muy cerca del trofoblasto extraveloso (King A. Uterine leukocytes and decidualization. Hum Reprod Actualización 2000; 6:28-36). Debido a su mayor presencia y contacto directo con el trofoblasto invasor, se han considerado importantes para el establecimiento de un embarazo normal. Existen pruebas de que, coincidente con la implantación y decidualización del blastocisto, las células NK uterinas se activan, producen IFN- γ , perforina y otras moléculas, incluyendo factores angiogénicos, para que puedan controlar la invasión del trofoblasto a través de su actividad citotóxica, y también iniciar la inestabilidad de los vasos y la remodelación de las arterias deciduales para aumentar el suministro de sangre a la unidad fetoplacentaria (Ashkar AA, Di Santo JP, Cray BA. El interferón gamma contribuye al inicio de la modificación vascular uterina, la integridad decidual y la maduración de células citolíticas naturales uterinas durante el embarazo murino normal. J Exp Med 2000;192:259-70). Por otro lado, las células NK deciduales pueden participar en la inmunorregulación mediada por citocinas de la respuesta inmunitaria materna que produce citocinas de tipo Th2 y factores de crecimiento, que dan como resultado el aumento de la placenta y la inmunosupresión e inmunomodulación locales (Clark D, Arck PC, Jallili R, et al. Psycho-Neuro-Cytokine/Endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. Am J Reprod Immunol 1996;35:330-7. Chaouat G, Tranchot Diallo J, Volumenije JL, et al. Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: A (very) personal tribute to Tom Wegmann. Am J Reprod Immunol 1997;37:427-34).

Las células NK deciduales parecen ser la principal población celular implicada en los casos de los llamados abortos aloinmunitarios donde la madre reconoce al embrión como extraño y lo "rechaza" (Labarrere CA. Allogeneic recognition and rejection reactions in the placenta. Am J Reprod Immunol 1989;21:94-9. Stern JJ, Coulam CB: Current status of immunologic recurrent pregnancy loss. Curr Opin Obstet Gynecol 1993;5:252-9). Bajo la influencia de las citocinas de

tipo Th1, se estimulan para convertirse en células NK clásicas que expresan CD16 (CD56^{dim} CD16^{bright}), lo que puede dañar el trofoblasto ya sea directamente al liberar sustancias citolíticas o indirectamente al producir citocinas inflamatorias (King A, Wheeler R, Carter NP, *et al.* The response of human decidual leukocytes to IL-2. *Cell Immunol* 1992;141:409-42).

Los estudios clínicos han demostrado que las mujeres que tienden a abortar tienen un mayor número de células NK del tipo convencional CD3-CD56+CD16+ en el útero. (Vassiliadou N, Bulmer JN: Immunohistochemical evidence for increased numbers of 'classic' CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996;11:1569-74 Kwak JY, Beer AE, Kim SH, *et al.* Immunopathology of the implantation site utilizing monoclonal antibodies to natural killer cells in women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:91-8), así como un aumento de los subconjuntos NK en la sangre y de la actividad de las células NK, todos lo cual se ha asociado al aborto de embriones cromosómicamente normales (Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, *et al.* Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:40-6 Aoki K, Kajjura S, Matsumoto Y, *et al.* Preconceptual natural killer cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-2).

Debido a los datos anteriores, el aumento del número y/o la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica (CD56^{bright} CD16^{dim/-}) se utilizan en la práctica para el diagnóstico de abortos aloinmunitarios y como marcadores para la selección de mujeres para inmunoterapia (Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, *et al.* Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:40-6 Aoki K, Kajjura S, Matsumoto Y, *et al.* Preconceptual natural killer cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-2).

