



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 304 094**

(21) Número de solicitud: **200650014**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/232 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07C 69/587 (2006.01)

C11C 3/02 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO

B2

(22) Fecha de presentación: **13.08.2004**

(30) Prioridad: **18.08.2003 GB 030019358**
14.05.2004 GB 040010846

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2008**

Fecha de la concesión: **17.09.2010**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
19.08.2010

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **14.10.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

(73) Titular/es: **BTG INTERNATIONAL LIMITED**
10 Fleet Place, Limeburner Lane
London EC4M 7SB, GB

(72) Inventor/es: **Harbige, Laurence S.**

(74) Agente: **Polo Flores, Carlos**

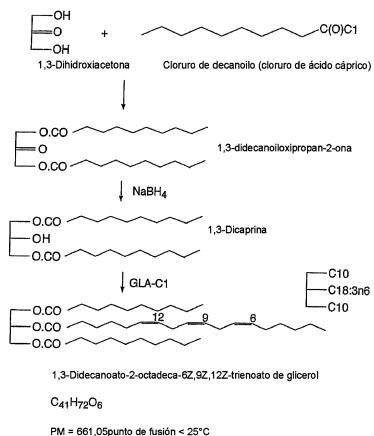
(54) Título: **Tratamiento de dolencias neurodegenerativas.**

(57) Resumen:

Tratamiento de dolencias neurodegenerativas.

Se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un paciente necesitado de terapia para una enfermedad neurodegenerativa, que comprende la administración a ese paciente de una dosis terapéuticamente eficaz de un glicérido lípido que comprende un radical de glicerol y un radical de ácido graso, seleccionándose el radical de ácido graso entre el grupo constituido por ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico y ácido araquidónico, caracterizado porque el radical de ácido graso seleccionado está unido al radical de glicerol en su posición sn-2. Preferentemente, el procedimiento es aquel en el que el lípido se administra durante una duración y con una dosis suficientes como para mantener o elevar los niveles de TGF- β 1 en el paciente hasta niveles terapéuticos.

Fig.6.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de dolencias neurodegenerativas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de dolencias neurodegenerativas, especialmente para el tratamiento de aquellas en las que es beneficioso el aumento el factor de crecimiento transformador β (TGF- β), especialmente el TGF- $\beta 1$. De forma más en particular, la presente invención proporciona tratamiento para dolencias neurodegenerativas, especialmente para aquellas tales como las enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y proporciona tratamiento para las secuelas degenerativas asociadas con trauma craneal, ictus y hemorragias intracraneales, tratamiento por el cual se puede mejorar o restablecer la función neuronal de una dolencia que ha empeorado, por ejemplo mediante remielinización.

10 15 Además, se proporciona el nuevo uso de compuestos conocidos y de compuestos nuevos que comprenden radicales de ácido graso insaturados para la fabricación de medicamentos capaces de tratar de forma eficaz dichas dolencias, más especialmente tratamientos que sean capaces de alcanzar niveles de éxito que anteriormente no se podían alcanzar con respecto a la recuperación de la función neurológica.

20 La solicitud de patente no publicada pendiente de tramitación PCT/GB04/002089 del inventor, incorporada en esta invención a modo de referencia, se refiere al uso de aceites de plantas y de hongos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Estos aceites tienen altos porcentajes del ácido graso esencial ácido γ -linolénico (GLA) en la posición sn-2 de sus lípidos, siendo típicamente el ácido graso en la posición sn-2 alrededor del 40% del total del aceite.

25 En la bibliografía está bien descrito que los ácidos grasos esenciales (AGES) del patrón de insaturación n-3 y n-6 tienen un efecto positivo en una amplia variedad de trastornos fisiológicos humanos, incluyendo enfermedades autoinmunes (WO 02/02105). Harbige (1998), Proc. Nut. Soc. 57, 555-562, revisó el suplemento de la dieta con ácidos n-3 y n-6 en estados de enfermedad autoinmune y notó en particular evidencias del beneficio de los aceites ricos en ácido γ -linolénico (GLA) y/o linoleico (LA).

30 35 Bates y col. señalaron que se había sugerido tiempo atrás en 1957 que los aceites de lípidos que comprenden una mezcla de residuos de ácido linoleico y de ácido γ -linolénico posiblemente eran más eficaces en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, aunque encontraron pacientes que con 3 g de aceite por día (aceite de onagra Naudicelle 7:1 LA:GLA) que tenían recaídas llegaban a estar más enfermos con el aceite de ensayo que con el aceite de control.

40 Aunque la etiología de la EM sigue siendo desconocida, los estudios han mostrado que los pacientes de EM tienen niveles más altos de lo normal de células T autoreactivas hacia neuroantígenos. Estas células T reaccionan *inter alia* a la proteína básica de la mielina (PBM) y a la glucoproteína mielinica de oligodendrocitos (MOG) y están en un estado de activación incrementado comparado con los controles que se encuentran cuando se goza de buena salud. Los procesos existentes de daño axonal, por ejemplo inflamación crónica, desmielinización y astrogliosis en la EM son complejos, aunque se considera que la inflamación de la sustancia blanca y la desmielinización determinan la gravedad de la enfermedad, mientras que estudios recientes sugieren que en la EM el daño axonal comienza en las etapas tempranas de la enfermedad y contribuye a la minusvalía (De Stefano y col., 2001).

45 La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo animal usado con más frecuencia para estudiar los efectos de origen inmune de la EM. Estudios en cobayas han mostrado que el ácido linoleico suprime de forma parcial la incidencia y la gravedad de la EAE (Meade y col. (1978)). (Harbige y col (1995), 1997b) demostraron efectos del ácido linoleico y del ácido γ -linolénico que modifican la enfermedad sobre manifestaciones clínicas e histopatológicas de la EAE. Dependiendo de la dosis, el ácido γ -linolénico fue completamente protector en la EAE aguda de rata, mientras que el ácido linoleico tenía una acción dependiente de la dosis sobre la gravedad clínica, aunque no la suprimía.

50 55 A pesar de estos resultados experimentales, se reconoce que la enfermedad humana, la esclerosis múltiple, es muy compleja y se puede exacerbar y mejorar a la inversa mediante la actividad de las células T y mediante otros factores de respuesta inmune. Se cree que los ácidos grasos n-6 promueven la enfermedad autoinmune e inflamatoria basándose en los resultados obtenidos sólo con ácido linoleico. Se ha demostrado que la producción de TGF- $\beta 1$ y de PGE₂ aumenta de forma no específica en ratones *ex vivo* alimentados con ácido γ -linolénico. Se ha informado que el TGF- $\beta 1$ protege en la EAE aguda y recurrente (Racke y col. (1993); Santambrogio y col. (1993)) y que los inhibidores de la GP, tales como el aumento de la indometacina, empeoran así la enfermedad (Ovadia y Paterson (1982)).

60 65 Las citoquinas están implicadas en la patogénesis de la EM, existiendo muchos estudios que muestran un aumento en las citoquinas inflamatorias mielinotóxicas (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) que coincide con la fase de recaída de la enfermedad. Por el contrario, los niveles de la citoquina anti-inflamatoria e inmunosupresora que transforman el factor de crecimiento transformador beta1 (TGF- $\beta 1$) parecen reducirse durante una fase de recaída y aumentan a medida que el paciente entra en la fase de remisión. Así, el balance entre TGF- $\beta 1$ biológicamente activo y los TNF- α , IL-1 β e IFN- γ proinflamatorios parece estar alterado durante las fases de recaída-remisión de la EM.

5 Durante la fase de recuperación natural de la EAE, el TGF- β 1 que secretan las células T inhibe a las células efectoras de la EAE, el TGF- β 1 se expresa en el SNC y, en la protección inducida mediante tolerancia por vía oral, el TGF- β y el PGE₂ se expresan en el cerebro (Karpus y Swantborg (1991); Khouri y col. (1992)). Harbige (1998) concluyó que los efectos del ácido γ -linolénico dietético sobre la EAE están mediados a través de mecanismos como el de las células Th₃, que implican al TGF- β 1 y posiblemente a través de la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa.

10 Se ha mostrado que el aceite de borraja (típicamente entre el 20% y el 23% de ácido γ -linolénico y entre el 34 y el 40% de ácido linoleico por el 100% de contenido de ácido graso) y el aceite del hongo *Mucor javanicus* (véase la Figura 1) son eficaces en el modelo animal de la EAE usado para identificar candidatos a la EM, aunque nunca ha mostrado ser significativamente eficaz en la enfermedad humana. Niveles elevados de aceite rico en ácido linoleico que contiene niveles bajos de ácido γ -linolénico (EPO: ácido linoleico:ácido γ -linolénico 7:1) suprimieron de forma parcial la incidencia y la gravedad de la EAE en ratas (Mertin y Stackpoole, 1978), mientras que el estudio de Bates con Naudicelle citado anteriormente condujo a un empeoramiento de los pacientes. A pesar del uso de aceite de borraja y de otros aceites que contienen GLA/LA tales como el aceite de onagra por afectados de esclerosis múltiple durante aproximadamente los últimos 30 años, la gran mayoría de los pacientes no se recuperaron de la enfermedad y no mostraron una mejora significativa, continuando con la enfermedad subyacente para progresar hasta la muerte.

20 25 Se ha sugerido el uso, *inter alia*, de aceite de borraja rico en ácido γ -linolénico y en ácido linoleico como medio para proporcionar inmunosupresión en la esclerosis múltiple (documento US 4.058.594). Críticamente, la dosis sugerida es de 2,4 gramos de aceite por día y no se proporciona evidencia real de eficacia. Esto es mucho más bajo que la dosis baja de 5 g/día que se encontró que era ineficaz *in vivo* en hombres en el estudio del documento PCT/GB04/002089.

30 35 Otros tratamientos inmunosupresores más drásticos, incluyendo a destructores y a moduladores de las células T tales como la ciclofosfamida, también han mostrado ser eficaces en el modelo de la EAE, aunque cuando estos se emplean en la enfermedad de esclerosis múltiple humana mejoran los síntomas, pero la enfermedad subyacente continua su avance. De hecho las células T producen citoquinas beneficiosas, tales como el TGF- β 1, así como otras peligrosas para el hombre. David Baker del Instituto de Neurología del Reino Unido, resumió la disparidad entre lo que es eficaz en la EAE y en la EM con un artículo titulado "Everything stops EAE, nothing stops MS" en la reunión de la Sociedad de EM del Reino Unido (UK MS Society) Fronteras de la EM en el Reino Unido (UK MS Frontiers), el 10 de Mayo de 2004.

40 45 Está claro que la inmunosupresión sola no puede curar la EM. Casi con certeza esto se debe a un trastorno metabólico subyacente fundamental en los pacientes con EM, además de la enfermedad autoinmune, que conduce a una anormalidad en la membrana, a la alteración de la citoquina y al posterior ataque inmune y al proceso lesional. Aunque los pacientes vayan en remisión en la enfermedad de recurrencia-remisión, prosigue la desmielinización subyacente.

50 55 El tratamiento "estándar de oro" para la EM sigue siendo el interferón, tal como Avonex[®], Rebif[®] y otros preparados de interferón. Este tratamiento estándar de oro sólo atiende las necesidades de algunos de los pacientes, por ejemplo del 30%, e incluso en esta mejora de los síntomas, el tratamiento se limita a reducir la gravedad de las recaídas. Aunque los síntomas se pueden disminuir en una proporción de los pacientes, la enfermedad tiende a progresar hacia más incapacidad y hacia la muerte debido a la degeneración subyacente.

60 65 En su estudio PCT/GB04/002089 hasta el momento sin publicar, los inventores de la presente invención han determinado de forma sorprendente que de conformidad con un tratamiento con una "dosis elevada" con aceite triglicérido que contenga altos niveles de ácido γ -linolénico sn-2 (siendo > 40% de los residuos en la posición sn-2 de ácido γ -linolénico) con un contenido adecuado de ácido graso acompañante, se pueden alcanzar niveles notables de mejora en casi todos los síntomas de la EM, forma sin igual que se proporciona mediante el presente tratamiento estándar de oro. Dicho éxito es especialmente sorprendente a la luz del uso anterior de otros preparados que contenían ácido γ -linolénico que no tuvieron éxito, tal como en el estudio con Naudicelle.

70 75 El estudio PCT/GB04/002089 muestra que durante un periodo de 18 meses, los pacientes que toman una dosis elevada (15 g/día) de aceite de borraja seleccionada con alto contenido de ácido γ -linolénico sn-2 mostraban mejoras significativas y marcadas ($p < 0,001$) en la puntuación de la EDSS, una tasa reducida de recaída, alivio sintomático de la espasticidad muscular y de los síntomas sensoriales dolorosos y medidas objetivas mejoradas de las funciones cognitivas. Las dosis bajas de 5 g/día de este aceite de borraja no tuvieron efecto.

80 85 Los pacientes que tomaron la dosis más alta de este aceite de borraja mantuvieron su nivel de producción de células mononucleares de sangre periférica (CMSp) de TGF- β 1 durante el periodo de ensayo, sus citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β se redujeron de forma significativa y marcada (< 70%) y mantuvieron o incrementaron ácidos grasos omega-6 de cadena larga de la membrana de producción de CMSp ácido dihomo- γ -linolénico (DHLA) y ácido araquidónico (AA), en contraste con los pacientes que tomaron placebo, que evidenciaron la pérdida de estos ácidos grasos durante el curso del periodo de ensayo.

90 95 Aunque se esperaría que esta inmunosupresión reduciría el aumento del proceso lesional activo y de la neurodegeneración, el tratamiento con aceite con alto contenido de GLA sn-2 aparentemente se dirige al mantenimiento y/o al aumento de componentes clave de la membrana lipídica que de otra forma se pierden específicamente en la EM, siendo

consistente con una corrección de un defecto metabólico que no se trata de forma eficaz de otra manera mediante las terapias actuales. El hecho de que la dosis baja (5 gramos/día) no tuvo efecto sobre esto, respaldó dicha determinación.

Se sabe que el ácido γ -linolénico (18:3n-6, o GLA) se convierte rápidamente en los ácidos grasos poliinsaturados 5 omega-6 de cadena más larga ácido dihomo- γ -linolénico y ácido araquidónico *in vivo* (Phylactos y col. 1994, Harbige y col. 1995, 2000). Por consiguiente, para determinar como aumentar el nivel de ácidos grasos omega-6 de cadena larga 10 de la membrana en la EM, los inventores han revisado sus resultados obtenidos con varios aceites que contenían GLA: tanto aceites de hongos (del hongo *Mucor javanicus*), como de plantas (*Borago officinalis*), de onagra *Oenothera spp.* o de grosella negra *Ribes spp.*, así como de aceite de tri-GLA sintético como sistemas de administración de GLA 15 en un modelo animal experimental *in vivo* de EM conocido como encefalomielitis autoinmune experimental crónica recurrente (CREAE).

La inducción de la EAE en ratas no produce características histológicas de desmielinización (Brosnan y col. 1988), 15 pero induce un patrón de enfermedad monofásica aguda, a diferencia de la EM que se caracteriza por la desmielinización del SNC y porque en la mayoría de los casos es clínicamente del tipo recurrente-remitente. Sin embargo, los modelos de EAE desmielinizante y crónica recurrente (CREAE) se caracterizan por fases de desmielinización y de recaída. Con la demostración de que la glucoproteína mielinica de oligodendrocitos (MOG) es una diana neuroantígenica importante 20 en la EM (Genain y col. 1999) y con la demostración de respuestas mucho mayores de los linfocitos autoreactivos de la sangre periférica a este neuroantígeno, comparado con la PBM, en la EM (Kerlero de Rosbo y col. 1993, 1997) la CREAE inducida por MOG se ha convertido en el modelo animal de elección con características estrechamente parecidas a aquellas observadas en la EM (Fazakarely y col. 1997, Genain y col. 1999, Amor y col. 1994).

Las evidencias procedentes del modelo de CREAE del inventor y de los estudios de alimentación de ratas con 25 EAE indican que un aceite de semilla de grosella negra (72% p/p 18:3n-6, GLA) no protegía frente a la EAE (véase la Tabla 3). Es importante destacar que el aceite de semilla de grosella negra tiene un bajo contenido de GLA sn-2 con la mayoría del GLA en las posiciones sn-1 y sn-3 (Lawson y Hughes 1988). Además, un triacilglicerol estructurado que contiene tres radicales (TG-GLA) proporcionó efectos protectores similares a los del aceite de borraja usado en el modelo de CREAE (Tabla 2). Esto sería coherente con que el GLA sn-2 sea importante, es decir eliminándose la pareja exterior de GLA sn-1 y sn-3 *in vivo* y probablemente sufriendo una oxidación que deja sólo GLA sn-2. Esta hidrólisis selectiva proviene de la capacidad conocida que tienen las lipasas específicas para eliminar los ácidos grasos 30 sn-1 y sn-3 de las moléculas de triacilglicerol, aunque hay una protección aparente de la posición sn-2 *in vivo* (Lawson y Hughes 1988, Kyle 1990).

Esta revisión ha conducido a los inventores a postular que los glicéridos que tienen residuos de ácido γ -linolénico 35 sn-2, de ácido dihomo- γ -linolénico o de ácido araquidónico serán mejores en la corrección del metabolismo de la EM, que incluso el aceite de borraja con alto contenido de ácido γ -linolénico sn-2 de su ensayo anterior. Esto permitiría reducir las dosis de lípido que deben tomarse y/o posiblemente reduciría el tiempo de tratamiento, lo que daría como resultado un efecto beneficioso.

40 La Tabla 3 del documento EP 0520624 (Efamol Holdings) compara el contenido de triglicéridos de aceites de onagra y de borraja, instruyendo al primero para ser más eficaz terapéuticamente que el último para una variedad de trastornos sensibles al GLA. Este documento indica que el aceite de borraja tiene veintisiete componentes de triglicérido diferentes, de los cuales sólo el 20% tiene GLA sn-2. La página 3, en las líneas 40-42, menciona que el ensayo biológico ha mostrado que cantidades iguales de GLA pueden tener de hecho distintos efectos cuando el 45 GLA se suministra como aceite de distintas fuentes. De forma crucial, se dirige entonces al lector a una fracción en particular presente en el aceite de onagra (EPO), aunque no en el aceite de borraja, como que es la responsable del efecto superior del primero en el aumento de PGE1 (véase el gráfico del documento EP 0520624 página 4 y la Tabla 2) y así es la responsable del efecto anti-inflamatorio, identificándose esa fracción como di-linoleoil-mono-gamma-linolénil-glicerol (DLMG), la cual se afirma que es entre el 18 y el 19% del total de triglicérido en el EPO. De forma crítica, la página 6 enseña claramente que la posición del GLA, en sn-1, 2 ó 3, no es importante para este efecto.

50 Dines y col. (1994) en Proceedings of the Physiological Society, Aberdeen Meeting 14-16 Septiembre de 1994, informan sobre estudios de tratamiento de daño neuronal por neuropatía diabética con ácido γ -linolénico que contiene aceites del tipo postulado en el documento EP 0520624 y de nuevo indican que el aceite de borraja no fue muy eficaz en el tratamiento de esta neurodegeneración, mientras que el aceite de onagra sí lo fue. El artículo concluye que el aceite de borraja contiene otros constituyentes que interfieren con la actividad del GLA.

Los inventores de la presente invención ahora tienen la intención de demostrar, a la vista de sus resultados con 55 aceite de borraja con alto contenido en ácido γ -linolénico sn-2, que efectivamente la presencia de un residuo de ácido γ -linolénico sn-2, de ácido dihomo- γ -linolénico o de ácido araquidónico en un glicérido, especialmente en un triglicérido, proporciona eficacia en el tratamiento de la EAE, CREAE y en la enfermedad humana de EM.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un paciente necesitado de terapia para una enfermedad neurodegenerativa que comprende la administración a ese paciente de una dosis 60 terapéuticamente eficaz de un glicérido lípido de estructura definida que comprende un radical de glicerol esterificado con uno o más radicales de ácido graso, caracterizado porque el lípido tiene un radical de ácido graso en la posición sn-2 seleccionado entre el grupo de residuos constituido por residuos de ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico y ácido araquidónico.

ES 2 304 094 B2

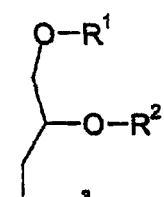
Las enfermedades neurodegenerativas tratadas de forma especialmente ventajosa son aquellas que implican la desmielinización. El procedimiento de la presente invención detiene la neurodegeneración subyacente y restablece la función neuronal. De forma especial, el procedimiento normaliza la composición de la membrana neuronal y restablece las proporciones de TGF- β 1/TNF α liberadas de forma espontánea por las CMSP sanas y restablece las proporciones de TGF- β 1 con otras citoquinas liberadas por las CMSP. Lo más ventajosamente, el procedimiento detiene la neurodegeneración de todos los tipos de la esclerosis múltiple, aunque lo hace especialmente en la EM remitente recurrente, progresiva primaria y progresiva crónica y sirve para el restablecimiento, en parte o de forma completa, de la función neuronal tal como se mide, por ejemplo, mediante escáner IRM o TAC o mediante la puntuación de la EDSS. Dicho procedimiento también se puede usar en el tratamiento del empeoramiento cerebral después de un ictus, de un trauma craneal y de hemorragias intracraneales en los que hay desmielinización o daño neuronal. Además se proporciona aplicación en el tratamiento de otras enfermedades con desmielinización crónica, tales como en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson.

Preferentemente, el lípido se administra durante una duración y con una dosis suficiente como para mantener o elevar los niveles de TGF- β en el paciente hasta niveles terapéuticos. Por niveles terapéuticos se quiere decir niveles al menos muy parecidos con los de los sujetos sanos. Preferentemente, la dosis es tal como para producir una proporción de TGF- β 1/TNF- α liberada de forma espontánea desde las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) aisladas de la sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria, de entre 0,4 y 3,0, al menos 0,5, de forma más preferente al menos 0,75 y lo más preferentemente al menos 1. Preferentemente, la dosis es tal como para producir una proporción de TGF- β 1/IL-1 β en la sangre de un paciente, después de 18 meses de dosificación diaria, de al menos 0,5, más preferentemente de al menos 0,75 y lo más preferentemente de al menos 1. Preferentemente dichos niveles se producen después de 12 meses y más preferentemente después de 6 meses.

Típicamente, la cantidad de lípido administrada diariamente estará entre 0,5 y 30 gramos, dosificados por vía oral, aún más preferentemente entre 1 y 20 gramos y lo más preferentemente entre 1 y 18 gramos, típicamente entre 3 y 5 gramos.