Clásicamente, las principales terapias para reducir la activación perjudicial de las células NK y prevenir abortos y/o FIR han sido la inmunización activa de las mujeres utilizando linfocitos paternos o de terceros (Gaftor U, Sredni B, Segal J, Kalechman Y. Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion. *J Clin Immunol* 1997;17:408-19), y la inmunización pasiva en forma de administración de inmunoglobulina G intravenosa (IgIV) (Ruiz JE, Kwak JY, Baum L, *et al.* Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity *in vivo* in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:370-5). Algunos efectos secundarios o acontecimientos adversos conocidos de la inmunoglobulina intravenosa son: meningitis aséptica, insuficiencia renal, tromboembolia, reacciones hematólicas, reacciones anafilácticas, enfermedad pulmonar, enteritis, trastornos dermatológicos y enfermedades infecciosas (Stiehm, 2013). Un tratamiento alternativo propuesto durante los últimos años para suprimir la citotoxicidad funcional de las células NK, es la administración intravenosa de emulsiones grasas (por ejemplo, Intralipid®) que comprende aceite de soja purificado, fosfolípido de huevo purificado, glicerol anhidro y agua para inyección que se utiliza habitualmente como fuente de energía y de ácidos grasos esenciales en pacientes con trastornos nutricionales o de otro tipo que requieren nutrición parenteral (supresión de la actividad funcional de las células citolíticas naturales mediante inmunoglobulina intravenosa, antígeno leucocitario humano G intralipídico y soluble. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:262-9, Meng L, Lin J, Chen L, Wang Z, Liu M, Liu Y, Chen X, Zhu L). Jeffrey Braverman, "Intralipid Therapy for Recurrent Pregnancy Loss - Controversies and Future Directions 34 th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology 2-5 junio de 2014" describe el tratamiento para la pérdida recurrente de embarazos mediante la administración intravenosa de Intralipid®. El tratamiento con Intralipid® reduce la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica, pero no reduce el número de células NK de sangre periférica. Por otro lado, la infusión intravenosa de Intralipid® puede causar varios efectos secundarios, tales como dolor de vejiga, orina con sangre o turbia, escalofríos, dificultad, ardor o dolor al orinar, fiebre, necesidad frecuente de orinar, lumbalgia o ciática, dolor de garganta y vómitos. Investigaciones recientes han demostrado que la administración intravenosa de Intralipid® puede causar hepatomegalia, ictericia, colestasis, esplenomegalia, trombocitopenia, leucopenia y síndrome de sobrecarga grasa (<1 % en ensayos clínicos) (FDA, 2007).

Tanto el aumento en el número como el aumento de la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica, pueden causar abortos espontáneos recurrentes (*Am J Reprod Immunol.* noviembre de 2007; 58(5):447-59. La disminución del número de células NKT CD3(+) CD56(+) elevado en sangre en respuesta al tratamiento con inmunoglobulina intravenosa se correlaciona con un embarazo satisfactorio, van den Heuvel MJ1, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA; Un aumento del porcentaje de células NK 5 días después de la interrupción del embarazo podría ser un marcador de etiología inmunológica del aborto espontáneo, ya que la probabilidad de que una mujer abortante con NK >12 % tenga un aborto inmunomediado es casi del 90 %. *Am J Reprod Immunol.* Abril de 2008;59(4):306-15. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00547.x. Epub 21 de febrero de 2008).

Se ha demostrado que la medición de las células NK de sangre periférica en el momento del aborto es valiosa y se debe al papel significativo del número elevado de células NK. (Paparistidis N1, Papadopoulou C, Chioti A, Papaioannou D, Tsekoura C, Keramitsoglou T, Kontopoulou-Antonopoulou V, Agapitos E, Balafoutas C, Varla-Lefftherioti M).

Diversos estudios han demostrado que la reducción del número y la actividad de las células NK periféricas da como resultado una mejora importante en la tasa de nacidos vivos que aumenta en niveles muy altos *Am J Reprod Immunol.* Marzo de 2006; 55(3):232-9; High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins (Perricone R1, Di Muzio G, Perricone C, Giacomelli R, De Nardo D, Fontana L, De Carolis C. *Am J Reprod Immunol.* 1 de marzo de 2010;63(3):263-5. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00790.x. Epub 8 de enero de 2010; CD3-CD56+CD16+ natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. Heilmann L1, Schorsch M, Hahn T. *Am J Reprod Immunol.*

Abril de 2007;57(4):262-9; Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. Roussev RG1, Ng SC, Coulam CB.(Am J Reprod Immunol. Nov. de 2007;58(5):447-59; La disminución del número de células NKT CD3(+) CD56(+) elevado en sangre en respuesta al tratamiento con inmunoglobulina intravenosa se correlaciona con un embarazo satisfactorio. Van den Heuvel MJ1, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA).

Los tratamientos mencionados anteriormente, presentan una serie de inconvenientes y desventajas. Por ejemplo, requieren hospitalizaciones repetidas de los pacientes así como vigilancia médica permanente. Por otro lado, dado que los pacientes están hospitalizados, pueden estar expuestos a infecciones nosocomiales. Además, estos métodos están asociados a los riesgos y efectos secundarios de los tratamientos de intervención (incluidos los potencialmente mortales, como la septicemia de los productos derivados de humanos, hipercoagulación por infusiones de emulsión grasa). Además, estos tratamientos están asociados a efectos secundarios graves.

La presente invención aborda estos problemas y proporciona una serie de ventajas en comparación con la técnica anterior.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona composiciones orales que comprenden una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos, para su uso en mujeres que experimentan abortos espontáneos recurrentes (AER) o fracasos de implantación repetidos (FIR) en el entorno de fecundación *in vitro* (FIV) y que han aumentado el número y/o la citotoxicidad de las células NK en la sangre periférica.

Las composiciones de la presente invención comprenden como principios activos una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos y se administran en determinadas cantidades y durante un determinado período de tiempo.

Por consiguiente, la presente invención tiene como objetivo prevenir la subfertilidad inmunomediada en una cohorte considerablemente significativa de parejas que se enfrentan a problemas relacionados, que además de la situación familiar, que las priva de la oportunidad de dar a luz a un niño, podría tener también un considerable impacto social, psicológico y económico.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que una composición oral que comprende una mezcla de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada en determinadas cantidades y durante un determinado período de tiempo, reduce el número y la citotoxicidad de las células NK periféricas en mujeres que experimentan abortos espontáneos recurrentes (AER) o fracasos de implantación repetidos (FIR) y han aumentado el número y/o la citotoxicidad de las células NK en la sangre periférica.

Por tanto, la presente invención proporciona una composición oral que comprende, como principios activos, una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos, para su uso en un método para el tratamiento de abortos espontáneos recurrentes o fracasos de implantación repetidos en una mujer que tiene un 12 % o más de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica y/o en donde la citotoxicidad de las células NK en sangre periférica de la mujer es al menos un 10 % superior a la citotoxicidad media de una población de control de mujeres sanas en edad reproductora sin fracasos reproductores y que han dado a luz al menos a un niño, en donde la composición se administra por vía oral durante 30 a 60 días y en donde la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,10 g/kg de peso corporal a 0,70 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de abortos espontáneos recurrentes o fracasos de implantación repetidos en una mujer que tiene un 12 % o más de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica y/o en donde la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica de la mujer es al menos un 10 % superior a la citotoxicidad media de una población de control de mujeres sanas en edad reproductiva sin fracasos reproductores y que han dado a luz al menos a un niño, que comprende administrar a la mujer una composición oral que comprende, como principios activos, una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos, en donde la composición se administra por vía oral durante 30 a 60 días y en donde la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,10 g/kg de peso corporal a 0,70 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos.

Para evaluar la citotoxicidad de las células NK, se pueden aplicar varios métodos. Aunque la liberación de ⁵¹Cr es el método clásico para determinar la citotoxicidad, se dispone de métodos alternativos disponibles y algunos otros están en etapas de desarrollo. En laboratorios donde el uso de isótopos radiactivos no es deseable o no está permitido, o cuando se usan células diana tumorales que no captan fácilmente el marcador de ⁵¹Cr, podrían emplearse sistemas de prueba que utilicen enzimas y tintes colorimétricos o fluorométricos. Hoy en día, el método más común para la determinación de la actividad de las células NK es la citometría de flujo, un método que puede modificarse con respecto al uso de los reactivos, sin embargo, el resultado sigue siendo el mismo. (Determination of natural killer cell function by flow cytometry. Kimberly I. Kane et al, Clinical and diagnostic laboratory immunology, mayo de 1996, págs. 295-300; Evaluation of a Flow Cytometry-Based Assay for Natural Killer Cell Activity in Clinical Settings, R. Valiathan *et al.* 2011 The Authors. Scandinavian Journal of Immunology).