En el caso de que el radical sn-2 sea el de un residuo de ácido γ -linolénico, la dosis puede estar hacia el extremo más alto de estos intervalos, especialmente en el caso de que los radicales sn-1 y sn-3 sean relativamente inertes, por ejemplo siendo ácidos utilizados metabólicamente tales como los ácidos grasos saturados. En el caso de que el radical sn-2 sea el de un residuo de ácido dihomo- γ -linolénico, la dosis puede ser menor, mientras que en el caso de que el radical sn-2 sea el de un residuo de ácido araquidónico, la eficacia es mayor, aunque la dosificación debería ser más cuidadosa, debido a las posibilidades existentes de aparición de efectos secundarios no deseados a niveles más elevados.

De forma más preferible, el procedimiento se caracteriza porque el lípido es un monoglicérido, diglicérido o triglicérido que contiene al menos un radical del ácido γ -linolénico, del ácido dihomo- γ -linolénico o del ácido araquidónico sn-2 de fórmula general I mostrada a continuación:



Fórmula I

en la que

R¹ y R³ se seleccionan de forma independiente entre hidrógeno y grupos acilo, y

R² se selecciona entre el grupo constituido por residuos de ácido γ -linolénico, de ácido dihomo- γ -linolénico y de ácido araquidónico.

Para el propósito de la presente invención, los grupos acilo se definen como aquellos que comprenden al menos un grupo carbonilo sobre el extremo de una cadena de hidrocarburo seleccionado entre cadenas de alquilo y de alquenilo, estando unido directamente el grupo carbonilo mediante su átomo de carbono al oxígeno del residuo de glicerol mostrado en la fórmula I.

Los grupos acilo preferidos R¹ y R³ son radicales de ácido graso saturado de fórmula -CO-(CH₂)_n-CH₃, en la que n es un número entero seleccionado entre 1 y 22, siendo más preferentemente entre 4 y 16, siendo aún más preferentemente entre 5 y 12, siendo lo más preferentemente entre 6 y 10. Los grupos acilo especialmente preferidos son aquellos de los ácidos caprílico y cáprico, siendo especialmente gliceroles de ácido 1,3-dicaprílico o 1,3-dicáprico que tienen el radical de ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico o de ácido araquidónico en la posición sn-2.

Los glicéridos preferidos para uso en la presente invención son los triglicéridos.

El documento US 4701469 describe algunos triglicéridos potenciales para uso nutracéutico que los inventores de la presente invención han determinado que se pueden usar en el procedimiento de la presente invención, aunque dicho documento sólo describe de forma específica triglicéridos de 1,3-dioctanilo en los que el ácido sn-2 es de un AGE, sólo se describe que se ha preparado el 1,3-dioctanoilo eicosapenta glicerol. Se dice que estos son útiles en *inter alia* 5 la inmunomodulación, pero aunque se especifican varias enfermedades, no se incluye el uso en inmunosupresión en la neurodegeneración y en la EM.

Aunque los grupos R¹ a R³ más preferidos para inclusión en el compuesto de fórmula I son ácidos grasos saturados simples o ácidos grasos de origen natural con función estructural o metabólica, tales como ácidos grasos de cadena media o de cadena larga, hay otras posibilidades. Los ácidos grasos especialmente preferidos son aquellos que se utilizan principalmente por parte del metabolismo para producir energía. En el caso de que los ácidos grasos sean estructurales, es decir, que se utilicen en membranas, éstos son de forma conveniente residuos de ácidos tales como ácido γ -linolénico, ácido linoleico, ácido dihomo- γ -linolénico y ácido araquidónico. Por residuo se quiere decir el radical que permanece después de que el grupo carboxilo del ácido graso esterifica a uno de los grupos hidroxi de la 10 molécula de glicerol.

Otros ácidos grasos preferidos para las posiciones sn-1 y sn-3 se seleccionan entre ácidos grasos que se metabolizan en el ser humano para producir energía, en oposición a un ácido graso que se dirige principalmente a la mezcla de la membrana estructural: dichos ácidos preferidos incluyen al ácido oleico y al ácido palmitico.

20 En el caso de que la cadena de ácido graso sn-1 y sn-3 (R¹ y R³) sea insaturada, ésta también puede ser la de otros ácidos grasos esenciales, tales como los ácidos n-3 tales como ácido estearidónico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. En el caso de que el ácido graso esté opcionalmente sustituido, estos estarán sustituidos preferentemente 25 por grupos hidroxi, oxo, carboxilo, alquilo, alquenilo y alcoxi. La cadena de hidrocarburo es preferentemente una de entre 1 y 30 átomos de carbono de longitud, más preferentemente de entre 4 y 28 átomos de carbono de longitud, aún más preferentemente de entre 4 y 24 átomos de carbono de longitud. Lo más preferentemente, la cadena de hidrocarburo es la de un ácido graso, de forma más particular es un ácido graso mono o poliinsaturado.

Muchos de los lípidos preferidos para su uso en el procedimiento de la presente invención se conocen y se pueden 30 preparar mediante procedimientos químicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, muchos se encuentran disponibles comercialmente, tales como la trigamma-linolenina, conocida como TLG, aunque citada en esta invención como GGG, que refleja la identidad de los grupos R¹R²R³, en la que G representa residuos de ácido γ -linolénico.

35 La GGG se encuentra disponible comercialmente en Nu-Check-Prep Inc. El documento EP 0300844 describe su síntesis usando una reacción de transesterificación de triacetina con gamma linolenato de metilo catalizada por una base, para proporcionar una mezcla que contiene el 80% de GGG, γ -linolenato de metilo sin reaccionar y el 10% de mono- y de diglicéridos.

40 La triaraquidina es conocida y se pueden obtener pequeñas cantidades comercialmente por ejemplo de Sigma. La AAA se ha sintetizado a partir de ácido araquidónico mediante el uso de una lipasa inmovilizada patentada para la mejora de la actividad de angiogénesis en el documento US 4888324.

Sin embargo, aunque se pueden usar los di o triglicéridos de ácido tri y di- γ -linolénico, de ácido dihomo- γ -linolénico o de ácido araquidónico, los inventores de la presente invención prefieren el uso del éster sn-2 del ácido mono- γ -linolénico, del ácido dihomo- γ -linolénico o del ácido araquidónico porque administran menos cantidad de los ácidos 45 grasos inmunomodulatorios y proinflamatorios ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico o ácido araquidónico mientras que se retiene la actividad mejorada que proporciona el radical sn-2 del ácido γ -linolénico, del ácido dihomo- γ -linolénico o del ácido araquidónico en lo que respecta al efecto deseado de normalización de la membrana y de modificación de la enfermedad.

50 Los nuevos lípidos que se prefieren están accesibles mediante los procesos y los procedimientos presentados en los ejemplos de esta invención. La mayoría de los lípidos preferidos son aquellos en los que precisamente hay un radical de ácido γ -linolénico, de ácido dihomo- γ -linolénico o de ácido araquidónico individual esterificando al glicerol en la posición sn-2, siendo los ácidos que están en las posiciones sn-1 y sn-3 ácidos de cadena media insaturada o de cadena larga insaturada.

Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona nuevos lípidos descritos en esta invención que incluyen a compuestos de fórmula II



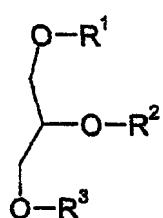
ES 2 304 094 B2

en la que R¹ y R³ son iguales y son -C(O)(CH₂)_nCH₃, en la que n se selecciona entre 4 y 14, más preferentemente entre 6 y 10 y lo más preferentemente entre 7, 8 ó 9 y en la que R² se selecciona entre γ -linolenilo, dihomo- γ -linolenilo y araquidonilo.

5

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula general III

10



15

en la que R¹ y R³ son iguales y son -C(O)(CH₂)_nCH₃, en la que n se selecciona entre 4 y 14, más preferentemente entre 6 y 10 y lo más preferentemente entre 7, 8 ó 9 y en la que R² es un residuo γ -linolenilo, dihomo- γ -linolenilo o araquidonilo

20

que comprende la reacción de 1,3-dihidroxiacetona con un compuesto de fórmula X-C(O)(CH₂)_nCH₃, en la que X se selecciona entre Cl, Br y I,

25

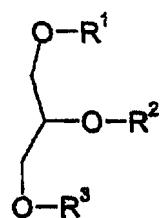
para proporcionar el compuesto 1,3-di-(C(O)(CH₂)_nCH₃)2-ceto correspondiente

la reducción del grupo ceto al 1,3-di-(C(O)(CH₂)_nCH₃)2-ol correspondiente y la reacción de ese con cloruro de γ -linolenilo o con cloruro de dihomo- γ -linolenilo o con cloruro de araquidonilo.

30

Un aspecto aún adicional de la presente invención proporciona un procedimiento para la síntesis de un compuesto de fórmula general IV

35



40

en la que R¹ a R³ son iguales y se seleccionan entre residuo de γ -linolenilo, residuo de dihomo- γ -linolenilo o residuo de araquidonilo

45

que comprende la reacción del cloruro de γ -linolenilo, cloruro de dihomo- γ -linolenilo o cloruro de araquidonilo correspondiente con glicerol.

50

La síntesis de algunos de estos compuestos se describe a continuación y en los esquemas mostrados en las figuras que siguen a continuación.

55

Por ejemplo, se puede llevar a cabo una esterificación de glicerol en una sola etapa que use GLA y un agente de acoplamiento, tal como los reactivos de acoplamiento DCCI/DMAP (1,1-diciclohexilcarbodiimida/4-dimetilaminopiridina). Este procedimiento proporciona un buen rendimiento, aunque genera impurezas que, a menos que se eliminan, hacen que el aceite final esté turbio. Esto se puede evitar mediante el uso de un agente de acoplamiento tal como EDCI (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etylcarbodiimida), que da lugar a subproductos solubles en agua que son más fáciles de eliminar. La Kokai de solicitud de patente japonesa Tokio Koho JP 05310638 A2 del 22 de Noviembre de 1993 Heisei, 6 páginas, describe la preparación de tri- α -linolenina (LnLnLn en la que Ln es ácido linoleico) usando DCCI y una reacción análoga aunque distinta.

60

65

Una propuesta alternativa proporciona una secuencia de dos etapas, que usa la reacción de GLA-Cl (preparado a partir de ácido γ -linolénico y de cloruro de oxalilo) y de glicerol en diclorometano/piridina, con buenos rendimientos, a una escala de hasta 250 g y en el que se purifica mediante cromatografía en columna. La Kokai de solicitud de patente japonesa Tokio Koho JP 04328199 A2 del 17 de Noviembre de 1992 Heisei, 5 páginas (Japón) Concentration of α -linolenic acid triglyceride by flash chromatography. Ando, Yukiki, Watanebe, Yoichi, Takagi, Yoshiaki (Nisshin Oil Mills Ltd, Japón), describe una técnica relacionada, aunque distinta, para la purificación de tri- α -linolenina (LnLnLn).

El ejemplo comparativo con tricaprina (tridecanato de glicerol) es un compuesto conocido disponible comercialmente en Sigma. Éste se ha preparado mediante la reacción de dodecanoato de metilo y de gliceróxido de sodio con la purificación posterior del producto bruto mediante cromatografía en columna (véase E. S. Lutton y A. J. Fehl, *Lipids*, **5**, 90-99 (1970)).

Un procedimiento alternativo implica la reacción catalizada por ácido de glicerol con ácido decanoico seguido por cuatro recristalizaciones (véase L. H. Jenson y A. J. Mabis, *Acta Cryst.*, **21**, 770 (1966)).

El solicitante proporciona además un procedimiento mejorado que permite reaccionar al glicerol con más de 3 equivalentes de cloruro de decanoilo y que permite purificar el producto de tricaprina mediante recristalización.

Los aspectos adicionales de la presente invención proporcionan el uso de aceites triglicéridos tal como se describió anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tal como se expuso en el procedimiento de la presente invención. Los medicamentos especialmente preferidos son para la detención y para la reversión de la neurodegeneración en la EM de todos los tipos, aunque especialmente en la EM de tipo remitente recurrente, progresiva primaria y progresiva crónica y para el restablecimiento, en parte o de forma completa, de la integridad de la función neuronal tal como se mide, por ejemplo, mediante escáner IRM o TAC o mediante la puntuación de la EDSS. Se pueden tratar otras enfermedades sensibles al TGF- β 1 tal como se expuso anteriormente.

Los lípidos para uso en la presente invención se pueden administrar mediante cualquiera de los vehículos conocidos en farmacia. Lo más convenientemente, se administran como aceites puros o en una mezcla con productos alimenticios, en forma de cápsulas que contienen dichos aceites, o en formas recubiertas de forma entérica. A los expertos en la técnica se les ocurrirán otras formas además de las de Remington Pharmaceutical Sciences, 19^a edición.

Los expertos en la técnica se darán cuenta de que se pueden combinar otros agentes beneficiosos con los lípidos para uso en la presente invención o que pueden formar parte de otra manera de un régimen de tratamiento con los lípidos. Estos pueden ser bloqueantes de los canales iónicos, por ejemplo bloqueantes del canal de sodio, interferones (α , β o γ), destructores de células T, esteroides u otros agentes paliativos. Además se comprenderá que en el caso de que se estén modulando las respuestas inmune e inflamatoria, dichas combinaciones necesitarán hacerse de forma cuidadosa, dada la compleja naturaleza de estos sistemas. Sin embargo, dada la respuesta retrasada a los aceites de la presente invención, en los primeros meses de tratamiento pueden ser beneficiosos agentes de acción más rápida antes de que se normalicen los niveles de TGF- β 1, con tal de que el tratamiento adicional no impida este proceso de normalización.

A continuación se describe la síntesis de lípidos estructurados para uso en la presente invención, junto con la síntesis de ejemplos comparativos. Algunos de estos lípidos son nuevos, mientras que otros son conocidos aunque no se han usado para el tratamiento de la presente invención.

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo, sólo mediante referencia a las siguientes tablas, ejemplos y figuras no limitantes. Las formas de realización adicionales que están dentro del alcance de la presente invención se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la luz de estas.

Tablas

- Tabla 1: Muestra la composición del % de contenido de ácido graso total de distintos aceites triglicéridos y el efecto protector en la EAE.
- Tabla 2: Muestra los parámetros de tres grupos de tratamiento en un ensayo con aceite de borraja con alto contenido de GLA sn-2 descrita en el documento PCT/GB04/002089.
- Tabla 3: Muestra el efecto de distintas formas de GLA sobre la incidencia de la EAE y sobre los resultados clínicos en ratones SJL: las puntuaciones más bajas indican un efecto terapéutico mejorado.
- Tabla 4: Muestra el fracaso del aceite de grosella negra, un aceite con alto contenido de GLA, aunque con bajo contenido de GLA sn-2, aceite de planta, para comparar los aceites de hongo y de borraja en la EAE.

Figuras

Figura 1: Muestra la producción espontánea de citoquina de células mononucleares de sangre periférica con un placebo y con un contenido elevado de ácido γ -linolénico sn-2, el aceite de ensayo del documento PCT/GB04/002089 trató a pacientes humanos con EM durante 18 meses.

Figura 2: Muestra el efecto de un placebo y de una dosis baja (5 g/día) de un aceite de borraja con alto contenido de GLA sn-2 sobre la puntuación en la EDSS de pacientes con EM en comparación con el efecto de una dosis elevada (15 g/día) mostrado en forma de histograma con los meses de tratamiento reflejados en el eje x.

Figura 3: Muestra el efecto de un placebo, de una dosis baja y de una dosis elevada de aceite de borraja con alto contenido de GLA sn-2 sobre la tasa media de recaída (%) de pacientes humanos con EM en forma de histograma con los meses reflejados sobre el eje x.

5 Figura 4: Muestra el esquema de reacción para la síntesis de un triacilglicérido de ácido graso individual para su uso en el procedimiento y en el uso de la presente invención.

Figura 5: Muestra el esquema de reacción para la síntesis del compuesto de control tricaprina.

10 Figura 6: Muestra el esquema de reacción para la síntesis de CGC, un triacilglicérido de ácido graso mezclado de la presente invención.

Figura 7: Muestra el esquema de reacción para la síntesis de C-DHGLA-C, un triacilglicérido de ácido graso mezclado de la presente invención.

15 Figura 8: Muestra el esquema de reacción para la síntesis del compuesto de control GCG, 1,3-dicaprilo, ácido 2- γ -linolénico.

20 Figura 9: Muestra el esquema de reacción para la síntesis de C-AA-C, un triacilglicérido de ácido graso mezclado de la presente invención.

Las Figuras 10 a 19 muestran los resultados de los estudios de la EAE en ratones SJL y C57BL, tal como se expuso en los ejemplos anteriores. (DHLA=DHGLA: A=AA)

25 Ejemplos

Ensayo con aceite de borraja con alto contenido de sn-2 (documento PCT/GB04/002089)

30 Veintiocho pacientes de esclerosis múltiple (con edades que variaban entre los 18 y los 65 años) del tipo remitente-recurrente activo (dos recaídas en los 18 meses anteriores) se metieron en un ensayo controlado mediante placebo, doble ciego, para investigar los efectos de aceite de borraja encapsulada sobre la actividad clínica y sobre parámetros de laboratorio durante 18 meses. Este aceite era de alto contenido en ácido γ -linolénico (GLA) sn-2 (siendo > del 40% de los residuos sn-2 ácido γ -linolénico) con bajo contenido en moneno (por ejemplo, ácido erúsico) y no tenía vitamina E añadida, un conocido inmunomodulador.

35 Los pacientes se reclutaron entre pacientes ambulatorios de neurología de clínicas en dos hospitales de ciudad; el consentimiento informado del hospital se obtuvo en la primera visita (visita inicial). Los criterios de exclusión incluyen cualquier forma de tratamiento con fármaco de esteroides o inmunosupresor, embarazo, hiperlipidemia, uso habitual de aspirina o de fármacos relacionados y suplemento con vitaminas o con ácidos grasos dentro de los tres meses anteriores.

40 Sólo se incluyeron en el ensayo los pacientes que reunían todos los criterios que se muestran a continuación: (a) pacientes capaces de proporcionar consentimiento informado antes del tratamiento, con pleno conocimiento de que podrían ser retirados en cualquier momento sin perjuicio; (b) pacientes ambulatorios hombres o mujeres de entre 18 y 60 años, inclusive; (c) pacientes que tienen un diagnóstico confirmado de EM de tipo recurrente definido clínicamente; (d) pacientes que han tenido al menos tres recaídas clínicas documentadas en los dos años anteriores; (e) pacientes que tienen una puntuación inicial en la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS) de entre 0,0-5,5 ambos inclusive, a condición de que tengan exacerbaciones bien documentadas y (f) pacientes sanos, aparte de los síntomas relacionados con la EM, tal como se confirma mediante la historia clínica, el examen físico y mediante las pruebas de química clínica, de orina y hematológicas.

50 Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria por parte del Departamento de Farmacia entre uno de los tres grupos siguientes, conteniendo cada grupo 12 pacientes:

- 55 • Un grupo clínico (n= 12) para recibir placebo (5 g de polietilenglicol 400)
- Un segundo grupo clínico (n= 12) para recibir una dosis baja (5 g) de aceite de *Borago officinalis* refinado
- 60 • Un tercer grupo clínico (n= 12) para recibir una dosis alta (15 g) de aceite de *Borago officinalis* refinado

65 El suplemento estaba en forma de cápsulas de un gramo de aceite administradas diariamente (5/día para las de dosis baja y 15/día para las de dosis alta) durante una duración de 18 meses. El aceite de *Borago officinalis* y los ácidos grasos omega-6 poliinsaturados son ingredientes alimentarios que son generalmente reconocidos como seguros (GRCS) para el consumo humano. Bajo las reglamentaciones de la CE no hay requisitos de clasificación o de etiquetado. La evaluación clínica incluyó: Puntuaciones en la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS) y registro de las recaídas clínicas. Se obtuvo sangre venosa (50 ml) para estudios de laboratorio en los meses 1°, 3°, 6°, 12°, 15° y 18° de administración del suplemento.

ES 2 304 094 B2

Se investigaron los siguientes parámetros bioquímicos e inmunológicos en cada visita para la comparación con los datos previos al tratamiento y para la comparación de los datos entre los grupos:

- Producción estimulada y no estimulada de citoquinas de células mononucleares de sangre periférica *ex vivo*: cambios en TGF- β 1, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- β , que están implicados en la patogénesis de la EM. Citoquina y expresión genética relacionada.
- Moléculas de adhesión en su forma soluble en suero, especialmente ICAM-1 y VCAM-1
- Composición de los ácidos grasos de membrana de células mononucleares de sangre periférica y de los ácidos grasos de fosfolípidos en plasma.

Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2 y en las Figuras 1 a 5.

El parámetro clínico principal fue el número de recaídas clínicas entre la línea base (mes 0) y el final del tratamiento (mes 18). Los parámetros clínicos secundarios incluían: el tiempo hasta la primera recaída; la gravedad de las recaídas tal como se evalúa mediante la puntuación EDSS y mediante el uso de tratamiento con esteroides e incluían además los cambios en la EDSS en los meses 3, 6, 9, 12 y 18 comparado con el mes inicial y definido como al menos un aumento de 1,0 puntos en la EDSS que se mantiene durante 3 meses o un aumento de al menos 1,5 puntos en la EDSS desde la EDSS inicial que se mantiene durante 3 meses.

Once pacientes estaban en el grupo de placebo, siete pacientes habían estado tomando una dosis baja de aceite de borraja y diez pacientes habían estado tomando una dosis alta de aceite de borraja. El estudio con fármaco se toleró bien y no hubo eventos adversos serios durante el ensayo de 18 meses.

Aislamiento y cultivo de CMSP

La sangre total heparinizada se diluyó con un volumen igual de solución salina equilibrada de Hanks (Sigma, Reino Unido) y la sangre diluida resultante se depositó sobre Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega). Después de la centrifugación en gradiente de densidad a 800 g durante 30 minutos, las CMSP se retiraron de la interfase y se diluyeron con solución de Hanks. A continuación se lavaron las células dos veces mediante centrifugación a 250 g durante 10 minutos. A continuación, el sedimento final resultante se puso de nuevo en suspensión en un medio de cultivo constituido por medio RPMI-1640 (Sigma, Reino Unido) suplementado con L-glutamina 2 mM, 100U de penicilina y 100 μ g de estreptomicina (Sigma, Reino Unido) y con 10% de plasma antólogo. Se añadieron 2×10^6 CMSP por ml, > del 95% viables tal como se juzgó mediante la exclusión con azul de tripano, a los tubos de cultivo de tejido (Bibby Sterilin Ltd, Stone, Reino Unido) y se incubaron durante 24 h a 37°C con el 5% de CO₂. La concentración de antígeno, la densidad celular y el tiempo de cultivo se determinaron todos en experimentos cinéticos anteriores para determinar la producción de citoquinas máximas (datos no mostrados). Los preparados de citospina de rutina también se prepararon para los contajes diferenciales posteriores. Después de la incubación, las células se retiraron del cultivo mediante centrifugación a 250 g durante 10 minutos, a continuación se retiraron los sobrenadantes resultantes, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -70°C.

Preparación de muestras de plasma

Se centrifugaron a 250 g 10 ml de sangre heparinizada durante 10 minutos. A continuación, se retiró la capa de plasma resultante, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -70°C.

Detección de citoquinas proinflamatorias

Se detectaron TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo celular y en el plasma usando anticuerpos apareados disponibles comercialmente que permiten la detección de citoquinas en un formato ELISA (R & D systems Ltd, Abingdon, Reino Unido). Las sensibilidades en los kit de ELISA para TNF- α e IFN- γ fueron de 15,6-1000 pg/ml y de 3,9-250 pg/ml para IL-1 β .

Detección de TGF- β 1 biológicamente activo

El TGF- β 1 biológicamente activo en los sobrenadantes del cultivo celular y en el plasma se detectó usando el sistema ELISA E_{max} disponible comercialmente, con una sensibilidad de 15,6-1000 pg/ml (Promega, Southampton, Reino Unido).

Ánalisis estadístico

Las diferencias en la producción de citoquinas se compararon usando la prueba T de Student y usando la prueba U de Mann-Whitney y se consideraron significativas cuando los valores de p fueron menores de 0,05.

Resultados

Dos pacientes habían desarrollado diarrea y más tarde se confirmó que ambos habían tomado la dosis alta del aceite de borraja. En un paciente la diarrea fue suave, aunque en el segundo paciente fue moderadamente grave, el cual 5 suspendió más tarde el fármaco de estudio. El código de tratamiento no se rompió y después de suspender el fármaco la diarrea había desaparecido, aunque reapareció después de una nueva dosis de provocación. Por lo tanto, este paciente se retiró del ensayo. Los pacientes restantes que se trataron con dosis alta de aceite de borraja mostraron una mejora clínica excelente en todos los criterios de los parámetros clínicos primarios y secundarios. Por ejemplo, su puntuación 10 EDSS media después de 6 meses de tratamiento había mejorado desde la puntuación EDSS inicial (Figura 1). De forma más importante, el número medio de recaídas clínicas se había reducido de forma significativa después de 6 meses de tratamiento cuando se comparó con el número de recaídas en el grupo de placebo (Figura 2). Por el contrario, los pacientes que habían recibido una dosis baja de aceite de borraja no muestran ninguna mejora clínica cuando se 15 comparan con el grupo de placebo. Además de su efecto beneficioso sobre la actividad de la enfermedad de EM, la dosis alta de aceite de borraja proporcionó algún alivio sintomático en la espasticidad muscular (agarrotamiento) y en los síntomas sensoriales de dolor y también mejoró las funciones cognitivas.

Tal como se puede ver para las figuras que siguen a continuación, la tasa de recaídas después de 9, 12 y 18 meses se redujo a cero en el grupo de dosis alta. El aumento visto a los 15 meses se debió al paciente que abandonó este grupo.

20 Lo siguiente son tres resúmenes de historial clínico para ilustrar los beneficios terapéuticos de la dosis alta de aceite de borraja con alto contenido de GLA sn-2. Los dos primeros provienen del ensayo, mientras que el tercero es un paciente post ensayo del que se obtuvieron estudios mediante IRM.

25 Paciente 1

Tratamiento

30 El primer paciente fue una mujer de 48 años que había tenido una EM remitente recurrente, clínicamente activa, durante 9 años. La mujer había trabajado anteriormente como administradora a tiempo completo en la autoridad sanitaria local, aunque fue incapaz de llevar a cabo sus responsabilidades debido a su enfermedad de EM grave. Por tanto, la mujer trabajó más tarde como secretaria a tiempo parcial, aunque aún tenía dificultades de movimiento 35 debido al agarrotamiento de los músculos y a los trastornos sensoriales. También experimentó varias recaídas clínicas graves a un promedio de una recaída cada nueve meses. La mayoría de estas recaídas habían acarreado como resultado hospitalizaciones para recibir terapia con esteroides. A la vista de su enfermedad de EM activa, se reclutó a esta mujer para el ensayo con aceite de borraja. No hubo eventos adversos relacionados con el estudio y después de tomar la medicación durante cuatro meses, la mujer experimentó una buena mejoría en sus síntomas para andar y en sus síntomas sensoriales.

40 Aproximadamente nueve meses después de la terapia, esta mujer se encontró lo suficientemente bien como para comenzar un trabajo a jornada completa. Además, la mujer permaneció libre de recaídas durante los 18 meses de duración del ensayo clínico. Después de la finalización del ensayo, el código de tratamiento reveló que la mujer estaba tomando la dosis alta de aceite de borraja.

45

Paciente 2

Control

50 El segundo caso fue una mujer de 46 años que también había tenido una EM remitente recurrente, clínicamente activa, durante 8 años. En un principio la mujer había trabajado como dependiente, pero se quedó sin empleo después de que se le diagnosticó la EM.

55 Sus síntomas incluían dificultad con la movilidad y síntomas sensoriales de dolor en ambas piernas. La mujer había experimentado tres recaídas clínicas en los dos años anteriores al ensayo clínico y había sido hospitalizada dos veces para recibir terapia con esteroides. Por lo tanto, se reclutó a esta mujer en un ensayo clínico con aceite de borraja, aunque su capacidad para andar continuó deteriorándose. A los seis meses de empezar el ensayo clínico, la mujer necesita usar un bastón para caminar y también recibió tratamiento con Baclofen para reducir la espasticidad de los miembros inferiores. Aproximadamente diez meses después de comenzar el ensayo clínico con aceite de borraja, la mujer fue hospitalizada debido a una recaída clínica grave, que se trató con esteroides. Más tarde, la mujer desarrolló trastornos de vejiga y comenzó a usar una silla de ruedas para hacer recorridos largos. El código de tratamiento se rompió después de la finalización del ensayo clínico de 18 meses y se encontró que la mujer había estado tomando placebo. Desde entonces, la mujer comenzó a usar un andador para recorridos mayores de 45,72 m (50 yardas).

Paciente 3

Tratamiento (adicional al ensayo clínico)

5 El tercer caso fue un hombre de 26 años al que se le había diagnosticado EM definitiva en Abril de 2001. Sus síntomas habían comenzado en 1999 cuando el hombre se quejó de dolor intratable, difuso, que afectaba a distintas partes de su cuerpo, especialmente el lado izquierdo del pecho y del abdomen. Esto fue seguido por entumecimiento intermitente en las manos y en los pies, asociado con debilidad fluctuante. También hubo síntomas angustiosos de vejiga en la forma de frecuencia urinaria y de urgencia. El diagnóstico de EM en 2001 se basó en estos síntomas
 10 remitentes recurrentes y se confirmó mediante análisis positivo del fluido cerebroespinal y mediante imagen por resonancia magnética (IRM) del cerebro, que mostró múltiples anormalidades en la sustancia blanca en los dos hemisferios cerebrales. Los síntomas no respondieron a distintas terapias farmacéuticas.

15 En Abril de 2003, se inició el suplemento con el aceite de borraja de dosis alta de la presente invención. El paciente informó de una mejoría espectacular en sus síntomas en el espacio de tres meses desde el comienzo de su suplemento por vía oral. Sus síntomas sensoriales de dolor desaparecieron por completo. El hombre no informó ni de entumecimiento ni de debilidad desde Mayo de 2003 y experimentó una mejora significativa en el control de su vejiga. El suplemento por vía oral no causó eventos adversos. Se repitió una IRM del cerebro para verificar la mejora informada en los síntomas del Sr. N. La IRM repetida mostró una reducción en el tamaño y en la distribución de las
 20 anormalidades de la sustancia blanca.

Ejemplos25 *Lípidos sn-2 estructurados*

En todos los ejemplos que siguen a continuación, se obtiene una pureza más alta mediante el uso de un material de partida de ácido γ -linolénico, dihomo- γ -linolénico o araquidónico de una pureza más alta, tal como se encuentra disponible, por ejemplo, en Sigma Aldrich. GLA 95 indica ácido γ -linolénico puro al 95%.

30

Ejemplo de síntesis 1

35 *Síntesis de trigammalinolenina*1) *Procedimiento con cloruro ácido*

Se disolvieron 2,0 g (7,2 mmol, 3,1 equivalentes) de GLA 95 (ácido γ -linolénico puro al 95%) en 10 ml de DCM. Se añadieron gota a gota 1,01 g (0,71 ml, 8,0 mmol, 3,4 equivalentes) de cloruro de oxalilo en 5 ml de DCM durante 40 2-3 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. A continuación se añadió gota a gota este cloruro ácido durante 2-3 minutos a una mezcla agitada de 215 mg (2,3 mmol, 1 equivalente) de glicerol, 0,58 ml (3,1 equivalentes) de piridina y 10 ml de DCM bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a TA durante la noche. A continuación se filtró el clorhidrato de piridina formado y se lavó con DCM. La disolución se lavó con 1 x 4 ml de agua, HCl 0,1 45 N y disolución de bicarbonato de sodio al 5% y con disolución de NaCl al 5%. Se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío hasta obtener un aceite de color amarillo. Este aceite se purificó en una columna de gel de sílice usando éter al 10% en hexano como disolvente de elución. Se obtuvo un aceite incoloro transparente y una muestra del mismo se transesterificó y se analizó posteriormente mediante CG. El producto contenía GLA al 96,3% de pureza.

50

2) *Procedimiento con DCCI*

Se agitaron 2,19 g de GLA 95 (3,15 equivalentes), 230 mg (1 equivalente) de glicerol y 153 mg de DMAP (0,5 equivalentes) en 10 ml de DCM bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 1,85 g de DCCI (3,6 equivalentes) en 5 ml 55 de DCM. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El DCU formado se filtró y se lavó con DCM. El DCU se lavó con 1 x 5 ml de HCl N, agua, disolución de bicarbonato de sodio al 5% y agua. Se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío hasta obtener un aceite. A continuación, este aceite se purificó en una columna de gel de sílice usando éter al 10% en hexano como disolvente de elución. Se obtuvieron 1,47 g (67%) de un aceite ligeramente turbio. Se transesterificó una muestra de este producto y se sometió a análisis 60 mediante CG. El producto contenía GLA al 95,8% de pureza.

Aumento de escala

65 Se disolvieron 20 g (0,072 moles, 3,1 equivalentes) de GLA 95 (ácido gamma linolénico, 95%) en 100 ml de DCM. Se añadieron 13,7 g (9,3 ml, 0,11 moles, 4,78 equivalentes) de cloruro de oxalilo durante 3-4 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. Este aceite se añadió a

ES 2 304 094 B2

continuación gota a gota durante aproximadamente 5 min a una mezcla agitada de 2,14 g (0,023 moles, 1 equivalente) de glicerol, 100 ml de DCM y 5,8 ml (5,68 g, 0,072 moles, 3,1 equivalentes) de piridina bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 85 mg (0,7 mmol, 0,03 equivalentes) de DMAP (4-dimetilaminopiridina) como catalizador. La mezcla se agitó a TA durante la noche. El clorhidrato de piridina se filtró y se lavó con DCM. La disolución de DCM se lavó 5 con 1 x 25 ml de: agua, disolución de bicarbonato de sodio al 10%, HCl 0,1 N y disolución de NaCl al 5%. (Durante este procedimiento se formaron emulsiones, especialmente al comienzo). El DCM se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío hasta obtener un aceite de color marrón (~ 21 g).

El aceite se purificó en una columna de gel de sílice usando al principio éter al 5% en hexano y luego al 10%. 10 Se obtuvieron 15,6 g (77% de rendimiento) de un aceite transparente. Mediante CCF se determinó que este material contenía una pequeña cantidad de GLA libre, (Este material se purificó de nuevo posteriormente).

Aumento a mayor escala

15 La reacción anterior se repitió a una escala 10 veces mayor. Así, se usaron 200 g de GLA 95, 1 L de DCM, 137 g de cloruro de oxalilo y 21,4 g de glicerol. En la adición del cloruro de ácido, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de agua fría y la temperatura se mantuvo por debajo de 35°C. Se produjeron 250 g de un aceite de color marrón. Este aceite se purificó inicialmente en una columna con 500 gramos de gel de sílice. El aceite se disolvió en 200 ml de 20 hexano y se aplicó a la columna. La columna se eluyó primero con hexano, a continuación con éter al 5% en hexano y luego con éter al 10% en hexano. Se recogieron las fracciones y se analizaron mediante CCF, produciendo finalmente dos lotes de aceites. La primera fracción A (66 g) contenía una pequeña cantidad de impurezas de cabeza y un poco de GLA (fluye de forma más lenta que la TLG), la segunda fracción B (99 g) estaba libre de la impureza de cabeza y contenía un poco de GLA.

25 La reacción a gran escala se repitió usando 169 g de GLA y proporcionó dos fracciones tal y como se indicó anteriormente. En esta ocasión hubo 85 g de la fracción "A" y 54 g de la fracción Se combinaron los dos lotes de "A" y se purificaron de nuevo sobre una columna con 500 g de gel de sílice. Las fracciones "B" se trataron de una forma similar (a este lote también se añadieron 15 g de material procedente de la reacción a pequeña escala).

30 Algunas fracciones obtenidas a partir de lo anterior se purificaron de nuevo para proporcionar finalmente 259 gramos de aceite. El aceite se bombeó en un evaporador rotatorio bajo alto vacío hasta obtener un peso constante de ~256 g. Esto representa un rendimiento global del 65%.

Análisis del producto

CG

40 Se transesterificó una muestra pequeña y se sometió a análisis mediante CG:

El contenido de GLA fue del 97,1%. La principal impureza fue el ácido linoleico - 1,91%.

Nota: El GLA 95 original que se usó para la síntesis contenía el 96,2% de GLA y el 2,42% de ácido linoleico.

HPLC

50 Se desarrolló un procedimiento mediante HPLC usando una columna de fase inversa (Hypersil C18 4,6 x 100 mm), eluyendo con acetonitrilo/THF 80/20. La detección fue mediante UV a 210 nm. Esto mostró que el producto era una mezcla de tres componentes. El pico principal (93,6%) era el producto requerido. Una impureza que fluye de forma más lenta (que representa el 5,0% del producto) era probablemente un triglicérido GGLI (LI = ácido linoleico). Una segunda impureza fluye ligeramente más rápido y representaba el 1,4% del producto.

55 Nota: La absorción a 210 nm varía considerablemente entre triglicéridos con distinto contenido de ácido graso. Por ejemplo, la trigammalinolenina tiene una absorción UV 5-6 veces mayor que la de la trilinolenina.

Resumen

60 Se prepararon 254 g de tri-6,9,12-linolenato de glicerol (triglicérido de ácido gamma linolénico, trigammalinolenina, GGG) a partir de GLA con el 96,2% de pureza mediante una ruta con cloruro ácido en dos etapas. Es un aceite de color amarillo claro, transparente y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno en el congelador. El contenido de GLA fue del 97,1% y no se detectaron ácidos C20:1, C22:1 o C24:1. La pureza determinada mediante HPLC fue del 93,6%.

65 La síntesis de un GGG de pureza más alta sería fácilmente alcanzable usando GLA 98 (ácido γ -linolénico con el 98% de pureza: Scotia) o un material de partida superior.

ES 2 304 094 B2

Lípido comparativo 1

Síntesis de tricaprina (tridecanoato de glicerol)

5 *Síntesis a pequeña escala*

Se agitaron glicerol (3,0 g, 0,0325 moles, 1 equivalente), piridina (8,1 ml, 0,10 moles, 3,1 equivalentes) y diclorometano (100 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se añadió gota a gota durante 5 minutos cloruro de decanoilo (21 ml, 19,25 g, 0,10 moles, 3,1 equivalentes), con enfriamiento externo en un baño de agua para mantener la temperatura a 30-35°C. Cuando se completó la adición, se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP (0,12 g, 1 mmol, 0,03 equivalentes)) la mezcla y se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche. El clorhidrato de piridina precipitado se eliminó mediante filtración y se lavaron con diclorometano. El filtrado y el lavado combinado se lavaron a continuación con disoluciones acuosas (20 ml) de cloruro de sodio al 5%, bicarbonato de sodio al 5%, ácido clorhídrico 0,1 N y con disolución acuosa de cloruro de sodio al 5%. A continuación se secó la capa de diclorometano sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío. El aceite residual cristalizó en ausencia de movimiento. Este material se cristalizó de nuevo en isopropanol (40 ml) para proporcionar 15,6 g (86% de rendimiento) de un sólido céreo de color blanco.

Análisis

20 GC - puro al 99,8%

HPLC

25 (C18 4,6 x 100 mm, ACN/THF 85/15 1 ml/min, λ 210 nm)

- puro al 94,9%.

Síntesis a gran escala

30 La reacción anterior se repitió a una escala 15 veces mayor. Se agitaron glicerol (45,0 g, 0,49 moles, 1 equivalente), piridina (121,5 ml, 1,50 moles, 3,1 equivalentes) y diclorometano (1,5 L) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se añadió gota a gota durante 15 minutos cloruro de decanoilo (315 ml, 288,8 g, 1,50 moles, 3,1 equivalentes), con enfriamiento externo en un baño de agua para mantener la temperatura a 30-35°C. Cuando se completó la adición, se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP (1,8 g, 15 mmol, 0,03 equivalentes)) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche. El clorhidrato de piridina precipitado se eliminó mediante filtración y se lavó con diclorometano. El filtrado y el lavado combinado se lavaron a continuación con disoluciones acuosas (300 ml) de cloruro de sodio al 5%, bicarbonato de sodio al 5%, ácido clorhídrico 0,1 N y con disolución acuosa de cloruro de sodio al 5%. A continuación se secó la capa de diclorometano sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío. El aceite residual cristalizó en ausencia de movimiento. Este material se cristalizó de nuevo en isopropanol (400 ml) para proporcionar 228 g (86% de rendimiento) de un sólido céreo de color blanco.

Análisis

45 GC - puro al 99,8%.

HPLC

(C18 4,6 x 100 mm, ACN/THF 85/15 1 ml/min, λ 210 nm)

50 - puro al 94,9%.

Se preparó un lote adicional y se combinó con el lote anterior preparado a pequeña escala y se cristalizó de nuevo en isopropanol para proporcionar 44 g de producto. Los lotes anteriores se combinaron (268 g) y se analizaron de nuevo:

55 CG

puro al 99,9%

HPLC

60 97,9%

Resumen

65 Se prepararon 263 g de tridecanoato de glicerol (tricaprina, CCC) a partir de cloruro de decanoilo (98%) mediante un procedimiento en una etapa (según el esquema proporcionado a continuación). Es un sólido de color blanco, de bajo punto de fusión y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno en el congelador. El contenido de C fue del 99,9% de contenido de ácido graso y la pureza determinada mediante HPLC fue del 97,9%.

Ejemplo de síntesis 2

1,3-Dicaprin 2-gammalinolenoato (1,3-didecanoato 2-octadecatri(6-Z,9-Z,12-Z)enoato de glicerol o CGC)

5 Este glicérido es nuevo. A diferencia del CGC, su isómero CLnC (Ln = ácido α -linolénico) se ha identificado (véase K. Long y col. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 369-372 (1998) y H. Mu, P. Kalo y col., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**, 202-211 (2000)) como uno de los componentes del aceite de coco. Además, se ha descrito el isómero CLxC (Lx = ácido linolénico con la posición del doble enlace sin especificar) (véase J. Gresti y col. *J. Dairy Sci.*, **76**, 1850-1869 (1993)).

10 Los dos compuestos intermedios usados en la síntesis de CGC son conocidos (véase L. El Kihel y col. *Arzneim-Forsch./DrugRes.*, **46**, 1040-1044 (1996) y el documento US 4178299). La última etapa descrita a continuación es nueva y las dos primeras etapas también son innovadoras ya que son más apropiadas para la producción a gran escala que aquellas que se describieron anteriormente.

15 El CGC se preparó mediante la reacción de 1,3-dicaprina con cloruro de GLA en diclorometano-piridina. La 1,3-dicaprina se preparó mediante reducción en borohidruro de sodio de 1,3-didecanoiloxipropan-2-ona, que a su vez se preparó mediante la reacción de cloruro de decanoilo con 1,3-dihidroxiacetona. El compuesto intermedio 1,3-dicaprina se debe manipular con precaución ya que ésta experimenta la migración del grupo acilo con la exposición a los ácidos, 20 a las bases y al calor. Se ha descrito un procedimiento más antiguo de producción de 1,3-dicaprina (véase A. P. J. Mank y col. *Chem. Physics Lipids*, **16**, 107-114 (1976)).

25 Una síntesis versátil, flexible, de 1,3-diglicéridos y de triglicéridos mediante la adición catalizada de ácido decanoico a un éster de glicidol (de epichlorohidrina) es menos atractiva debido a que las condiciones de reacción son más drásticas y a problemas de migración de grupos acilo. El producto final, CGC, se purificó mediante una cuidadosa 25 cromatografía en columna sobre gel de sílice, lo cual eliminó los subproductos.

*Síntesis a pequeña escala**1,3-didecanoiloxipropan-2-ona*

30 Se añadió gota a gota cloruro de decanoilo (40,0 ml, 36,8 g, 0,19 moles, 1,98 equivalentes) durante 10-15 min a una suspensión agitada de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (8,68 g, 0,048 moles, 1,0 equivalente), piridina (15,6 ml, 0,19 moles), 4-dimetilaminopiridina (0,18 g, 0,0014 moles, 0,03 equivalentes) y diclorometano (DCM, 150 ml) a 35 temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 30°C mediante enfriamiento en un baño de agua fría. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina formado se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 25 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó 40 sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar un semisólido amarillento. Éste se cristalizó a continuación en metanol (150 ml) para proporcionar un sólido de color blanco. El rendimiento fue de 28,2 g (73%).

1,3-Dicaprina

45 Se disolvió la cetona anterior (28,2 g, 0,071 moles) en tetrahidrofurano (THF, 200 ml). A continuación se añadió agua (10 ml), la disolución se enfrió a 5°C y se añadió por partes borohidruro de sodio (5,38 g, 0,14 moles) por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y a continuación se concentró a vacío para eliminar el THF. El residuo se dividió entre acetato de etilo y una disolución de cloruro de sodio al 5%. La fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío hasta 50 proporcionar un sólido cíereo. Este se cristalizó dos veces en hexano para proporcionar 11,2 g (40%) de un sólido de color blanco. (pureza del 99% mediante HPLC).