- Un experto en la técnica aprecia que la citotoxicidad de NK normalmente puede ser inconsistente dentro de un individuo debido a las muchas influencias inmunológicas y endocrinas posibles sobre las células NK. Por lo tanto, se pueden esperar cambios minoritarios en la actividad de NK al realizar pruebas repetidas en individuos sanos. Una población de control diferente podría proporcionar diferentes valores medios de citotoxicidad de NK. Para tener un resultado estadísticamente correcto, cuanto mayor sea el número de muestras de control, mejor. Sin embargo, la presente invención se aplica a mujeres que tienen una citotoxicidad de las células NK de sangre periférica al menos un 10 % más alta que la citotoxicidad media de una población de control de mujeres sanas en edad reproductora sin fracasos reproductores, tales como abortos espontáneos o FIV fallidas, y que han dado a luz al menos a un niño.
- Según la presente invención, la expresión "abortos espontáneos recurrentes (AER)" se define como dos o más pérdidas espontáneas de embarazo antes de la semana 20 de gestación.
- Según la presente invención, la expresión "fracasos de implantación repetidos (FIR)" se define como la ausencia de implantación después de dos ciclos repetitivos fallidos de fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) o ciclos de reemplazo de embriones congelados.
- Según la presente invención, el aumento de la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica se define como cualquier actividad destructora que sea al menos un 10 % superior a la citotoxicidad media de una población de control de mujeres sanas en edad reproductora sin fracasos reproductores, tales como abortos espontáneos o FIV fallidas, y que han dado a luz al menos a un niño,
- La expresión "tratamiento de abortos espontáneos recurrentes o fracasos de implantación repetidos" significa una reducción del riesgo de aborto espontáneo de una mujer tratada en comparación con el riesgo al que habría estado expuesta si no se hubiese tratado, así como una mejora del resultado del embarazo.
- Según la presente invención, la expresión "ácido graso" significa un ácido monocarboxílico alifático que tiene una cadena saturada o insaturada, que comúnmente comprende de 4 a 28 átomos de carbono.
- Según la presente invención, la expresión "ácido graso de cadena larga" significa un ácido graso que tiene una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono.
- Según la presente invención, la expresión "ácido graso de cadena media" significa un ácido graso que tiene una cadena alifática de 6 a 12 átomos de carbono.
- Según la presente invención, la expresión "ácido graso de cadena corta" significa un ácido graso que tiene una cadena alifática de menos de 6 átomos de carbono.
- Las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos. Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos saturados o insaturados de cadena corta, media o larga. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenden ácidos grasos de cadena larga o ácidos grasos de cadena larga y cadena media.
- Como ejemplos de ácidos grasos saturados de cadena larga se incluyen el ácido palmítico, esteárico, mirístico y araquídico.
- Como ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga se incluyen el ácido oleico, docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA), palmitoleico, miristoleico y sapiénico.
- Como ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga se incluyen el ácido linoleico, α -linolénico y γ -linolénico.
- Como ejemplos de ácidos grasos de cadena media se incluyen el ácido láurico, cáprico y caprílico.
- Como ejemplos de ácidos grasos de cadena corta se incluyen el ácido butanoico, 2-metilpropanoico, pentanoico y 3-metilbutanoico.
- Los ésteres de ácidos grasos de las composiciones de la presente invención son ésteres de ácidos grasos con alcoholes alifáticos, tales como alcoholes C₁-C₆, glicéridos, es decir, monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos, fosfolípidos, tales como ácidos fosfatídicos o fosfoglicéridos, esfingolípidos, sacarolípidos, ceras y mezclas de los mismos. Preferiblemente, los ésteres de ácidos grasos son glicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos o sacarolípidos y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, los ésteres de ácidos grasos son glicéridos.
- Según la presente invención, la expresión "calculado como ácidos grasos" significa que cuando la composición comprende ésteres de ácidos grasos, sus cantidades tienen que convertirse en las de los ácidos grasos correspondientes para determinar la cantidad de la composición oral a administrar.
- Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenden al menos un ácido graso de cadena larga saturado, al menos uno monoinsaturado y al menos uno poliinsaturado o un éster de los mismos.

Preferiblemente, en las composiciones de la presente invención, al menos el 50 % en peso de los principios activos, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos de cadena larga o ésteres de los mismos. Más preferiblemente, en las composiciones de la presente invención, al menos el 65 % en peso de los principios activos, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos de cadena larga o ésteres de los mismos. Aún más preferiblemente, en las composiciones de la presente invención, al menos el 97 % en peso de los principios activos, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos de cadena larga o ésteres de los mismos.

Los ácidos grasos de las composiciones de la presente invención actúan como mediadores intracelulares e intercelulares que tienen diversos efectos sobre las respuestas inmunitarias e inflamatorias en las que intervienen las células NK. Los ácidos grasos intervienen a través de varios mecanismos en la modulación del sistema inmunitario, incluidos (i) la fluidez de la membrana; (ii) la producción de peróxidos de lípidos; (iii) la síntesis de eicosanoides; y (iv) la influencia en la regulación génica. Es posible que la inmunomodulación de los ácidos grasos no solo la produzca el individuo, sino también la acción colectiva de estos factores.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender principios activos adicionales, tales como vitaminas, iones metálicos o aminoácidos. Cuando estos principios activos están presentes, su cantidad total es preferiblemente inferior al 6 % de la cantidad total de principios activos. Como ejemplos de vitaminas se incluyen las vitaminas B1, B2, B3, B6, D, mioinositol, inositol y ácido fólico. Los iones metálicos pueden incluir, por ejemplo, selenio, magnesio, cobre, zinc o manganeso. Los aminoácidos pueden incluir aminoácidos naturales, tales como L-arginina o L-glutamina. Las vitaminas, los iones metálicos o los aminoácidos no contribuyen directamente a la disminución del número y/o a la actividad citotóxica de las células NK, sino que contribuyen a las defensas inmunitarias del organismo mediante el soporte de barreras físicas, inmunidad celular y producción de anticuerpos. Sin embargo, existe la creencia de que la hormona esteroide 1,25-dihidroxitamina D3 {1,25-(OH)₂-D3} tiene acción inmunosupresora.

La presencia de vitaminas en las composiciones de la presente invención muestra un efecto inmunomodulador y homeostático al ambiente donde se encuentran las células NK. El objetivo es crear un medio favorable y contribuir a la mejora de todo el proceso reproductor, teniendo una modulación de la respuesta materna manteniendo el sistema inmunitario en equilibrio. Sin embargo, un mayor nivel de vitaminas puede reforzar el sistema inmunitario y aumentar el efecto de las células NK. Por este motivo, cuando en las composiciones de la presente invención hay vitaminas, su cantidad total es preferiblemente inferior al 4 % de la cantidad total de principios activos.