1,3-Dicaprin 2-gammalinolenoato (CGC)

55 Se disolvió ácido gamma-linolénico (GLA 95, 34 g, 0,03 moles) en diclorometano (DCM, 60 ml). La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (3,9 ml, 5,67 g, 0,044 moles) durante 5 minutos. La mezcla se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (GLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 15 min (enfriando con agua/hielo) a una disolución agitada de 1,3-dicaprina (11,2 g, 0,028 moles), DCM (50 ml), piridina (2,42 ml, 2,37 g, 0,03 moles) y 4-dimetilaminopiridina (0,10 g, 0,0008 moles, 0,03 equivalentes) a 60 10-15°C. La temperatura se mantuvo mediante enfriamiento con agua/hielo. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. El filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 20 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y el 65 disolvente se eliminó a vacío. El aceite residual de color marrón se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. La elución con hexano y a continuación con éter al 5%/hexano, proporcionó 10,3 g (56%) de un aceite incoloro. La estructura se confirmó mediante RMN ¹³C y mediante CLG. La pureza se determinó mediante HPLC.

*Síntesis a gran escala**1,3-didecanoiloxipropan-2-ona*

5 Se añadió gota a gota cloruro de decanoilo (272 ml, 250 g, 1,3 moles, 2 equivalentes) durante 10-15 min a una suspensión agitada de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (59,1 g, 0,65 moles, 1,0 equivalente), piridina (106 ml, 103,7 g, 1,3 moles), 4-dimetilaminopiridina (2,38 g, 0,02 moles, 0,03 equivalentes) y diclorometano (DCM, 750 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 30°C mediante enfriamiento en un baño de agua fría. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina formado se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar un semisólido amarillento. Éste se cristalizó a continuación en metanol (500 ml) para proporcionar un sólido de color blanco. El rendimiento fue de 158 g (60%).

1,3-Dicaprina

20 Se disolvió la cetona anterior (158 g, 0,40 moles) en tetrahidrofurano (THF, 2,25 L). A continuación se añadió agua (50 ml), la disolución se enfrió a 5°C y se añadió por partes borohidruro de sodio (5,66 g, 1,5 equivalentes) por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se controló mediante HPLC (C18, eluida con ACN a 1 ml/min λ 210 nm) (Nota: de hecho, sólo se añadieron aproximadamente 4,5 g del borohidruro, ya que todo el SM había reaccionado). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y a continuación se concentró a vacío para eliminar el THF. El residuo se dividió entre acetato de etilo y una disolución de cloruro de sodio al 5%. La fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío hasta proporcionar un sólido cíereo. Éste se cristalizó dos veces en hexano para proporcionar 96 g (60%) de un sólido de color blanco. (Pureza del 98% mediante HPLC).

1,3-Dicaprín 2-gammalinolenoato (CGC)

30 Se disolvió ácido gamma-linolénico (GLA 95, 120,2 g, 0,43 moles) en diclorometano (DCM, 750 ml). La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (55,7 ml, 82,3 g, 0,65 moles, 1,5 equivalentes) a 15-20°C durante 15 minutos. La mezcla se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (GLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 30-40 min a 10-15°C (enfriando con agua/hielo) a una disolución agitada de 1,3-dicaprina (164,7 g, 0,41 moles), DCM (650 ml), piridina (33,3 ml, 32,5 g, 0,41 moles) y 4-dimetilaminopiridina (1,50 g, 0,012 moles, 0,03 equivalentes) a 10-15°C. El clorhidrato de piridina se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. El filtrado y el lavado combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío para obtener un aceite de color marrón (275 g).

45 La escala de las tres reacciones anteriores fue la más grande en la que se llevó a cabo cada una de ellas. La reducción del borohidruro produjo, además de 1,3-dicaprina, un subproducto con un rendimiento variable. La presencia de este subproducto afectó mucho al rendimiento de la 1,3-dicaprina pura aislada; el subproducto sólo se pudo eliminar mediante dos cristalizaciones del producto bruto. Como el producto final, CGC, se purifica mediante cromatografía en columna, es imperativo que la 1,3-dicaprina usada para la etapa final sea tan pura como sea posible.

50 A partir de las reacciones anteriores se produjeron aproximadamente 440 g de CGC bruto en forma de un aceite de color marrón. Este aceite se purificó en una serie de columnas de gel de sílice usando hexano, seguido de éter al 2-3%/hexano. La purificación requirió 7 u 8 columnas, usando 3-4 kilogramos de gel de sílice, 25-30 litros de disolvente (el reciclado del disolvente mantuvo esta cifra baja - en la práctica se usaron alrededor de 100 litros).

55 El producto resultante, un aceite incoloro casi transparente, (264 gramos) era puro al 96,4% mediante HPLC (C18 4,6 x 100 mm, se eluyó con 85/15 ACN/THF a 1 ml/min. Detección UV λ 210 nm). La CG indicó una proporción de 66,1/33,9 de C/G. El análisis mediante RMN indicó que el producto tenía la estructura de CGC correcta y que tenía una pureza de al menos el 95%: δ_c (500 MHz, CDCl₃) 172,65 (carbonilo 2-GLA), 173,25 (carbonilo 1,3-cáprico). La proporción de señales fue 2,04:1. La ausencia de señal a 173,0 indica la ausencia de 1,3-GLA. La señal traza a 172,79 pudo ser una impureza de ácido oleico en GLA o ácido 2-cáprico.

60

Resumen

65 Se prepararon 264 g de 1,3-didecanoato-2-gammalinolenoato de glicerol (1,3-dicaprín-2-GLA, CGC) a partir de cloruro de decanoilo (98%) mediante un procedimiento en tres etapas (según el esquema proporcionado a continuación). Es un aceite casi incoloro (con un matiz de color amarillo claro) y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno en el congelador. La pureza determinada mediante HPLC fue del 96,4%.

ES 2 304 094 B2

Ejemplo de síntesis 3

1,3-Didecanoato-2-dihomo-γ-linolenoato (1,3-didecanoato 2-eicosa-(8Z,11Z,14Z)-trienoato de glicerol o C(DHLA)C)

5

El triglicérido parece ser nuevo - no se ha descubierto ninguna referencia suya.

Se disolvió DHLA (3,93 g, 12,8 mmol, 1 equivalente) en diclorometano (DCM, 20 ml) y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (1,69 ml, 2,46 g, 19,4 mmol, 1,5 equivalentes) durante 1-2 min y se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante la noche. La disolución resultante se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (DHLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 5 min a 25°C a una mezcla agitada de 1,3-dicaprina (4,91 g, 12,2 mmol, 0,95 equivalentes), piridina (0,98 ml, 0,96 g, 12,1 mmol, 0,95 equivalentes) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 8 mg, 0,07 mmol, 0,03 equivalentes). Durante la adición la temperatura de reacción aumentó a 32°C. La mezcla de reacción se agitó a 30-35°C y se controló mediante HPLC. La reacción se detuvo después de 1,5 h. El clorhidrato de piridina precipitado se filtró y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 10 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar el producto bruto en forma de un aceite de color amarillo anaranjado (8,9 g, pureza del 86% mediante HPLC). Este aceite se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (250 g). La elución con hexano y con dietil éter-hexano (2-6%) proporcionó un producto purificado en forma de un aceite de color amarillo claro. El tratamiento de una disolución de hexano con carbón decolorante y la eliminación del disolvente a vacío, proporcionó C(DHLA)C en forma de un aceite incoloro transparente (6,48 g, pureza del 98,9% mediante HPLC).

25

Ejemplo de síntesis 4

Triaraquidina (trieicosotetra5-Z,8-Z,11-Z,14-Z-eneoato de glicerol) o AAA

30 Se disolvió ácido araquidónico (50,9 g, 0,17 mmol, 3 equivalentes) en diclorometano (DCM, 175 ml) y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación se añadió cloruro de oxalilo (21,9 ml, 31,9 g, 0,25 moles, 4,4 equivalentes) a la disolución agitada durante 5 min y la temperatura aumentó 4°C. La mezcla resultante de color amarillo verdoso se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (A-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 35 15 min a 25°C a una mezcla agitada precalentada (25°C) de glicerol (5,11 g 0,055 moles, 1 equivalente), piridina (13,5 ml, 13,2 g, 0,17 mol, 3 equivalentes) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,20 g, 0,002 mmol, 0,03 equivalentes). La temperatura de la mezcla de reacción ascendió hasta 42°C durante la adición y se observó un suave reflujo. La mezcla de reacción se agitó a 30-40°C y se controló mediante HPLC. Despues de 2 h, no se observó formación de producto adicional. El clorhidrato de piridina precipitado se filtró y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 50 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar el producto bruto en forma de un aceite de color amarillo anaranjado (57 g). Este aceite se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (aproximadamente 600 g). La elución con hexano y con dietil éter (2-4%)-hexano proporcionó 22,8 g del producto en forma de un aceite. A partir de 39,8 g de ácido araquidónico 45 se produjo un segundo lote (17,8 g). Se combinaron los dos lotes y los disolventes residuales se eliminaron a vacío para proporcionar 40,5 g (43%) de un aceite móvil de color amarillo claro. Pureza mediante HPLC del 84,8%, análisis mediante CLG 94,3% de AA (ácido araquidónico).

50

Lípido comparativo 2

1,3-Di(octadeca-6Z,9Z,12Z-enoiloxi)propan-2-ona (1,3-Di(γ-linolenoiloxi)propan-2-ona, GonG) Etapa 1, compuesto intermedio para GCG

55 Se disolvió ácido gamma-linolénico (GLA 95, 197 g, 0,71 moles, 2,2 equivalentes) en diclorometano (DCM, 600 ml) contenido en un matraz de 3 bocas de 2 L. La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (93 ml, 136 g, 1,07 moles 3,3 equivalentes) a 15-20°C durante 15 min. La mezcla de color marrón se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. A continuación, el cloruro ácido residual (GLA-Cl) se añadió gota a gota durante 20 min a 25°C a una mezcla agitada de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (28,99 g, 0,32 moles, 1,0 equivalente), piridina (52 ml, 50,9 g, 0,64 moles, 2,0 equivalentes), 4-dimetilaminopiridina (2,36 g, 0,02 moles, 0,06 equivalentes) y diclorometano (DCM, 600 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se permitió que la temperatura de la mezcla de reacción aumentase hasta 40°C y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h adicionales bajo atmósfera de nitrógeno (se controló mediante HPLC). El clorhidrato de piridina que se formó se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar aproximadamente 200 g de un aceite de color amarillo. Este material se purificó de forma parcial mediante cromatografía en columna de gel de sílice (600 g). La elución con hexano y a continuación con mezclas de éter-hexano (2-15%), proporcionó 42 g de un aceite de color amarillo claro.

ES 2 304 094 B2

Este aceite se purificó de nuevo por cromatografía sobre gel de sílice (600 g) y se eluyó con hexano y a continuación con éter al 1-10%-hexano para proporcionar el producto (con una pureza del 95,9%) en forma de un aceite de color amarillo claro. El rendimiento fue de 42 g (17%).

5 *1,3-Di(octadeca-6Z,9Z,12Z-enoiloxi)propan-2-ol (1,3-Di(γ -linolenoiloxi)propan-2-ol o 1,3-Di-gamma-linolenina GolG) Etapa 2, compuesto intermedio para GCG*

Se disolvió 1,3-di(γ -linolenoiloxi)propan-2-ona (GonG, 25,5 g, 0,04 moles, 1 equivalente) en tetrahidrofurano (THF, 375 ml) y agua (12,7 ml). La disolución se agitó de forma vigorosa a -20°C y se tomó la precaución de mantener la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de -15°C. Se añadió por partes borohidruro de sodio (790 mg, 0,02 moles, 1,25 equivalentes) a la disolución agitada durante 3 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos adicionales a -20°C y a continuación se añadió hexano (380 ml). La mezcla aún fría se lavó a continuación con agua (2 x 200 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite de color marrón (27,8 g) (pureza del 82,6% mediante HPLC, menos del 1% de material emigrado). Se preparó otro lote y se combinó con el primero para proporcionar 50 g de producto bruto. Este material se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (400 g). La elución con hexano y con una mezcla de dietil éter-hexano (5-20%) proporcionó 36,1 g del producto en forma de un aceite de color claro (91,5% de pureza).

20 (Prestar atención: Se deben tomar precauciones para no dejar el compuesto sobre la gel de sílice durante la noche ya que parece que éste experimenta una reacción de migración, proporcionando GGol).

1,3-Di- γ -linolenina 2-decanoato (1,3-dioctadeca-(6Z,9Z,12Z)-trienoato 2-decanoato de glicerol o GCG)

25 Se añadió cloruro de decanoilo (13,5 ml, 12,4 g, 0,065 moles, 1,1 equivalentes) a una disolución agitada de 1,3-di- γ -linolenina (36,1 g, 0,059 moles, 1 equivalente), piridina seca (5,7 ml, 5,6 g, 0,07 moles, 1,1 equivalentes), 4-dimetilaminopiridina (0,2 g, 0,002 moles, 0,03 equivalentes) y diclorometano (DCM, 150 ml) durante aproximadamente 10 minutos. Durante la adición, la temperatura se mantuvo a entre 17-23°C. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 30-35°C y se controló mediante HPLC. Despues de 1 h, de 1,5 h y de 2 h, se añadieron 1-2 ml de cloruro de decanoilo adicionales. La adición adicional parecía aumentar la conversión a producto según se determinó mediante HPLC. Despues de 3 h, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 50 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación el extracto de DCM se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar el producto bruto en forma de un aceite de color amarillo claro; (pureza del 90% mediante HPLC). El aceite se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (600 g). La elución con hexano y con dietil éter-hexano (1,5-2,5 y a continuación 3,5%) proporcionó el producto (GCG) en forma de un aceite transparente; (35,5 g, pureza del 96,1% mediante HPLC). Se obtuvieron otros 7,5 g de lípido puro mediante la purificación adicional por cromatografía de algunas de las fracciones que contenían sólo una pequeña cantidad de impureza.

40 Ejemplo de síntesis 5

1,3-Dicaprin 2-araquidonato (1,3-didecanoate 2-eicosatetra-(5-Z,8-Z,11-Z,14-Z)enoato de glicerol o CAC)

Este glicérido es conocido. El CAC se ha identificado como un constituyente de los lípidos de la linfa después de la administración de aceite de cártamo a ratas. El documento WO 03 013.497 describe un triglicérido que contiene ácido araquidónico (producido mediante cultivo de Mortierella alpina) útil para enfermedades causadas por la hipofunción cerebral, aunque de forma específica es útil para la mejora de la cognición. Los dos compuestos intermedios usados en la síntesis de CAC son conocidos.

50 La síntesis de CAC a partir de 1,3-dicaprina y la purificación de éste son completamente nuevos.

Aquí, el CAC se preparó mediante la reacción de 1,3-dicaprina con cloruro de araquidonilo en diclorometano-piridina. La 1,3-dicaprina se preparó mediante reducción en borohidruro de sodio de 1,3-didecanoiloxipropan-2-ona, que a su vez se preparó mediante la reacción de cloruro de decanoilo con 1,3-dihidroxiacetona. El compuesto intermedio 1,3-dicaprina se debe manipular con precaución, ya que ésta experimenta la migración del grupo acilo con la exposición a los ácidos, a las bases y al calor. Un procedimiento más antiguo⁶ de obtención de 1,3-dicaprina, mediante la adición catalizada de ácido decanoico a un éster de glicidol (de epichlorohidrina), se estimó que era menos atractivo debido a que las condiciones de reacción son más drásticas y a problemas de migración de grupos acilo. El producto final, CAC, se purificó mediante una cuidadosa cromatografía en columna sobre gel de sílice, lo cual eliminó los subproductos.

1,3-Dicaprin 2-araquidonato (CAC)

65 Se disolvió ácido araquidónico (AA 96, 8,34 g, 0,03 moles) en diclorometano (DCM, 60 ml). La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (3,9 ml, 5,67 g, 0,044 moles) durante 5 minutos. La mezcla se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (GLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 15 min (enfriando con agua/hielo) a una disolución agitada de 1,3-dicaprina (11,2 g, 0,028 moles), DCM

ES 2 304 094 B2

(50 ml), piridina (2,42 ml, 2,37 g, 0,03 moles) y 4-dimetilaminopiridina (0,10 g, 0,0008 moles, 0,03 equivalentes) a 10-15°C. La temperatura se mantuvo mediante enfriamiento con agua-hielo. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. El filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 20 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío. El aceite residual de color marrón se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. La elución con hexano y a continuación con éter al 5%/hexano, proporcionó 10,3 g (56%) de un aceite incoloro. La estructura se confirmó mediante RMN ¹³C y mediante CLG. La pureza se determinó mediante HPLC.

10

Síntesis a gran escala

1,3-didecanoiloxipropan-2-ona

15 Se añadió gota a gota cloruro de decanoilo (272 ml, 250 g, 1,3 moles, 2 equivalentes) durante 10-15 min a una suspensión agitada de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (59,1 g, 0,65 moles, 1,0 equivalente), piridina (106 ml, 103,7 g, 1,3 moles), 4-dimetilaminopiridina (2,38 g, 0,02 moles, 0,03 equivalentes) y diclorometano (DCM, 750 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 30°C mediante enfriamiento en un baño de agua fría. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina formado se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar un semisólido amarillento. Éste se cristalizó a continuación en metanol (500 ml) para proporcionar un sólido de color blanco. El rendimiento fue de 158 g (60%).

25

1,3-Dicaprina

30 Se disolvió la cetona anterior (158 g, 0,40 moles) en tetrahidrofurano (THF, 2,25 L). A continuación se añadió agua (50 ml), la disolución se enfrió a 5°C y se añadió por partes borohidruro de sodio (5,66 g, 1,5 equivalentes) por debajo de 10°C. La mezcla de reacción se controló mediante HPLC (C18, eluida con ACN a 1 ml/min A. 210 nm) (Nota: de hecho, sólo se añadieron aproximadamente 4,5 g del borohidruro, ya que todo el SM había reaccionado). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y a continuación se concentró a vacío para eliminar el THF. El residuo se dividió entre acetato de etilo y una disolución de cloruro de sodio al 5%. La fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío hasta proporcionar un sólido cíereo. Éste se cristalizó dos veces en hexano para proporcionar 96 g (60%) de un sólido de color blanco. (Pureza del 98% mediante HPLC).

35

1,3-Dicaprín 2-araquidonato (CAC)

40 Se disolvió ácido araquidónico (AA 96, 78,8 g, 0,26 moles) en diclorometano (DCM, 425 ml). La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (33,9 ml, 49,4 g, 0,39 moles, 1,5 equivalentes) a 15-20°C durante 15 minutos. La mezcla se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (GLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 30-40 min a 10-15°C (enfriando con agua/hielo) a una disolución agitada de 1,3-dicaprina (94,2 g, 0,24 moles), DCM (450 ml), piridina (19,1 ml, 18,6 g, 0,24 moles) y 4-dimetilaminopiridina (1,72, 1,50 g, 0,014 moles, 0,06 equivalentes) a 10-15°C. El clorhidrato de piridina se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. El filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío para obtener un aceite de color marrón (171 g).

50

55 La escala de las tres reacciones anteriores fue la más grande en la que se llevó a cabo cada una de ellas. La reducción del borohidruro produjo, además de 1,3-dicaprina, un subproducto con un rendimiento variable. La presencia de este subproducto afectó mucho al rendimiento de la 1,3-dicaprina pura aislada; el subproducto sólo se pudo eliminar mediante dos cristalizaciones del producto bruto. Como el producto final, CAC, se purifica mediante cromatografía en columna, es imperativo que la 1,3-dicaprina usada para la etapa final sea tan pura como sea posible

60

A partir de las reacciones anteriores, se produjeron 412 g de CAC bruto en forma de un aceite de color marrón. Este material se purificó en una serie de columnas de gel de sílice usando hexano, seguido de éter al 1-3%/hexano. La purificación requirió 7 u 8 columnas, que usaban 3-4 kilogramos de gel de sílice y 100 litros de disolvente.

65

El producto resultante, un aceite de color amarillo muy claro, transparente, (295 gramos) era puro al 95,8% mediante HPLC (C18 4,6 x 100 mm, se eluyó con 85/15 ACN/THF a 1 ml/min. Detección UV λ 210 nm). La CG indicó una proporción de 66,3/32,1 C/A (1,6% de impureza trasladada a partir del 5% de impureza en A).

65 Resumen

Se prepararon 295 g de 1,3-didecanoato-2-araquidonato de glicerol (1,3-dicaprín-2-AA, CAC) a partir de cloruro de decanoilo (98%) y de ácido araquidónico mediante un procedimiento en tres etapas (según el esquema propor-

cionado a continuación). Es un aceite de color amarillo muy claro y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno en el congelador. La pureza determinada mediante HPLC es del 95,8%.

5 Ejemplo de síntesis 7

1,3-Diolein 2-gammalinolenoato (1,3-dioctadeca-9Z-enoato 2-octadecatri(6-Z,9-Z,12-Z)enoato de glicerol u OGO)

Este glicérido se conoce: se ha preparado una versión marcada con carbono 14 mediante síntesis química normal y la forma normal sin marcar se ha preparado mediante síntesis bioquímica usando lipasas. El **OGO** no es un componente principal del aceite de borraja, aunque su isómero **OOG** sí lo es (9%). Los dos compuestos intermedios usados en la síntesis de **CGC** son conocidos. La última etapa es nueva.

Se cree que el uso, la síntesis de 1,3-dioleina y la purificación del **CGC** son todos nuevos. En general, se prefieren los triglicéridos CXC sobre los OXO en la patente y por razones de coste de los productos.

En la presente invención el **OGO** se preparó mediante la reacción de 1,3-dioleina con cloruro de GLA en diclorometano-piridina. La 1,3-dioleina se preparó mediante reducción en borohidruro de sodio de 1,3-dioleoilpropan-2-ona, que a su vez se preparó mediante la reacción de cloruro de oleilo con 1,3-dihidroxiacetona. El compuesto intermedio 1,3-dioleina se debe manipular con precaución, ya que ésta experimenta la migración del grupo acilo con la exposición a los ácidos, a las bases y al calor. Los procedimientos antiguos^{7,8} para la preparación de 1,3-dioleina, a través de mono-triacilgliceroles o de ésteres de glicidilo, se estimaron que eran menos atractivos debido a que tenían más etapas y a problemas de migración de grupos acilo. El producto final, **OGO**, se purificó mediante una cuidadosa cromatografía en columna sobre gel de sílice, lo cual eliminó los subproductos.