Las composiciones de la presente invención pueden tener cualquier forma adecuada para la administración oral. Dichas formas son muy conocidas por un experto en la técnica e incluyen formas líquidas, tales como soluciones orales, suspensiones orales o emulsiones orales, geles orales o formas sólidas, tales como comprimidos, cápsulas o sobres. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse como suplementos nutricionales.

Además de los principios activos, las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica, tales como aglutinantes, diluyentes, disgregantes, agentes de suspensión, lubricantes, disolventes, emulsionantes, agentes espesantes, agentes tamponantes, conservantes, edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y similares.

Las composiciones pueden producirse mediante procesos bien conocidos por el experto en la técnica.

Las composiciones de la presente invención se administran durante 30 a 60 días. Preferiblemente, las composiciones se administran durante 40 a 50 días.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse una vez al día o más de una vez al día, p. ej., dos veces al día. Sin embargo, según la presente invención, la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,10 g/kg de peso corporal a 0,70 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos. Preferiblemente, la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,20 g/kg de peso corporal a 0,50 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos.

Las composiciones de la presente invención reducen específicamente el número y la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica sin supresión global del sistema inmunitario.

Con la presente invención, tanto la citotoxicidad de las células NK como el porcentaje de células NK en el total de células de sangre periférica permanecen a niveles bajos durante 12-14 semanas después de la interrupción de los tratamientos, logrando una protección y prevención prolongadas de AER o FIR en mujeres subfértiles que tienen un mayor número de células NK de sangre periférica y/o una mayor actividad de las células NK de sangre periférica. Esto representa una gran mejora con respecto a la administración intravenosa de Intralipid[®], en la que el efecto cesa a las 6-9 semanas desde la interrupción del tratamiento (Acacio B, Ng SC, Coulam CB., Am J Reprod Immunol. septiembre de 2008, 60(3):258-63. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00621.x. Duration of intralipid's suppressive effect on NK cell's functional activity Roussev RG). Por otro lado, el tratamiento con Intralipid[®] reduce la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica, pero no se sabe que reduzca el número de células NK de sangre periférica. Por el contrario, la presente invención reduce tanto el número como la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica. Además, infusión intravenosa de Intralipid[®] puede causar varios efectos secundarios tales como dolor de vejiga, orina con sangre o turbia, escalofríos, dificultad, ardor o dolor al orinar, fiebre, necesidad frecuente de orinar, lumbalgia o ciática, dolor de garganta y vómitos, mientras que la presente invención no muestra estos efectos secundarios.

A diferencia de los tratamientos de la técnica anterior, en los que se aplican infusiones intravenosas o subcutáneas (inmunización de linfocitos), con la presente invención las composiciones se administran por vía oral y sus componentes se digieren a través del tubo digestivo y siguen el proceso normal de consumo y absorción de los alimentos. De este modo, el tratamiento de AER o FIR se vuelve más fácil y seguro en comparación con los tratamientos de la técnica anterior. Por otro lado, con la presente invención no hay necesidad de hospitalización ni vigilancia permanente por parte de los médicos y protege a las mujeres de la exposición a infecciones nosocomiales. Además, la presente invención no está asociada a los riesgos y efectos secundarios de los tratamientos de intervención. Por otro lado, con la presente invención, la reducción del número y la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica duran más tiempo después de suspender el tratamiento y se logra una protección prolongada en comparación con los tratamientos de la técnica anterior.

Ejemplos

Los ejemplos 1-4 ilustran el efecto de las composiciones de la presente invención en la reducción del número de células NK periféricas y su actividad (citotoxicidad). Las composiciones se administraron a mujeres sanas en edad reproductora (entre 25 y 46 años) que experimentaron AER o FIR y que tenían un mayor número de células NK de sangre periférica y una mayor actividad de las células NK de sangre periférica. Las muestras de sangre de todas las mujeres se analizaron el día cero antes del inicio del tratamiento, el día 45 y el día 70, según el caso. Todas ellas se sometieron a un control rutinario 12 semanas después de interrumpir el tratamiento.