25 *Síntesis a pequeña escala*

1,3-dioleoilpropan-2-ona

30 Se disolvieron 155,1 g de ácido oleico (155,1 g, 0,55 moles, 1,0 equivalentes, Croda 094 RV05192) en diclorometano (DCM, 500 ml). La disolución se agitó a temperatura ambiente (TA) bajo atmósfera de nitrógeno y se añadieron gota a gota 104,4 g (1,5 equivalentes, 71 ml) de cloruro de oxalilo (104,4 g, 71,8 ml, 0,82 moles, 1,5 equivalentes) a 15-20°C durante aproximadamente 20 minutos. La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. El exceso de cloruro de oxalilo y de DCM se eliminaron a vacío y el cloruro ácido aceitoso residual se añadió gota a gota durante 15-20 minutos a una suspensión agitada de dímero de 1,3-dihidroxiacetona (22,5 g, 0,24 moles de monómero), piridina (40,4 ml), 4-dimetilaminopiridina (1,83 g) y diclorometano (DCM, 500 ml), a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 20°C mediante enfriamiento en un baño de agua/hielo. La mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina formado se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. A continuación, el filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 150 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío para proporcionar un semisólido de color naranja/marrón. Este sólido se trituró en metanol y se almacenó en la nevera durante la noche. A continuación, el sólido depositado (puro al 90% mediante HPLC) se cristalizó en diisopropil éter (DIPE) y metanol para proporcionar 51,3 g de un sólido blanquecino que tenía una pureza del 95% mediante HPLC. 45 La cristalización adicional en DIPE/metanol produjo 41 g (27%) de un producto puro al 98%.

1,3-Dioleina

50 Se disolvió la cetona anterior (32,8 g, 0,053 moles) en tetrahidrofurano (THF, 250 ml). A continuación se añadió agua (10 ml), la disolución se enfrió a 5°C y se añadió por partes borohidruro de sodio por debajo de 10°C. La reacción se siguió mediante HPLC (C18, ACN/THF 90/10 a 2 ml/min, λ 210 nm) y después de que había reaccionado toda la cetona de partida se detuvo la adición de borohidruro (se añadieron 830 mg, 0,022 moles). A continuación, la mezcla se concentró a vacío para eliminar el THF. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo y los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío hasta proporcionar un aceite (~33 g) que solidificó tras un enfriamiento. El producto (puro al 68% mediante HPLC) se cristalizó en 100 ml de hexano a -20°C (en el congelador) durante la noche. Este producto (21,1 g, puro al 92%) se cristalizó de nuevo en hexano (50 ml) para proporcionar 18,28 g (56% de rendimiento) de un producto puro al 97,5% mediante HPLC.

60 *1,3-Diolein 2-gammalinolenoato (O-G-O)*

Se disolvió ácido γ -linolénico (GLA 95, 41,2 g, 0,15 moles, 1,1 equivalentes) en diclorometano (DCM, 250 ml). La disolución resultante se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno y se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (19,1 ml, 28,2 g, 0,22 moles, 1,65 equivalentes) durante 5 minutos. La mezcla se agitó a TA durante la noche y a continuación se concentró a vacío para eliminar el DCM y el exceso de cloruro de oxalilo. El cloruro ácido aceitoso residual (GLA-Cl) se añadió a continuación gota a gota durante 15 min (enfriando con agua/hielo) a una disolución agitada de 1,3-dioleina (83,5 g, 0,13 moles), DCM (250 ml), piridina (10,9 ml, 10,6 g, 0,14 moles) y 4-dimetilaminopiridina (0,49 g, 0,004 moles, 0,15 equivalentes) a 10-15°C. La temperatura se mantuvo mediante enfriamiento con agua-hielo. La

ES 2 304 094 B2

mezcla de reacción se agitó a TA bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. El clorhidrato de piridina se eliminó mediante filtración y se lavó con DCM. El filtrado y los lavados combinados se lavaron con porciones de 1 x 80 ml de disolución de NaCl al 5%, disolución de NaHCO₃ al 5%, HCl 0,1 N y con disolución de NaCl al 5%. A continuación la disolución se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se eliminó a vacío. El aceite residual de color marrón se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. La elución con hexano y a continuación con éter al 5%/hexano, proporcionó 63,6 g (54%) de un aceite incoloro. La pureza se determinó mediante HPLC.

Resumen

Se prepararon 64 g de 1,3-oleato-2-gammalinolenoato de glicerol (1,3-dioleato-2-GLA, OGO) a partir de cloruro de oleilo (98%) mediante un procedimiento en tres etapas (según el esquema proporcionado a continuación). Era un aceite casi incoloro (con un matiz de color amarillo claro) y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno en el congelador. La pureza determinada mediante HPLC fue del 89,4%.

Datos de RHN ¹³C para lípidos estructurados

GGG δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,69 (1C, carbonilo C-2), 173,09 (2C, carbonilos C-1, C-3).
CGC δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,76 (1C, carbonilo C-2), 173,17 (2C, carbonilos C-1, C-3).
CAC δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,65 (1C, carbonilo C-2), 173,28 (2C, carbonilos C-1, C-3).
C(DHLA)C δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,83 (1C, carbonilo C-2), 173,30 (2C, carbonilos C-1, C-3).
GCG δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,91 (1C, carbonilo C-2), 173,11 (2C, carbonilos C-1, C-3).
OGO δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,69 (1C, carbonilo C-2), 173,25 (2C, carbonilos C-1, C-3).
AAA δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,66 (1C, carbonilo C-2), 173,04 (2C, carbonilos C-1, C-3).
CCC δ_c	(125,7 MHz, CDCl ₃) 172,81 (1C, carbonilo C-2), 173,21 (2C, carbonilos C-1, C-3).

Procedimiento experimental

Los espectros de RMN ¹³C de protón desacoplado con el NOE eliminado se recogieron a 21°C en una sonda de banda ancha de 5 mm en un espectrómetro Joel 500 MHz que operaba a 125,728 MHz. El modo de desacoplamiento escogido fue el modo de waltz y se activó sólo durante los 14,89 s del tiempo de adquisición. El retraso de relajación se ajustó a 30 segundos y el ángulo del pulso fue de 90°. La ventana espectral usada fue de aproximadamente 35 ppm (entre 173,5 y 172,6 ppm) con una compensación de 170 ppm. Para los espectros se utilizó como referencia interna el CDCl₃ a 77,0 ppm. Típicamente, el número aproximado de barridos recogidos para una relación señal/ruido adecuada varió entre 300 y 1200 barridos, dependiendo de la concentración y de la pureza de la muestra. El tiempo total de adquisición para los experimentos varió entre 2-8 h, por ejemplo con 1272 barridos; 65.536 puntos experimentales. Cuando fue posible, se emplearon disoluciones concentradas hasta el 20% p/v para reducir el tiempo de adquisición. Los desplazamientos químicos mencionados varían con la concentración de la disolución.

Estudios biológicos

Estudios sobre la encefalomielitis autoinmune experimental crónica recurrente (CREAE)

Inducción y evaluación clínica de la EAE

La CREAE se indujo en ratones C57B1/6 y SJL. A los animales se les inyectaron por vía subcutánea 100 μ g del péptido neuroantígeno MOG 35-55 (secuencia de aminoácidos MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK Genemed Synthesis, Inc) o 1 mg de homogeneizado de médula espinal (SCH) de ratón, en solución salina tamponada con fosfato (PBS), emulsionada mediante sonicación durante 10 min a temperatura ambiente, en adyuvante de Freund incompleto, (DIFCO, Detroit, EE.UU.) supplementado con 480 μ g de mycobacteria tuberculosis y con 60 μ g de *Mycobacteria butyricum* (DIFCO, Detroit, EE.UU.) en los días 0 y 7, tal como se describió anteriormente (Morris-Downes, MM., y col. 2002). Además de optimizar la enfermedad, los ratones también recibieron 200 ng (por vía intraperitoneal) de toxina de *Bordetella pertussis* disuelta en PBS y administrada 1 h y 24 horas después de la inmunización con el neuroantígeno MOG y durante los días 0, 1, 7 y 8 de SCH.

Los animales se pesaron desde el día 5 en adelante y se examinaron diariamente para buscar indicios neurológicos clínicos por parte de dos investigadores experimentados, indicios que fueron clasificados de acuerdo con un esquema

de clasificación refrendado anteriormente (Morris-Downes, MM. y col. 2002 y otros): 0 = normal; 1 = pata y cola flácidas; 2 = reacción de recuperación empeorada; 3 = parálisis parcial de las extremidades traseras; 4 = parálisis completa de las extremidades traseras; 5 = moribundo; 6 = muerte. Los animales que mostraban signos clínicos de una clasificación de menor gravedad que la observada típicamente, se clasificaron con 0,5 puntos menos que la puntuación indicada para esa clasificación.

5 **Bibliografía**

10 **Morris-Downes, MM., y col. (2002).** Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J. Neuroimmunol.* 125. 114-124.

15 La puntuación media del grupo de EAE se comparó para cada grupo de ensayo en comparación con un grupo de control respectivo mediante análisis estadístico no paramétrico (prueba U de Mann Whitney).

20 Todos los estudios MOG-CREAE comprendían un grupo de tratamiento de control (C-C-C o solución salina, tal como se seleccionó a partir del estudio anterior). Cada lípido estructurado se ensayó con 3 niveles de dosis, administrándose todos los tratamientos por vía oral durante 2 semanas desde el día 7 después de la inoculación. Todos los grupos de tratamiento contenían 10 animales. Tras la terminación de los estudios (día 21), se retiraron el cerebro y la médula espinal y la mitad de las muestras se procesaron para buscar signos de regiones perivasculares del SNC infiltradas por leucocitos mononucleares y para buscar signos de desmielinización.

25 **Los estudios fueron del modo siguiente:**

30 Estudio 2: *Homogeneizado de médula espinal (SCH), EAE en ratones SJL*

35 Inducción de EAE: 1 mg de SCH día 0 + día 7 por vía subcutánea, 200 ng de toxina Pertussis días 0, 1, 7 y 8 por vía intraperitoneal 10 ratones/grupo. Los ratones se trataron entre el día 7 y el día 21 con CCC o con CGC.

40 Estudio 3: *SCH EAE en ratones SJL*

45 El tratamiento fue desde PSD 7 a 21, ambos días incluidos.

50 Estudio 4: *MOG EAE en ratones C57BL*

55 El tratamiento fue desde PSD 7 a 21, ambos días incluidos.

60 Estudio 5: *SCH EAE en ratones SJL*

65 El tratamiento fue desde PSD 5 a 18, ambos días incluidos.

70 Estudio 6: *MOG EAE en ratones C57BL*

75 El tratamiento fue entre los días 5 y 21 ambos incluidos, excepto en el grupo con C-DHLA-C, en el que el tratamiento fue entre los días 5 a 15, ambos incluidos. Los animales se seleccionaron en el PSD 25. [Se tomaron muestras de cinco animales de un grupo sin tratar, de 3 animales del grupo de tratamiento de control con CCC, de 5 animales del grupo de tratamiento con 150 μ l de GGG y de 2 animales del grupo de tratamiento con 350 μ l de GGG para el análisis histológico en el PSD 20].

80 Estudio 7: *SCH EAE en ratones SJL*

85 El tratamiento fue entre los días 6 y 20, ambos incluidos.

90 Estudio 2 - Homogeneizado de médula espinal (SCH), EAE en ratones SJL: - Ensayado
CGC (50/150/350 μ l); **CCC** (350 μ l).

95 **GGG.** (50/350 μ l)

[Observada enfermedad grave]

ES 2 304 094 B2

Estudio 3 - SCH/ratones SJL:- Ensayado

CCC (50/150/350 μ l)

CGC (25/50/150/350 μ l)

GGG (50/150/350 μ l)

OGO.(25/50/150/350 μ l)

10 [Observada enfermedad grave]

Estudio 4 - MOG/ratones C57BL:- Ensayado

CCC (50/150/350 μ l)

CGC (25/50/150/350 μ l)

GGG (50/150/350 μ l)

20 **OGO.** (25/50/150/350 μ l)

Estudio 6 - MOG/ratones C57BL:- Ensayado

CCC (150 μ l)

C-DHLA-C (50 μ l)

CAC (50/350 μ l)

30 **AAA** (50/150 μ l)

GCG (50 μ l)

CGC (50 μ l)

35 **GGG.** (150/350 μ l)

[Patología: CCC; GGG]

40 El examen histológico de las muestras presentadas de cerebro y de médula espinal mostró lesiones típicas de encefalomielitis alérgica experimental.

Las lesiones localizadas y las lesiones difusas se caracterizaban por gliosis, vacuolación de la mielina, degeneración axonal y por infiltración perivascular con linfocitos, macrófagos y neutrófilos.

45 Las lesiones de la médula espinal se localizaban en su mayor parte en la sustancia blanca subpial y las lesiones cerebrales se encontraban en su mayor parte en la sustancia blanca cerebelar. Las lesiones eran más graves en las médulas espinales que en los cerebros y mientras que todos los animales con lesiones en el cerebro tenían lesiones en la médula espinal, no todos los animales con lesiones en la médula espinal tenían lesiones en el cerebro.

50 La variación en la gravedad de los cambios entre ratones individuales se resume usando un sistema de clasificación de cinco puntos.

55 Los ratones sin tratar tenían puntuaciones histológicas de 3-4, lo que se correlaciona con puntuaciones de EAE de 1,5-3. Un ratón mostró un ligero cambio patológico con una puntuación de cero. En los ratones tratados con GGG, la mayoría no mostraron anormalidades. Dos ratones de este grupo tuvieron puntuaciones histológicas de 2 y de 3, respectivamente, lo que se correlacionó con unas puntuaciones de gravedad de la EAE de 1 y de 1,5.

Los resultados de los cuatro estudios se muestran a continuación en las Figuras 11 a 20.

60 Estas figuras muestran que los compuestos G-G-G, A-A-A, C-G-C, C-DHGLA-C y C-A-C son todos capaces de reducir la gravedad de la CREAE, mientras que los compuestos G-C-G y C-C-C fallaron en el tratamiento de la dolencia. Se cree que el compuesto O-G-O da resultado si la dosis es ajustada.

65 Tal y como se advirtió en la descripción, los compuestos de ácido araquidónico son eficaces, aunque conducen a la muerte de algunos animales. Los animales que sobrevivieron tuvieron una enfermedad muy reducida. Se cree que la dosis de estos compuestos se puede reducir aún más para proporcionar una supervivencia con un tratamiento satisfactorio.

Algunos de los estudios muestran una curva de respuesta con forma de campana para los compuestos C-G-C y G-G, lo que sugiere que las dosis muy elevadas no son óptimas, tal como se expuso anteriormente. Dicha dosificación se puede determinar de forma conveniente por parte de los expertos en la técnica, por ejemplo mediante incremento escalonado de las dosis y controlando los cambios en la tasa de liberación de forma espontánea de TGF- β 1/TNF- α desde las CMSPs.

Dados los resultados del alto contenido de ácido γ -linolénico sn-2 del documento PCT/GB04/002089, la falta de eficacia del aceite de grosella negra con bajo contenido sn-2 y del G-C-G en la CREAE y dada la eficacia de la dosis baja de C-G-C y de C-DHGLA-C en la Figura 20, se puede ver que los lípidos de ácido γ -linolénico, de ácido dihomo- γ -linolénico y de ácido araquidónico sn-2 proporcionan un nuevo tratamiento para la EM que excede con creces cualquier resultado de parámetros clínicos de una terapia actual, puesto que se corrigen las lesiones y se resuelven los síntomas difíciles: la disminución de la EDSS durante un periodo de años es hasta ahora inalcanzable en otros tratamientos.

15 Bibliografía

- Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, Matthieu JM, Baker D.** Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and BiozziAB/H mice. *J Immunol.* 1994 Nov 15; 153(10): 4349-56.
- Beck J, Rondot P, Catinot L** y col. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 1988; **78**: 318-23.
- Bertolotto A, Capobianco M, Malucchi S** y col. Transforming growth factor betal (TGF β 1) mRNA level correlates with magnetic resonance imaging disease activity in multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 1999; **263**: 21-4.
- Bertolotto A, Malucchi S, Capobianco M** y col. Quantitative PCR reveals increased levels of tumor necrosis factor-alpha mRNA in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients during relapses. *J Interferon Cytokine Res* 1999; **19**: 575-81.
- Brosnan CF, Selmaj K y Raine CS.** Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1988; 18: 87-94.
- Brosnan CF** and **Raine CS.** Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 1996; 6, 243-257.
- Burns J, Bartholomew B, Lobo S.** Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; **45**: 33-9.
- Cannella B, Raine CS.** The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; **37**: 424-35.
- Chou YK, Bourdette DN, Offner H** y col. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; **38**: 105-14.
- De Stefano N., Narayanan S., Francis GS., Arnaoutelis R., Tartaglia MC., Antel JP., Matthews PM y Arnold DL.** Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol.* 2001; 58(1), 65-70.
- Ewing C, Bernard CC.** Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 1998; **76**: 47-54.
- Fazakerly JK.** Molecular biology of multiple sclerosis. Wiley and Sons Ltd. 1997, 255-273.
- Fredrikson S, Soderstrom M, Hillert J** y col. Multiple sclerosis: occurrence of myelin basic protein peptide-reactive T cells in healthy family members. *Acta Neurol Scand* 1994; **89**: 184-9.
- Genain CP., Cannella B., Hauser SL y Raine CS.** Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med* 1999; 5, 170-175.
- Gross CE, Bednar MM, Howard DB and Spom MB** (1993) Transforming growth factor beta I reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* 24, 558-562.
- Harbige LS, Crawford MA, Jones J, Preece AW y Forti A.** Dietary intervention studies on the phosphoglyceride fatty acids and electrophoretic mobility of erythrocytes in multiple sclerosis. *Prog. Lipid Res* 1986; 25, 243-248.
- Harbige LS.** Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. (1996) *Nutr Health*, 10 (4): 285-312.

- Harbige LS (1998). Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 57, 555-562.
- 5 Harbige LS, Yeatman N, Amor S y Crawford MA (1995) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel source of y-linolenic acid. *British Journal of Nutrition* 74, 701-715.
- 10 Harbige LS., Layward L., Morris-Downes MM., Dumonde DC y Amor S. The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PGE2) production. *Clin Exp Immunol* 2000; 122, 445-452.
- 15 Henrich Noack P, Prehn JH y Kriegstein J. (1996) TGF-beta I protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischaemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke*, 27, 1609-1614.
- 20 Hirsch RL, Panitch HS, Johnson KP. Lymphocytes from multiple sclerosis patients produce elevated levels of gamma interferon *in vitro*. *J Clin Immunol* 1985; 5: 386-9.
- 25 Hollifield RD, Harbige LS, PhM-Dinh D, Sharief M. Evidence for cytokine Dysregulation in Multiple Sclerosis: Peripheral Blood Mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity*, 2003 36(3): 133-141.
- 30 Imamura K, Suzumura A, Hayashi F y col. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 1993; 87: 281-5.
- 35 Issazadeh S, Lorentzen JC, Mustafa MI y col. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* 1996; 69: 103-15.
- 40 Johns LD, Sriram S. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 1-7.
- 45 Kerlero de Rosbo N, Hoffinan M, Mendel I y col. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3059-69.
- 50 Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB y col. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 1993; 92: 2602-8.
- 55 Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1: 1255-63.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S y Kaluza J. (1996) Increased expression of TGF-beta I in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 27, 852-857.
- 60 Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol* 1991; 34: 159-64.
- 65 Lu CZ, Jensen MA, Arnason BG. Interferon gamma-and interleukin-4-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1993; 46: 123-8.
- 70 Maimone D, Reder AT, Gregory S. T cell lymphokine-induced secretion of cytokines by monocytes from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol* 1993; 146: 96-106.
- 75 Martino G, Hartung H-P. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 309-21.
- 80 McCarron RM, Wang L, Racke MK y col. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 1993; 43: 23-30.
- 85 McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul; 50(1): 121-7.
- 90 Merrill JE, Strom SR, Ellison GW y col. *In vitro* study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 1989; 9: 84-96.

- Merrill JE, Zimmerman RP.** Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. *Glia* 1991; **4**: 327-31.
- 5 **Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C** y col. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6407-15.
- Mokhtarian F, Shi Y, Shirazian D** y col. Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. *J Immunol* 1994; **152**: 6003-10.
- 10 **Navikas V, Link H.** Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; **45**: 322-33.
- Noseworthy JH.** Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999; 399 (6738 Suppl), A40-47.
- 15 **Ota K, Matsui M, Milford EL** y col. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990; **346**: 183-7.
- 20 **Perkin GD, Wolinsky JS.** Fast facts-Multiple Sclerosis, 1st Edn. Oxford, UK: *Health Press*, 2000.
- Philippe J, Debruyne J, Leroux-Roels G** y col. *In vitro* TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 1996; **98**: 286-90.
- 25 **Phylactos AC, Ghebremeskel K, Costeloe K, Leaf AA, Harbige LS, Crawford MA.** (1994). Polyunsaturated fatty acids and antioxidants in early development. Possible prevention of oxygen-induced disorders. *Eur J Clin Nutr.* 48 Suppl 2: S17-23.
- 30 **Prehn JH, Peruche B, Unsicker K and Kriegstein J.** (1993). Isoform-specific effects of transforming growth factor-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J. Neurochem.* 60, 1665-1672.
- 35 **Racke MK, Sriram S, Calrimi J, Cannella B, Raine CS y McFarim DE** (1993). Long-term treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-p2. *Journal of Neuroimmunology*, **46**, 175-183.
- Racke MK, Cannella B, Albert P** y col. Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 1992; **4**: 615-20.
- 40 **Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B** y col. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; **44**: 1523-6.
- Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B** y col. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1995; **37**: 82-8.
- 45 **Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM** y col. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1990; **172**: 1193-200.
- 50 **Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, Ruddle NH, Palladino MA, Gold LI y Thorbecke GJ** (1993). Studies on the mechanisms by which Transforming Growth Factor-p protects against allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology* **151**, 1116-1127.
- Schiefer HB, Hancock DS, Loew FM.** Long-term effects of partially hydrogenated herring oil on the rat myocardium. *Drug Nutr Interact.* 1982; 1(2): 89-102.
- 55 **Schluesener HJ, Lider O.** Transforming growth factors beta 1 and beta 2: cytokines with identical immunosuppressive effects and a potential role in the regulation of autoimmune T cell function. *J Neuroimmunol* 1989; **24**: 249-58.
- 60 **Selmaj K, Raine CS, Cannella B** y col. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991; **87**: 949-54.
- Selmaj K, Raine CS, Farooq M** y col. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991; **147**: 1522-9.
- 65 **Sharief MK, Thompson EJ.** *In vivo* relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; **38**: 27-33.

- Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM y col. Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 907-17.
- Vartanian T, Li Y, Zhao M y col. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995; **1**: 732-43.
- Vivien D, Bemaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET y Nouvelot A. (1998). Evidence of type I and type II
- 10 transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **70**, 2296-2304.
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B y col. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994; **179**: 973-84.
- Patente de Japón 6172263 (1994) Y. Kosugi y col., Agency of Industrial Science & Technology High-purity arachidonic acid triglyceride and its production.
- 20 Patente de EE.UU. N° 4,888,324 (1989) N. Catsimpoolas y col., Anglo-Medical Corporation Method for enhancing angiogenesis with lipid containing molecules.
- Y. Kosugi y N. Azuma, *J Amer. Oil Chem. Soc.*, **71**, 1397-1403 (1994). Synthesis of Triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized ipase.
- 25 J. W. Hageman y col., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 49,118-xxx (1972) Preparation of glycerin and their uses.
- E. S. Lutton y A. J. Fehl, *Lipids*, **5**, 90-99 (1970). The polymorphism of odd and even saturated single acid triglycerides, C8-C22.
- 30 D. Horrobin, A. McMordie, M. S. Manku (Scotia Holdings PLC UK) Solicitud de patente europea N° EP 609078, 3 de Agosto de 1994. Phospholipids containing two different unsaturated fatty acids for use in therapy, nutrition, and cosmetics.
- 35 Y.-S. Huang, X. Lin, P. R. Redden y D. F. Horrobin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 625-631, (1995). *In vitro* Hydrolysis of Natural and Synthetic y-Linolenic Acid-Containing Triacylglycerols by Pancreatic Lipase.
- K. Osada, K. Takahashi, M. Hatano y M. Hosokawa, *Nipón Suisan Gakkaishi*, **57**, 119-125 (1991). Chem. Abstr., 115:278299 Molecular Species of Enzymically-synthesized Polyunsaturated Fatty acid-rich Triglycerides.
- 40 J.-W. Liu, S. DeMichele, M. Bergana, E. Bobik, Jr., C. Hastilow, Lu-Te Chuang, P. Mukerji y J.-S. Huang., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 489-493 (2001) Characterization of Oil Exhibiting High y-Linolenic Acid from a Genetically transformed Canola Strain.
- 45 D. R. Kodali, D. Atkinson, T. G. Redgrave and D. Small, *J Lipid Res.*, **28**, 403-413 (1987). Structure and polymorphism of 18-Carbon Fatty Acid Triacylglycerols: Effect of Unsaturation and Substitution in the 2-Position.
- P. H. Bentley Y W. McCrae. *J. Org. Chem.* **35**, 2082-2083 (1970). An Efficient Synthesis of Symmetrical 1,3-Diglycerides.
- 50 M. Berger, K. Laumen y M. P. Schneider, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 955-959, (1992). Enzymatic Esterification of Glycerol 1. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn-Diacylglycerols.
- A. P. J. Mank, J. P. Ward y D. A. van Dorp, *Chem. Physics Lipids*, **16**, 107-114 (1976). A versatile, flexible synthesis of 1,3-diglycerides and triglycerides.
- L. Hartman, *Chem. Rev.*, **58**, 845-867 (1958) y las referencias del mismo. Advances in the Synthesis of Glycerides of Fatty Acids.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

TABLA 1
Características de composición (% total de AGs) de distintos aceites y sus efectos protectores en la EAE

Tratamiento	18:2n-6	18:3n-6	18:2n-6/18:3n-6	18:ln-9	INCIDENCIA DE LA EAE
FGO	17	20	0,6	35	0/10
BOO	37	24	1,5	15	3/10
EPO	71	9,4	7,5	9	7/10
SAF	66	-	-	17	9/10
Controles	-	-	-	-	9/10

FGO, Aceite de hongo; BOO, aceite de borraja; EPO, aceite de onagra; SAF, aceite de cártamo.

TABLA 2
Grupos de tratamiento - Ensayo clínico de EM con aceite de borraja según el documento PCT/GB04/002089

Grupo	Mujeres	Hombres	Tasa media de recaídas (en los últimos 2 años)	EDSS base media	Número
Placebo	7	4	2,6	3,9	11
Dosis baja	5	2	2,9	3,5	7
Dosis alta	8	2	3,4	2,8	10
Total	20	8	2,9	3,4	28

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 3. Comparación de especies moleculares de triacilglicerol-GLA (TG-GLA), etil-éster-GLA (EE-GLA) y aceite de *Borago Officinalis*-GLA (BOR-GLA) en CREAЕ inducida por MOG en ratones

SUTL	Tratamiento	Nº con EAE	Resultado clínico medio
	Control	10/11	3,3±1,3
	EE-GLA ^a	5/6	3,0±0,8
	TG-GLA ^a	3/6	1,0±1,3 ^c
	BOR-GLA ^b	3/6	1,0±1,2 ^c

^a Animales a los que se suministraron 100 μ l del lípido de ensayo; ^b se suministraron 250 μ l de BOR-GLA. Significación de la diferencia comparada con los controles, ^c $p < 0,05$

Tabla 4. Efecto del aceite de semilla de grosella negra enriquecido (73% de GLA) sobre la incidencia de la EAE

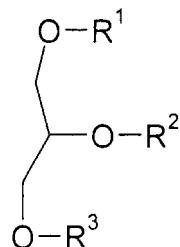
	% de incidencia de la EAE (días después de la inmunización)		
	13	17	21
Controles (n= 10)	60	90	10
Grosella negra (n= 10)	10	80	70

Nota: El aceite de grosella negra retrasa la incidencia pero no proporciona una protección total. Los animales se alimentaron 7 días después de la sensibilización (inmunización).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un glicérido lipídico de estructura definida de fórmula II

5



10

15

en la que R^1 y R^3 son iguales y son $-C(O)(CH_2)_nCH_3$, en la que n se selecciona de 4 a 14 y R^2 se selecciona entre residuos de γ -linolenilo y dihomo- γ -linolenilo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa desmielinizante.

20

2. Uso según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque la enfermedad es esclerosis múltiple.

25 3. Uso según la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en el que el medicamento repara lesiones del SNC en enfermedades neurodegenerativas desmielinizantes.

30 4. Uso según la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en el que el medicamento es para aliviar los espasmos y/o el dolor muscular en enfermedades neurodegenerativas desmielinizantes.

35 5. Uso según la Reivindicación 2, en el que el medicamento es para mejorar la puntuación en la escala EDSS en, al menos, 1 unidad, en un período de 1 año de tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa desmielinizante.

35 6. Uso según la Reivindicación 2, en el que el medicamento es para recuperar la EDSS de un paciente con una EDSS por encima de 2,5 a por debajo de 2, en un período de 1 año de tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa desmielinizante.

40 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la dosis diaria de lípido está entre 1 y 20 gramos.

45 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la dosis diaria de lípido es de 3 a 5 gramos.

9. Un lípido seleccionado del grupo que consiste en

45 1,3-didecanoato-2-octadecatri-(6Z,9Z,12Z)-enoato de glicerol

1,3-didecanoato-2-eicosatri-(8Z,11Z,14Z)-enoato de glicerol.

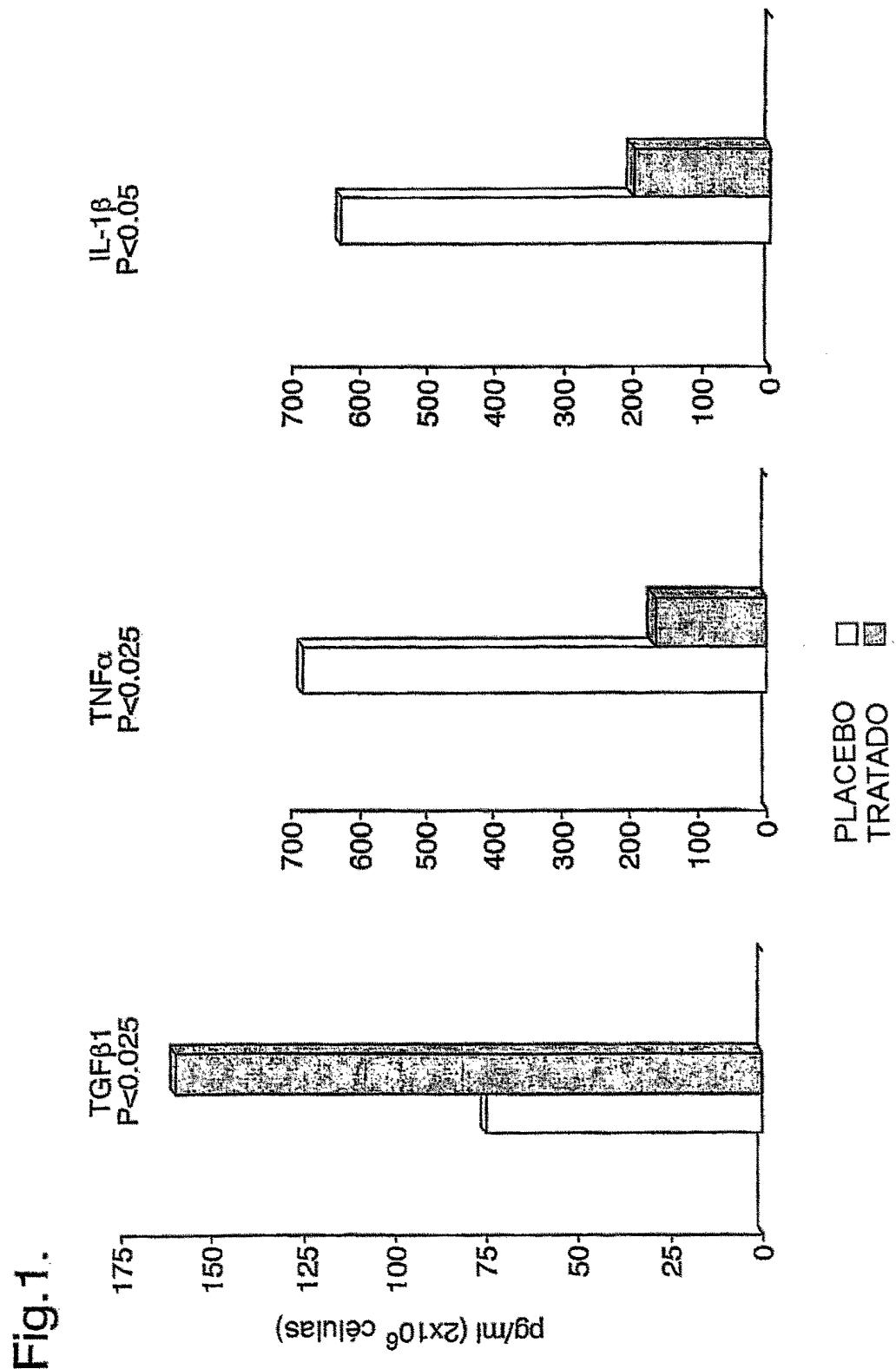
50 10. Un lípido, según la Reivindicación 9, para su uso en terapia.

55 11. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad desmielinizante que comprende un lípido de fórmula II.

55

60

65



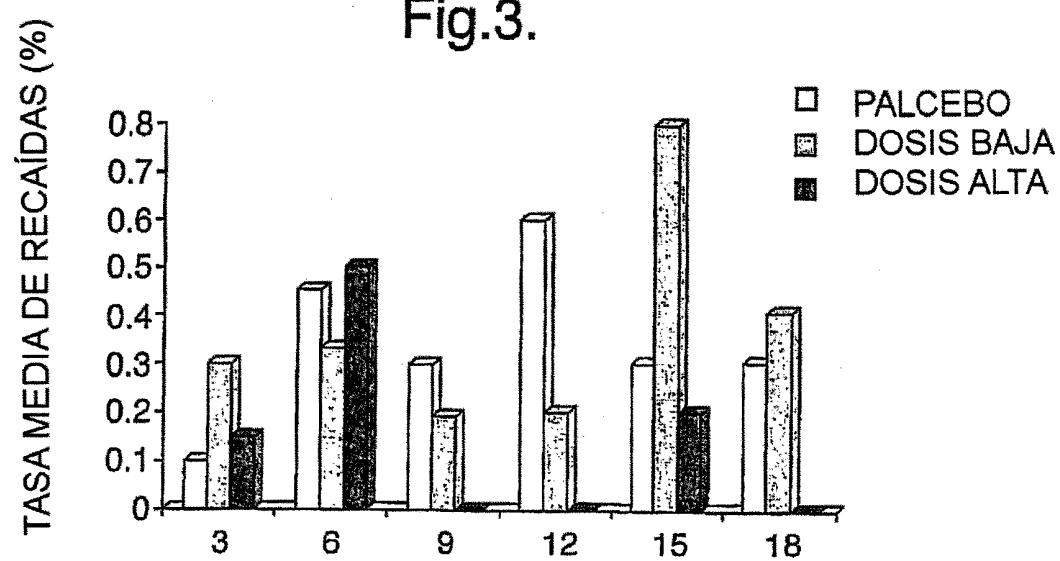
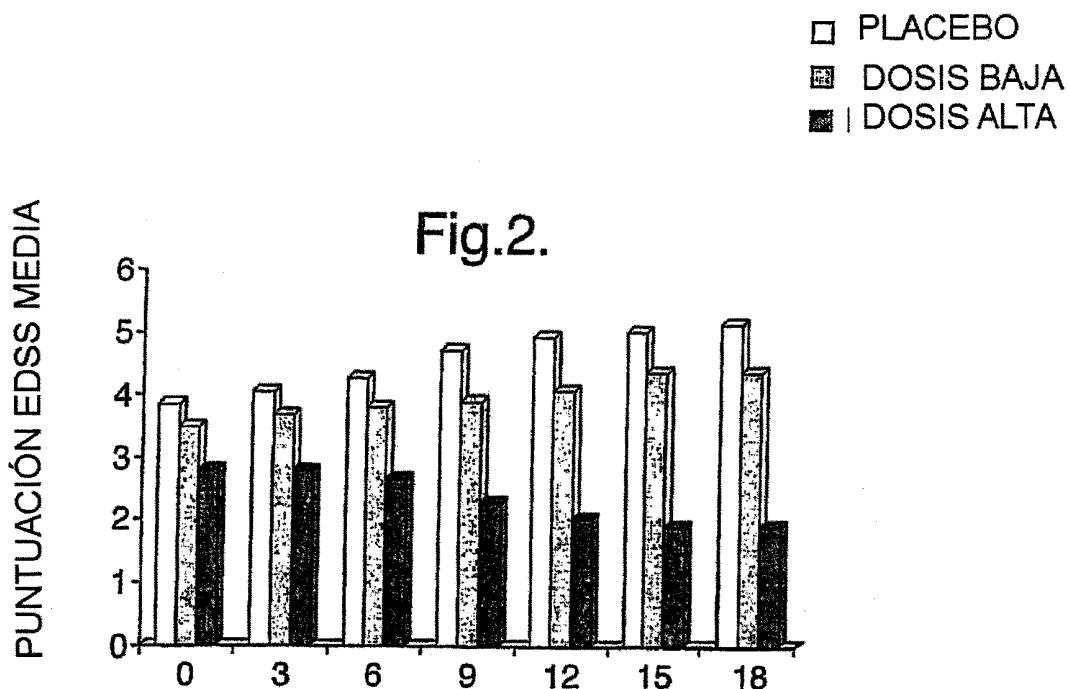
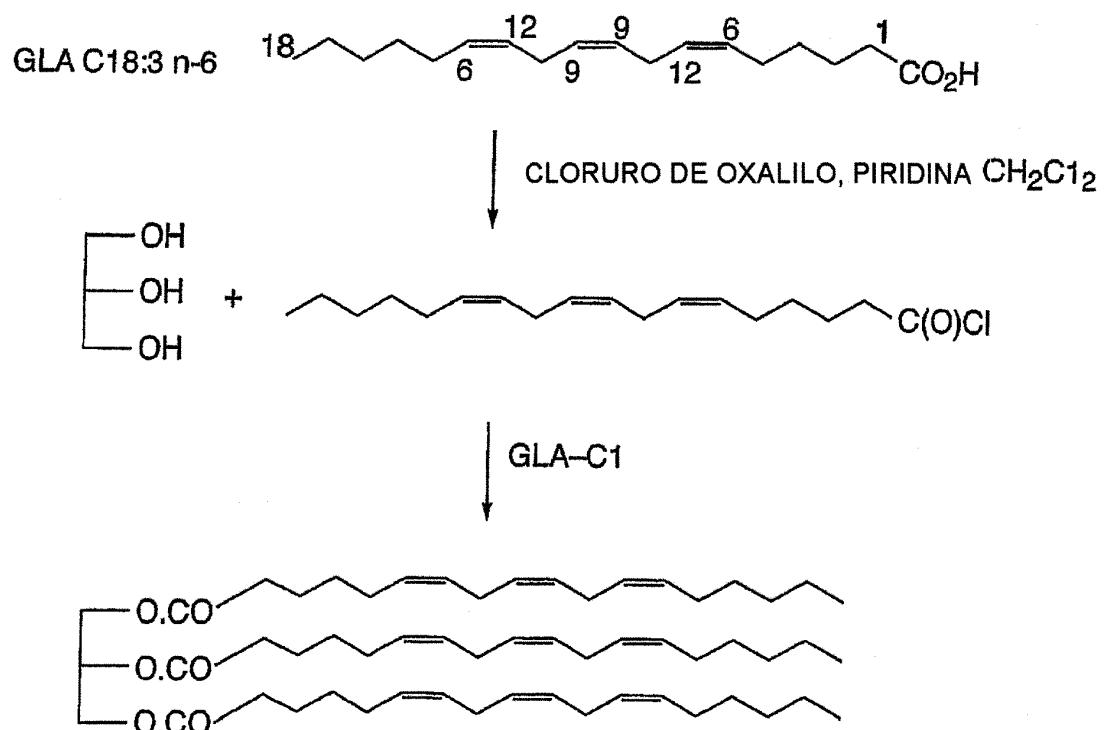


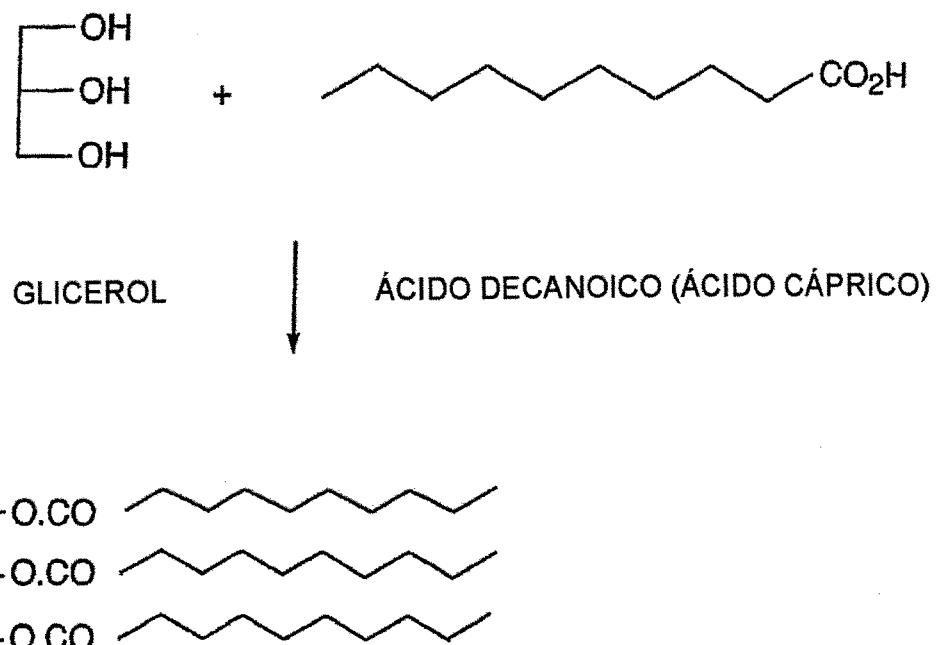
Fig.4.



2

Tris-(6-Z,9-Z,12-Z-octadecantrienoato) de glicerol C₅₇H₉₂O₆
 Trigamma-linolenina PM = 873,4
 Sistemas de numeración: negro para biólogos, azul para químicos.

Fig.5.



TRIDECANOATO DE GLICEROL $C_{33}H_{62}O_6$
 $PM = 554,85$ punto de fusión $32^\circ C$ Muestra polimorfismo

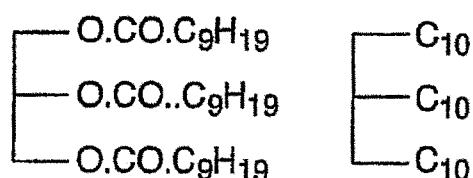


Fig.6.