La determinación de las muestras de sangre periférica con respecto al porcentaje de células NK en las células linfoides totales y la actividad de las células NK se realizó mediante citometría de flujo utilizando técnicas descritas anteriormente. (Determination of natural killer cell function by flow cytometry. Kimberly I. Kane et al, Clinical and diagnostic laboratory immunology, mayo de 1996, págs. 295-300; Evaluation of a Flow Cytometry-Based Assay for Natural Killer Cell Activity in Clinical Settings, R. Valiathan et al. 2011 The Authors. Scandinavian Journal of Immunology). Este método proporciona el porcentaje de células diana destruido por las células citotóxicas naturales presentes en LSP(linfocitos de sangre periférica). Para discriminar entre células efectoras y diana y entre células diana vivas y muertas se utilizan dos colorantes fluorescentes. Uno es un colorante verde fluorescente, perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina (DiO) que se utiliza para marcar las membranas plasmáticas de K562, una línea de células tumorales eritroleucémicas humanas utilizada como población diana. El segundo colorante es yoduro de propidio (PI), un colorante fluorescente rojo, impermeable a la membrana, que se añade durante el ensayo cuando las membranas de las células diana se alteran por células similares a NK. Las células diana intactas, no afectadas por los efectores eran solo positivas (y mostraron solo fluorescencia verde), mientras que las diana destruidas por los efectores con membranas alteradas son doblemente positivas (y presentan fluorescencia verde y roja). Las células efectoras y diana se añaden en tubos para crear diferentes proporciones de célula efectora-diana (E:D), 1:50, 1:25 y 1:12,5. En los siguientes ejemplos, los resultados se presentan en proporciones E:D de 50:1. (Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. Roussev RG1, Ng SC, Coulam CB. Am J Reprod Immunol. Abril de 2007;57(4):262-9).

Las muestras de control eran mujeres sanas en edad reproductora sin fracasos reproductores tales como abortos espontáneos o FIV fallidas y que dieron a luz al menos a un niño. Basándose en la población de control sana, la citotoxicidad media de células NK fue del 19 % en una proporción de 50:1.

Los cambios en la citotoxicidad y el número de células NK desde el día 0 hasta el día 70 se pudieron medir mediante el ensayo mencionado anteriormente. Durante la administración de las composiciones de la invención, el porcentaje medio inicial de actividad y número de células NK disminuyó significativamente después de 45 días y después de 70 días disminuyó cerca de sus niveles iniciales. Una medición repetida después de la administración de las composiciones orales, mostró una disminución significativa tanto del número como de la citotoxicidad de las células NK.

En los ejemplos siguientes, se utilizaron las siguientes abreviaturas:

AGCL- ácidos grasos de cadena larga

AGS - ácidos grasos saturados

AGMI - ácidos grasos monoinsaturados

AGPI - ácidos grasos poliinsaturados

AGCM - ácidos grasos de cadena media.

Ejemplo 1

Se trató un grupo de 15 mujeres una vez al día con la composición oral 1 en forma de solución oral que contenía los principios activos mostrados en la Tabla 1a. Los ácidos grasos de la composición estaban en forma de glicéridos. La cantidad de la composición administrada fue tal que la cantidad total de ácidos grasos administrada al día fue de 0,25 g/kg de peso corporal. Se recogieron y analizaron muestras de sangre antes y 45 días después del inicio del tratamiento.

Tabla 1a

% de sustancias activas			
AGCL 97,64 %	AGS 14,74 %	Ácido mirístico	0,20 %
		Ácido palmítico	4,50 %
		Ácido esteárico	10,04 %
	AGMI 23,39 %	Ácido oleico	21,39 %
		Ácido docosahexaenoico (DHA)	0,50 %
		Ácido eicosapentaenoico (EPA)	1,50 %
	AGPI 59,51 %	Ácido linoleico	49,27 %
		γ -linolénico	0,50 %
		α -linolénico	9,74 %
Vitaminas 1,64 %	B1		0,02 %
	B2		0,02 %
	B3		0,02 %
	B6		0,01 %
	D3 (15 μ g-600 UI)		0,48 %
	Ácido fólico		0,03 %
	Mioinositol		1,06 %
Iones metálicos 0,10 %	Cobre		0,01 %
	Zinc		0,02 %
	Magnesio		0,06 %
	Manganeso		0,01 %
Aminoácidos	L-Glutamina		0,62 %

En la Tabla 1b se muestran los resultados de los números y la actividad de las células NK de sangre periférica.

Tabla 1b: (45 días)

15 Sujetos	Día 0	Día 45	% de disminución media	Día 0	Día 45	% de disminución de actividad media
	Número NK% (media)	Número NK% (media)		Actividad de NK	Actividad de NK	
	20,25	13,59		46,26	18,54	

5

El porcentaje promedio de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica fue de 20,25 el día 0 antes del tratamiento y de 13,59 el día 45 después del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$).

10 La actividad promedio de las células NK de sangre periférica a una proporción de 50:1 fue de 46,26 el día 0 antes del tratamiento y de 18,54 a los 45 días del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$).

Cinco mujeres del grupo mencionado anteriormente continuaron el tratamiento durante un total de 70 días. El día 70 se analizó el número y la actividad de las células NK en la sangre periférica. En la Tabla 1c se muestran los resultados.

Tabla 1c: (70 días)

5 Sujetos	Día 0	Día 70	% de disminución media	Día 0	Día 70	% de disminución de actividad media
	Número NK% (media)	Número NK% (media)		Actividad de NK	Actividad de NK	
	18,42	11,45		46,54	13,60	

15

El porcentaje promedio de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica fue de 18,42 el día 0 antes del tratamiento y de 11,45 a los 70 días del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$).

20 La actividad promedio de las células NK de sangre periférica a una proporción de 50:1 fue de 46,54 el día 0 antes del tratamiento y de 13,60 a los 45 días del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$).

Todas las mujeres tratadas con esta composición están actualmente embarazadas.

Ejemplo 2

El día 0 y 70 se analizó el número y la actividad de las células NK después de la administración de la composición oral 2 una vez al día de un grupo de 6 mujeres. La composición estaba en forma de solución oral que contenía los principios activos mostrados en la Tabla 2a. Los ácidos grasos de la composición estaban en forma de glicéridos. La cantidad de la composición administrada fue tal que la cantidad total de ácidos grasos administrada al día fue de 0,25 g/kg de peso corporal.

Tabla 2a

% de sustancias activas				
AGCL 97,84 %	AGS 11,29 %	Ácido mirístico	3,05 %	
		Ácido palmítico	6,84 %	
		Ácido esteárico	1,40 %	
	AGMI 35,85 %	Ácido oleico	28,85 %	
		Ácido docosahexaenoico (DHA)	1,80 %	
		Ácido eicosapentaenoico (EPA)	5,20 %	
		AGPI 50,70 %	Ácido linoleico	29,28 %
			γ-linolénico	18,69 %
	α-linolénico		2,73 %	
AGCM 2 %		Ácido cáprico	0,50 %	
		Ácido caprílico	0,50 %	
		Ácido láurico	1,00 %	
Vitaminas 0,16 %		D3	0,10 %	
		Ácido fólico	0,03 %	
		Mioinositol	0,03 %	

En la Tabla 2b se muestran los resultados de los números y la actividad de las células NK de sangre periférica.

Tabla 2b

6 Sujetos	Día 0	Día 70	% de disminución media	Día 0	Día 70	% de disminución de actividad media
	Número NK% (media)	Número NK% (media)		NK % Actividad media	NK % Actividad media	
	18,45	12,80		43,32	19	

El porcentaje promedio de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica fue de 18,45 el día 0 antes del tratamiento y de 12,80 el día 70 después del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de p de 0,001).

La actividad promedio de las células NK de sangre periférica a una proporción de 50:1 fue de 43,32 el día 0 antes del tratamiento y de 19 a los 70 días del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de p de 0,001).

Ejemplo 3

En este grupo, se recogieron y analizaron muestras de sangre de 6 pacientes antes y 45 días después de la administración de la composición oral 3 una vez al día. La composición estaba en forma de solución oral que contenía los principios activos mostrados en la Tabla 3a. Los ácidos grasos de la composición estaban en forma de glicéridos. La cantidad de la composición administrada fue tal que la cantidad total de ácidos grasos administrada al día fue de 0,25 g/kg de peso corporal.

Tabla 3a

% de sustancias activas			
AGCL 100 %	AGS 25 %	Ácido mirístico	10 %
		Ácido palmítico	10 %
		Ácido esteárico	5 %
	AGMI 50 %	Ácido oleico	22 %
		Ácido docosahexaenoico (DHA)	6 %
		Ácido eicosapentaenoico (EPA)	19 %
		Ácido miristoleico	0,2 %

		Ácido palmitoleico	2,6 %
		Ácido sapiénico	0,2 %
	AGPI 25 %	Ácido linoleico	12 %
		γ-linolénico	5 %
		α-linolénico	8 %

En la Tabla 3b se muestran los resultados de los números y la actividad de las células NK de sangre periférica.

Tabla 3b

6 Sujetos	Día 0	Día 45	% de disminución media	Día 0	Día 45	% de disminución de actividad media
	Número NK% (media)	Número NK% (media)		NK % Actividad Día 0	NK % Actividad Día 70	
	17,84	12,40		36	16,6	
			30,48			53,88

- 5 El porcentaje promedio de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica fue de 17,84 el día 0 antes del tratamiento y de 12,40 el día 45 después del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0.001$).

- 10 La actividad promedio de las células NK de sangre periférica a una proporción de 50:1 fue de 36 el día 0 antes del tratamiento y de 16,6 a los 45 días del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de p de 0,001).

Tres de las seis mujeres tratadas con esta composición han dado a luz y 2 están embarazadas.