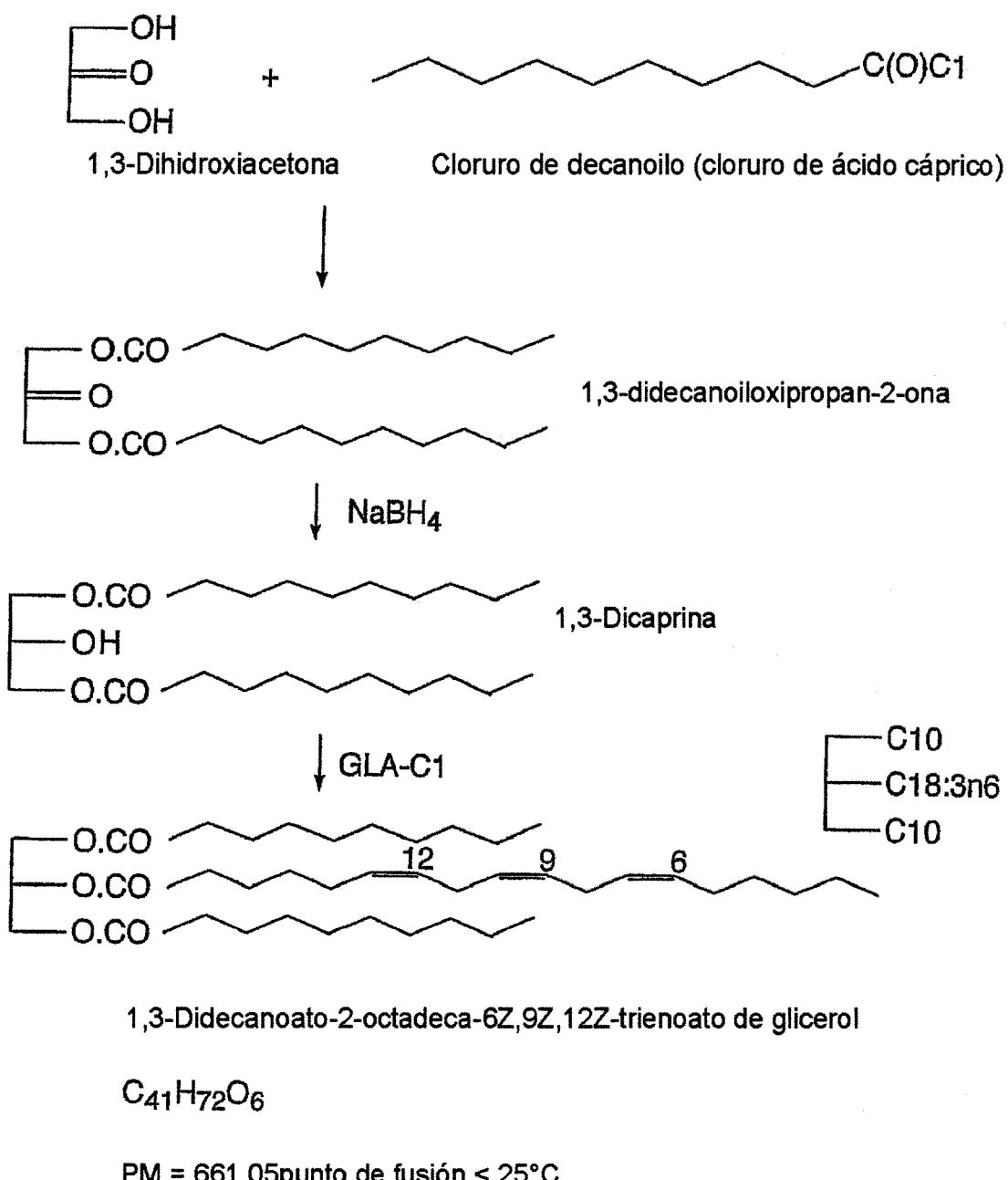
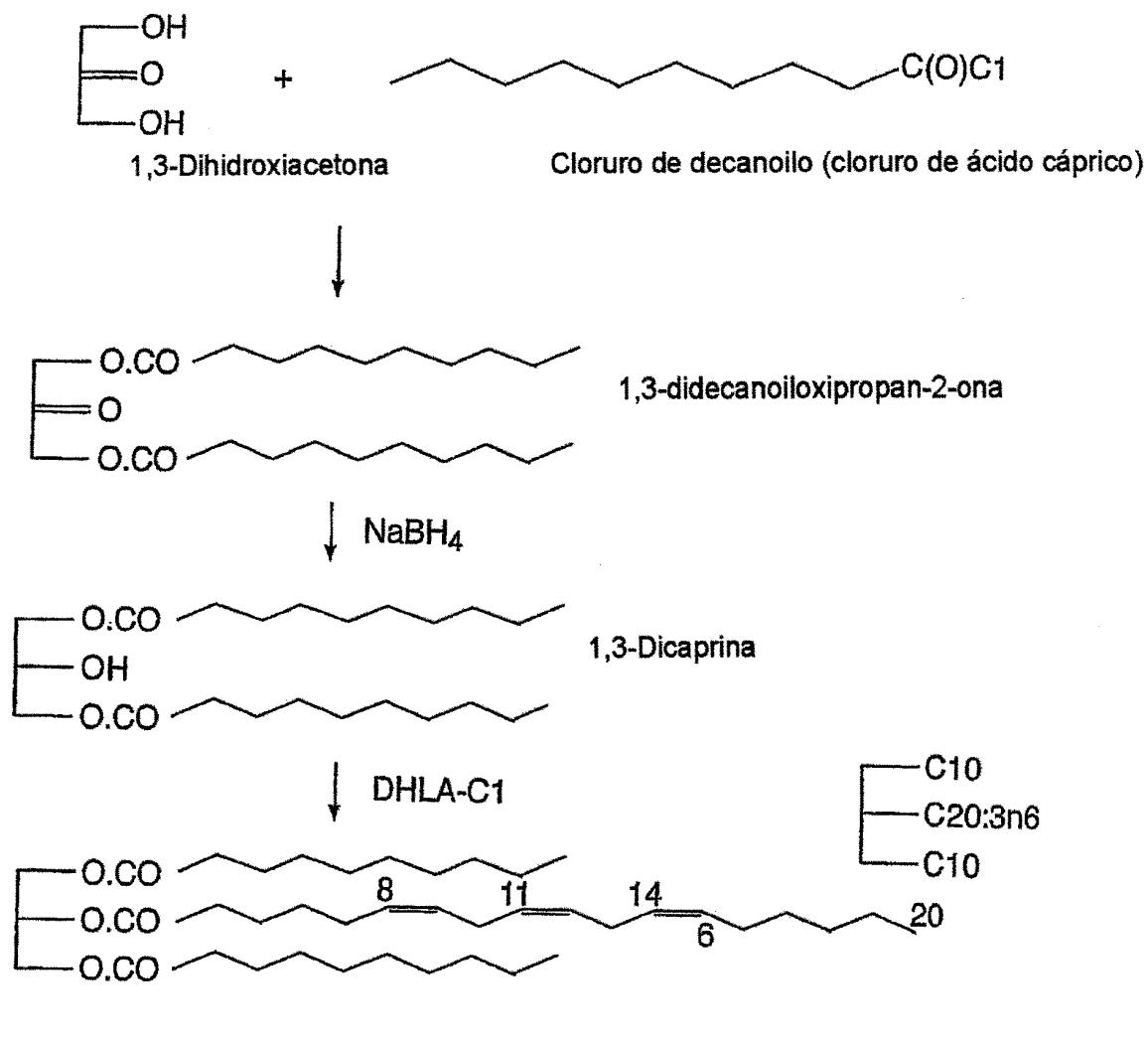


Fig.7.



1,3-Didecanoato-2-eicosa-8Z,11Z,14Z-trienoato de glicerol

$C_{43}H_{76}O_6$

PM = 689,1 punto de fusión < 25°C

Fig.8.

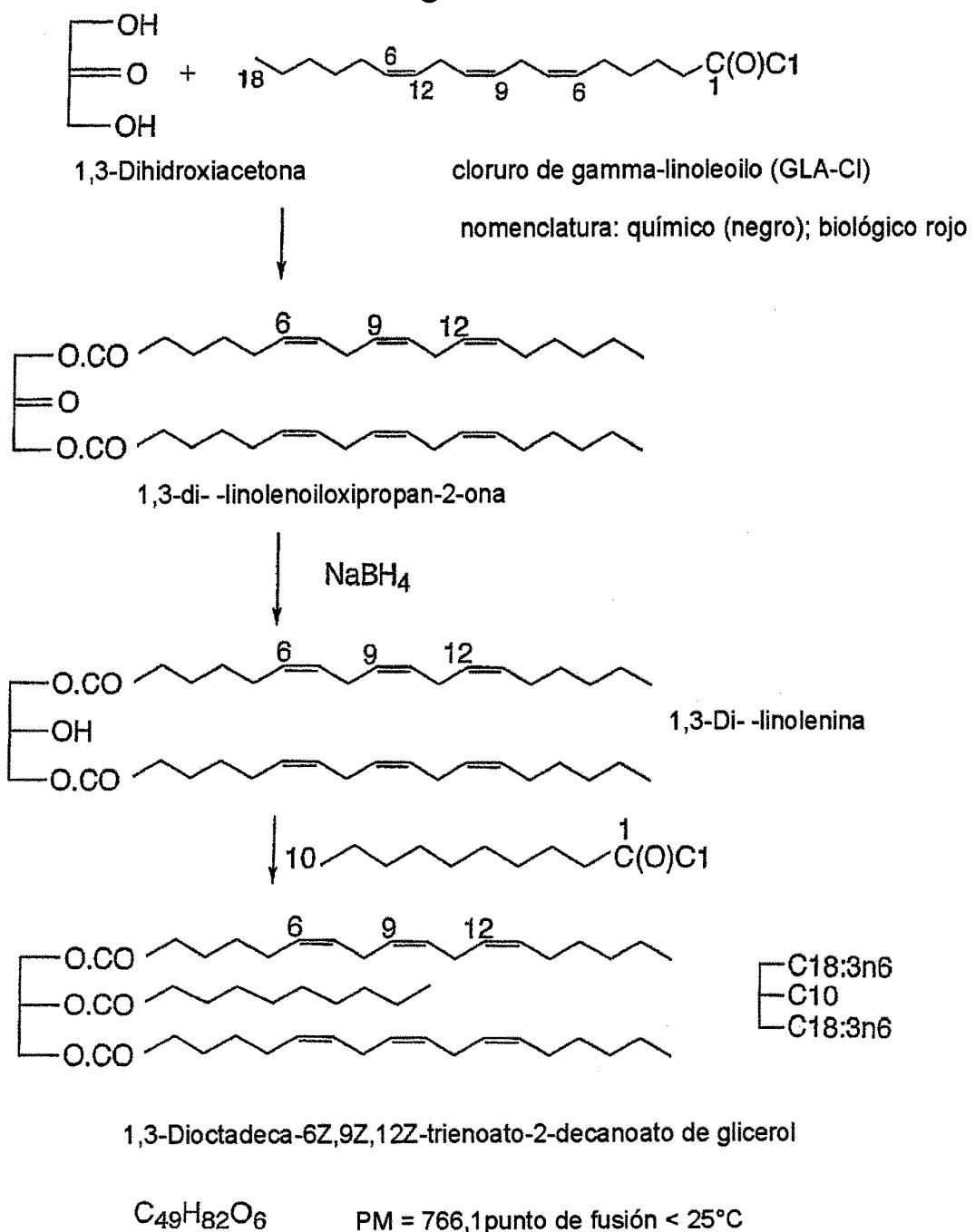


Fig.9.

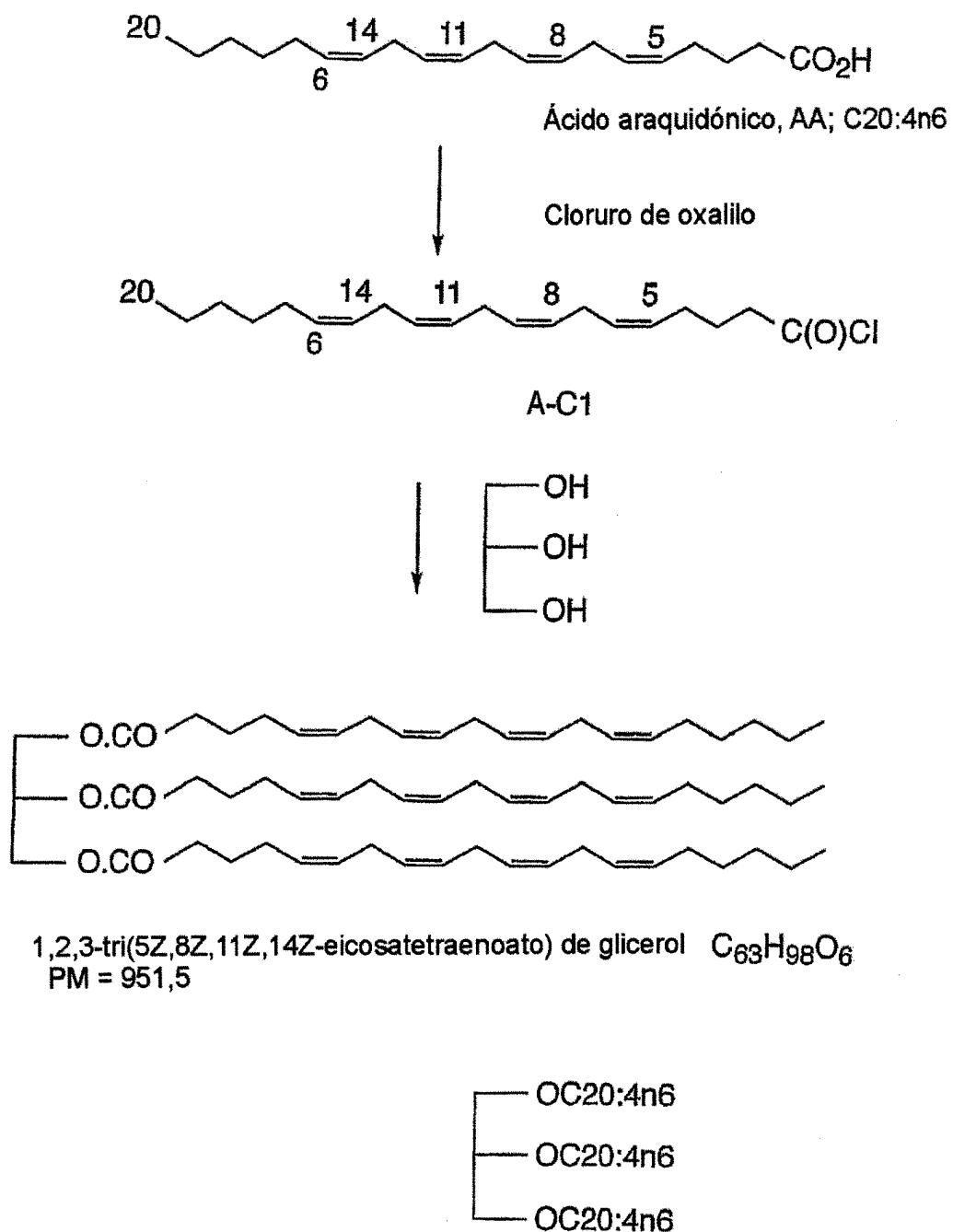
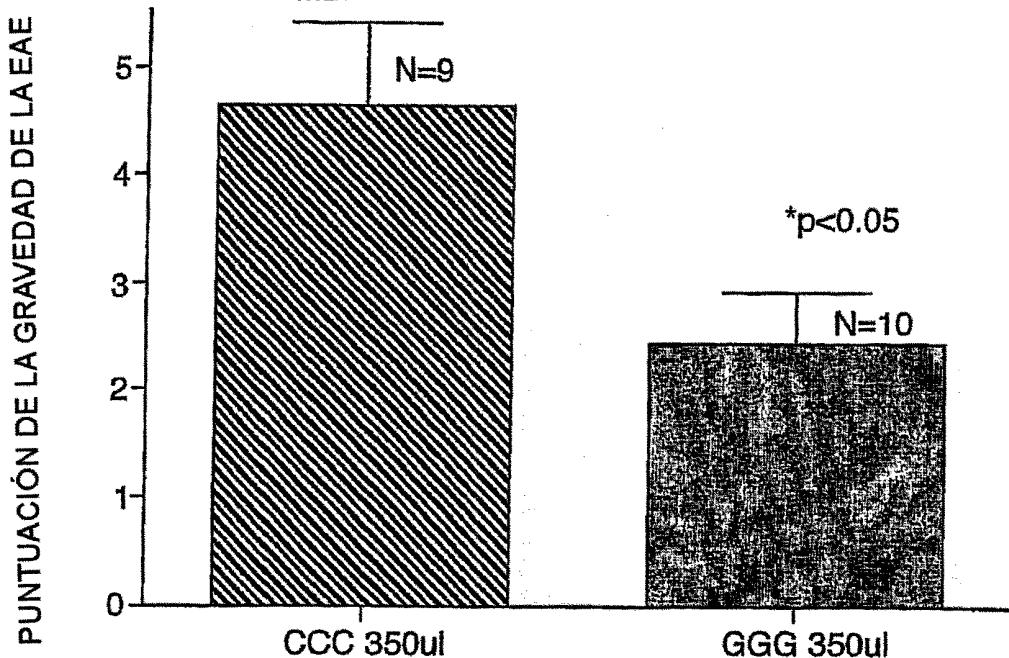


Fig.10.

MEDULA ESPINAL EAE/RATONES SJL, ESTUDIO 2



MEDULA ESPINAL EAE/RATONES SJL, ESTUDIO 7

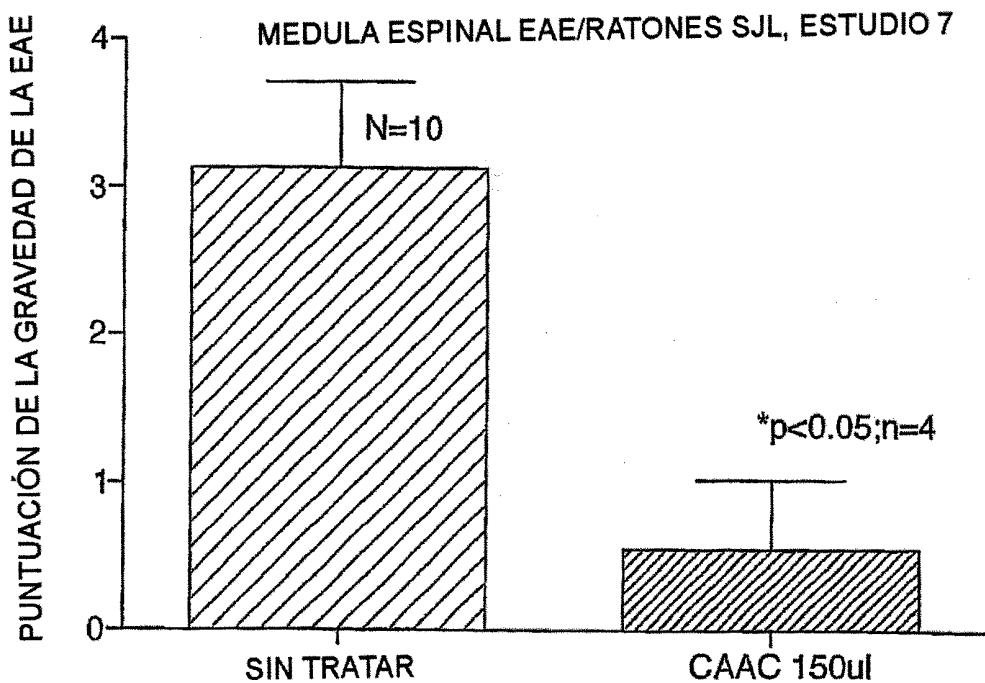
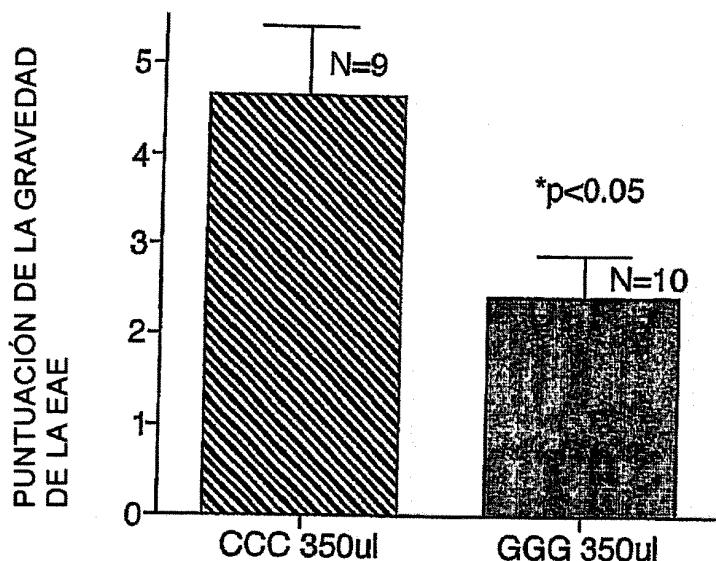


Fig. 11.

MÉDULA ESPINAL EAE/RATONES SJL, ESTUDIO 2



MÉDULA ESPINAL EAE/RATONES SJL, ESTUDIO 3

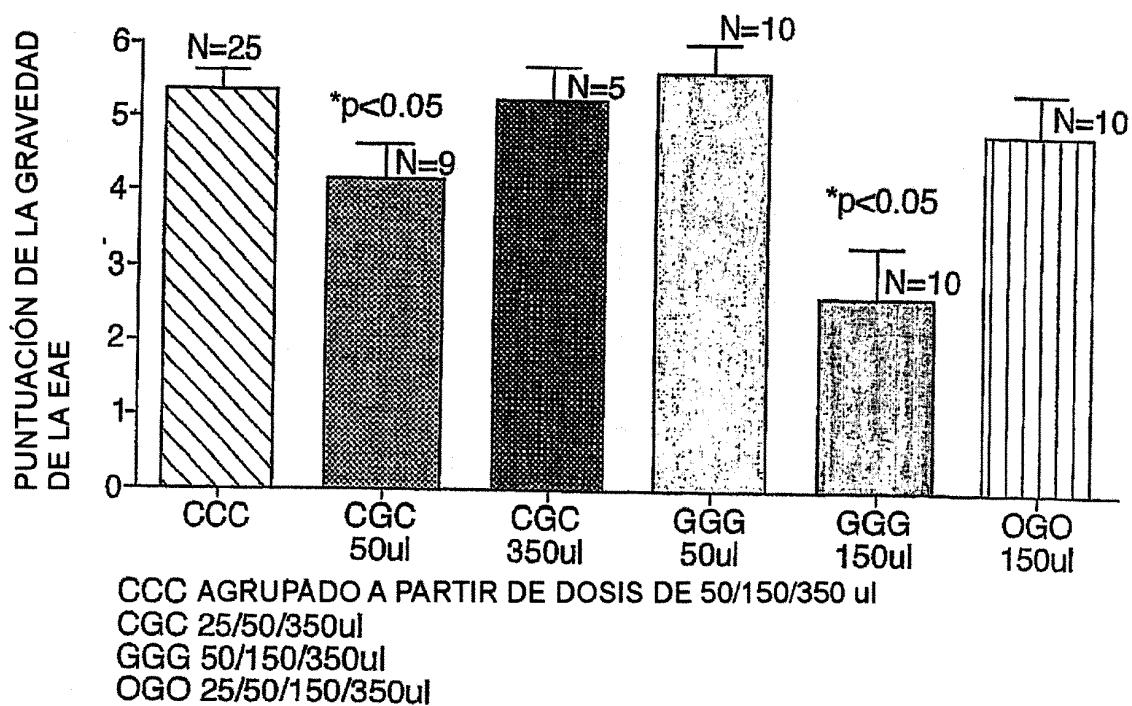
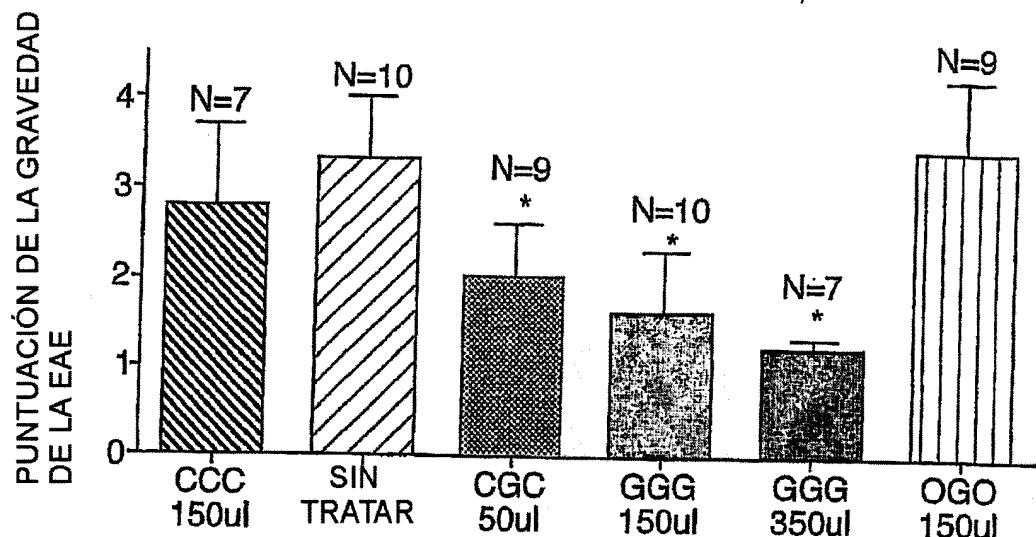


Fig.12.