Ejemplo 4

- 15 En este grupo, se recogieron y analizaron muestras de sangre de 8 pacientes antes y 45 días después de la administración de la composición oral 4 una vez al día. La composición estaba en forma de solución oral que contenía los principios activos mostrados en la Tabla 4a. Los ácidos grasos de la composición estaban en forma de glicéridos. La cantidad de la composición administrada fue tal que la cantidad total de ácidos grasos administrada al día fue de 0,25 g/kg de peso corporal.

Tabla 4a

% de sustancias activas			
AGCL 65 %	AGS 6,43 %	Ácido mirístico	1,00 %
		Ácido palmítico	3,00 %
		Ácido esteárico	1,40 %
	AGMI 45,71 %	Ácido oleico	45,71 %
	AGPI 12,86 %	Ácido linoleico	10,03 %
		ácido γ-linolénico	1,93 %
		ácido α-linolénico	1,93 %
AGCM 30,71 %		Ácido cáprico	5,00 %
		Ácido caprílico	8,71 %
		Ácido láurico	17,00 %
Vitaminas 3,06 %		D3	0,80 %
		B1	0,11 %
		B2	0,11 %
		B3	0,13 %
		B6	0,11 %
		Ácido fólico	0,10 %
		Inositol	1,7 %
Iones metálicos 0,83 %		Cobre	0,10 %
		Zinc	0,13 %
		Magnesio	0,50 %
		Manganeso	0,10 %
Aminoácidos 1,04 %		L-Glutamina	0,54 %
		L-Arginina	0,50 %

- 20 En la Tabla 4b se muestran los resultados de los números de las células NK de sangre periférica.

Tabla 4b

8 Sujetos	Día 0	Día 45	Disminución media del 15 %
	Número NK% (media)	Número NK% (media)	
	18,97	14,55	

5 El porcentaje promedio de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica fue de 18,97 el día 0 antes del tratamiento y de 14,55 el día 45 después del inicio del tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (valor de $p < 0.017$).

Cinco de las ocho mujeres tratadas con esta composición oral han dado a luz niños sanos, 2 están actualmente embarazadas después de la semana 25 y 1 ha abortado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición oral que comprende, como principios activos, una combinación de ácidos grasos o ésteres de los mismos, para su uso en un método para el tratamiento de abortos espontáneos recurrentes o fracasos de implantación repetidos en una mujer que tiene un 12 % o más de células NK de sangre periférica en el total de células de sangre periférica y/o en donde la citotoxicidad de las células NK en sangre periférica de la mujer es al menos un 10 % superior a la citotoxicidad media de una población de control de mujeres sanas en edad reproductora sin fracasos reproductores y que han dado a luz al menos a un niño, en donde la composición se administra por vía oral durante 30 a 60 días y en donde la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,10 g/kg de peso corporal a 0,70 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos.
2. Una composición oral para su uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad total de ácidos grasos o ésteres de los mismos administrada al día es de 0,20 g/kg de peso corporal a 0,50 g/kg de peso corporal, calculada como ácidos grasos.
3. Una composición oral para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición se administra durante 40 a 50 días.
4. Una composición oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono, ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 6 a 12 átomos de carbono, ácidos grasos que tienen una cadena alifática de menos de 6 átomos de carbono y mezclas de los mismos.
5. Una composición oral para su uso según la reivindicación 4, en donde los ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono se seleccionan del grupo que consiste en ácido palmítico, esteárico, mirístico, araquídico, oleico, docosahexaenoico, eicosapentaenoico, palmitoleico, miristoleico, sapiénico, linoleico, α -linolénico, γ -linolénico y mezclas de los mismos.
6. Una composición oral para su uso según la reivindicación 4, en donde los ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 6 a 12 átomos de carbono se seleccionan del grupo que consiste en ácido láurico, cáprico, caprílico y mezclas de los mismos.
7. Una composición oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición comprende al menos un ácido graso saturado, al menos uno monoinsaturado y al menos uno poliinsaturado, que tiene una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono, o ésteres de los mismos.
8. Una composición oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos el 50 % en peso de los principios activos de la composición, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono, o ésteres de los mismos.
9. Una composición oral para su uso según la reivindicación 8, en donde al menos el 65 % en peso de los principios activos de la composición, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono, o ésteres de los mismos.
10. Una composición oral para su uso según la reivindicación 9, en donde al menos el 97 % en peso de los principios activos de la composición, calculado como ácidos grasos, son ácidos grasos que tienen una cadena alifática de 13 o más átomos de carbono, o ésteres de los mismos.
11. Una composición oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los ésteres de ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y mezclas de los mismos.
12. Una composición oral para su uso según la reivindicación 11, en donde los ésteres de ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y mezclas de los mismos.
13. Una composición oral para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición comprende además una o más vitaminas, iones metálicos, aminoácidos o mezclas de los mismos.