MOG EAE/RATONES C57BL, ESTUDIO 4



*P<0.05 Cf SIN TRATAR

Fig.13.

MOG EAE/ESTUDIO 4, CGC

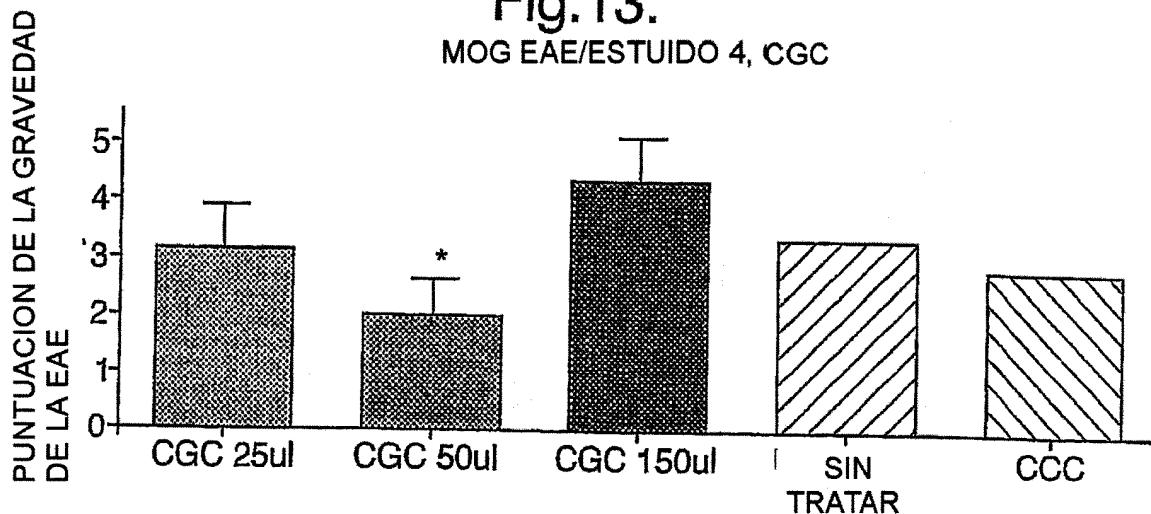


Fig.14.

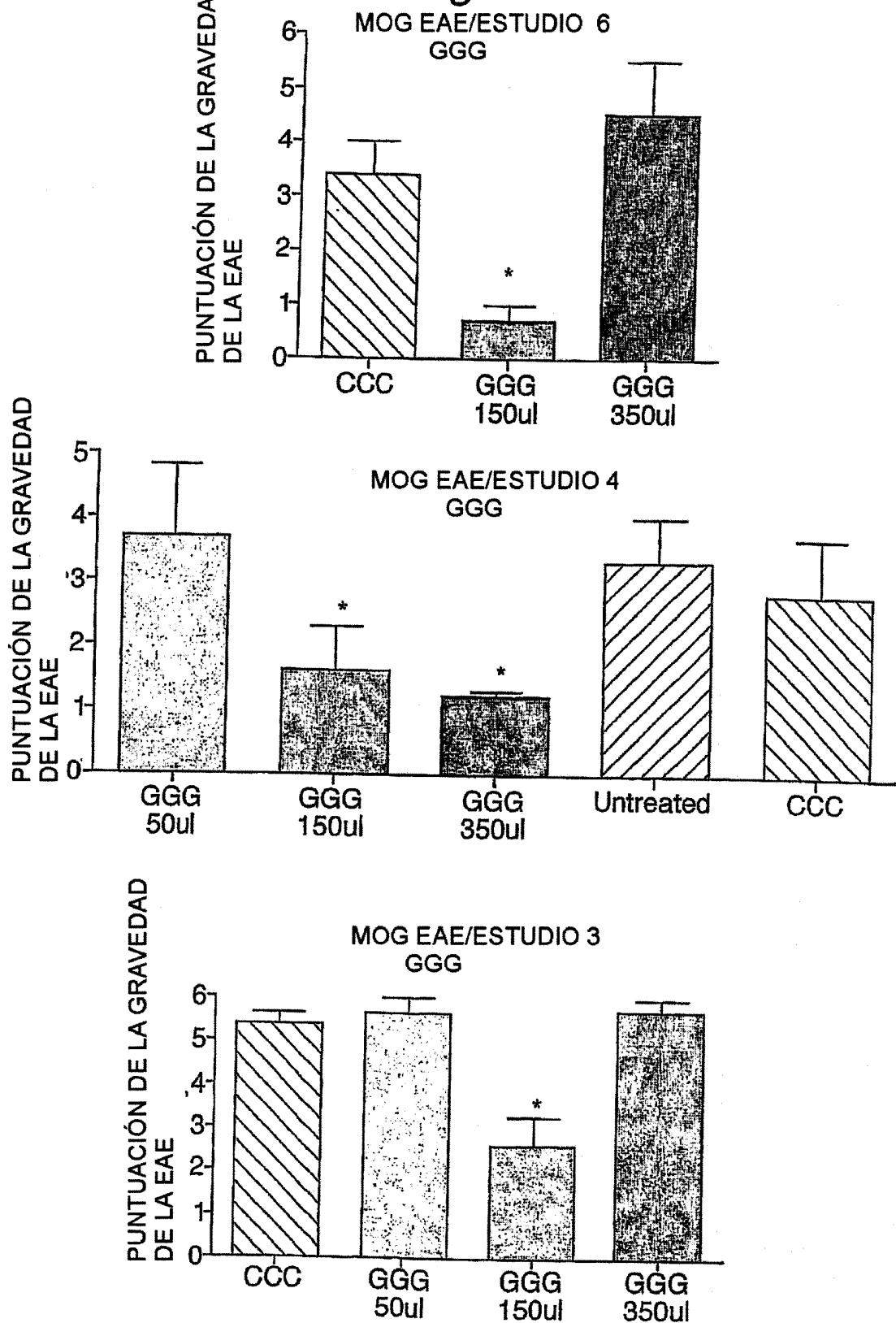
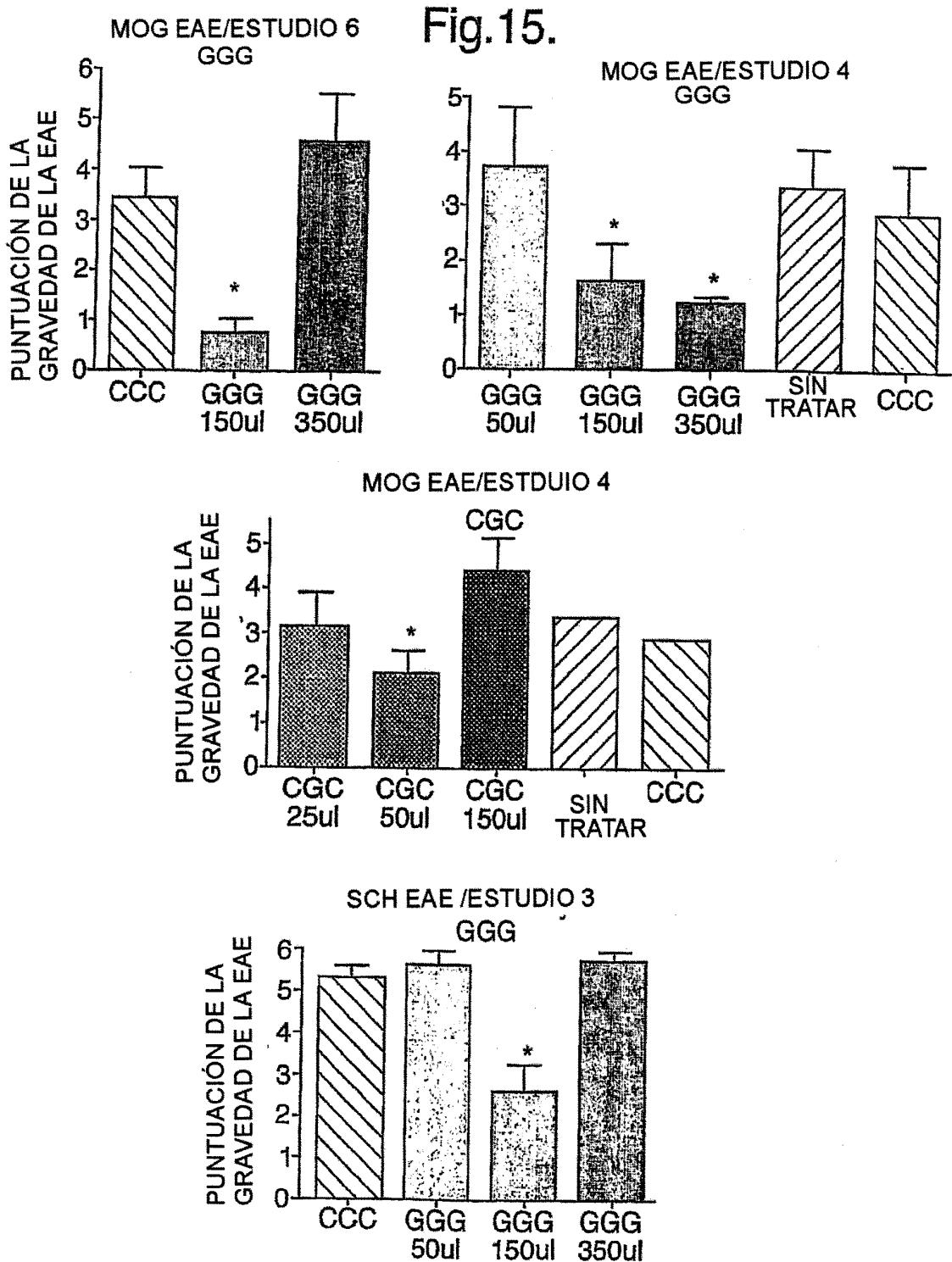


Fig.15.



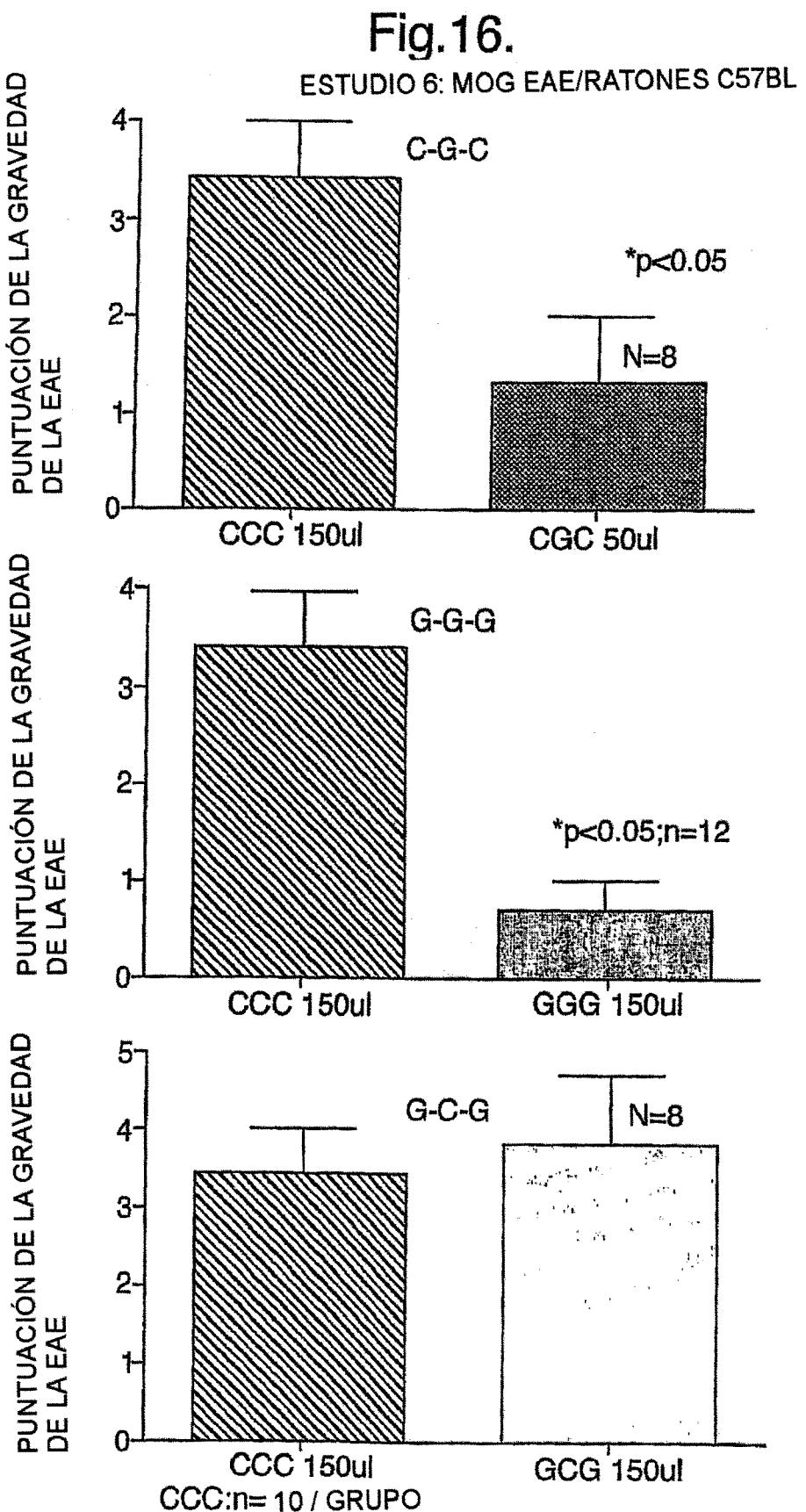


Fig.17.

ESTUDIO 6 : MOG EAE /RATONES C57BL

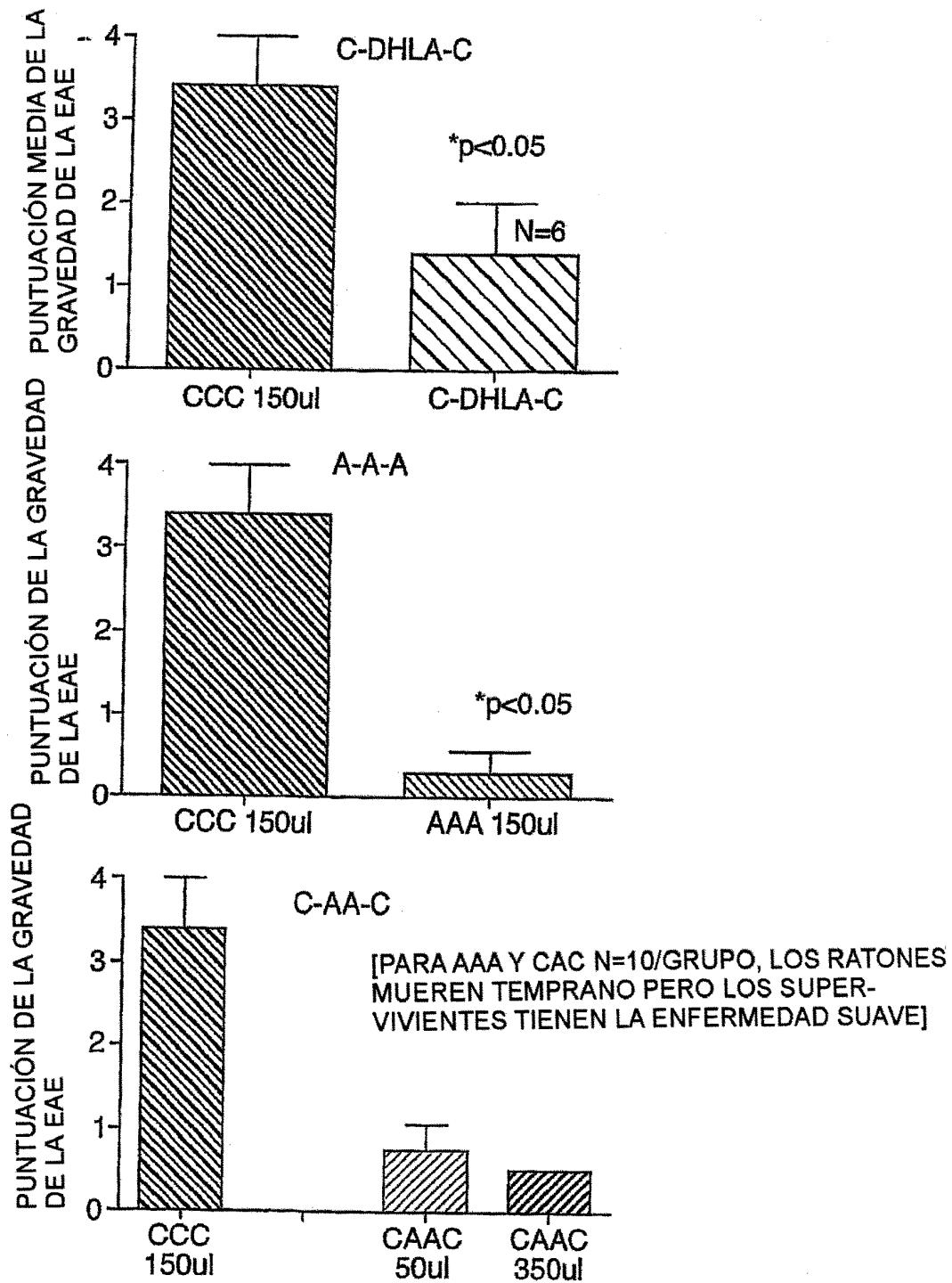
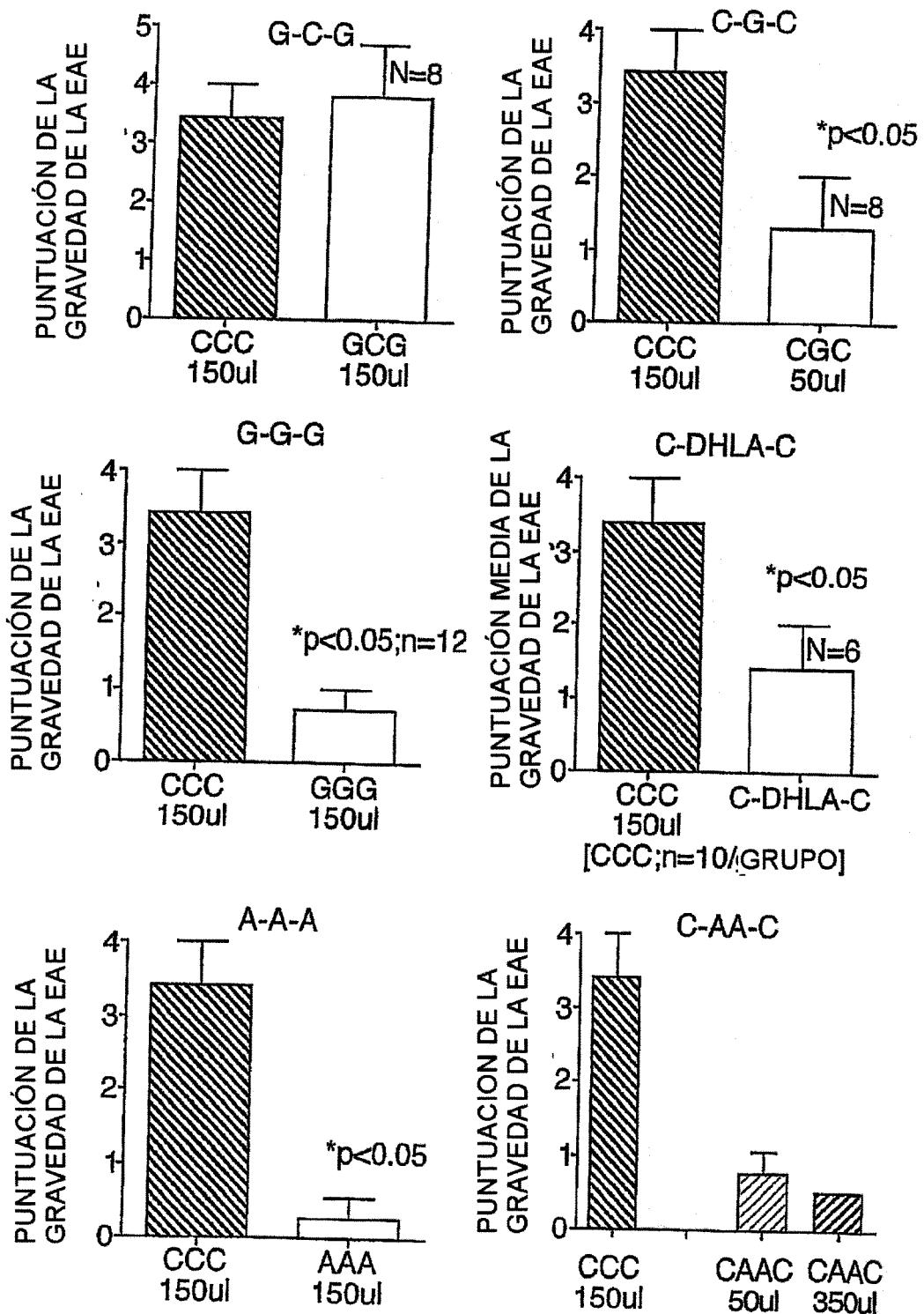


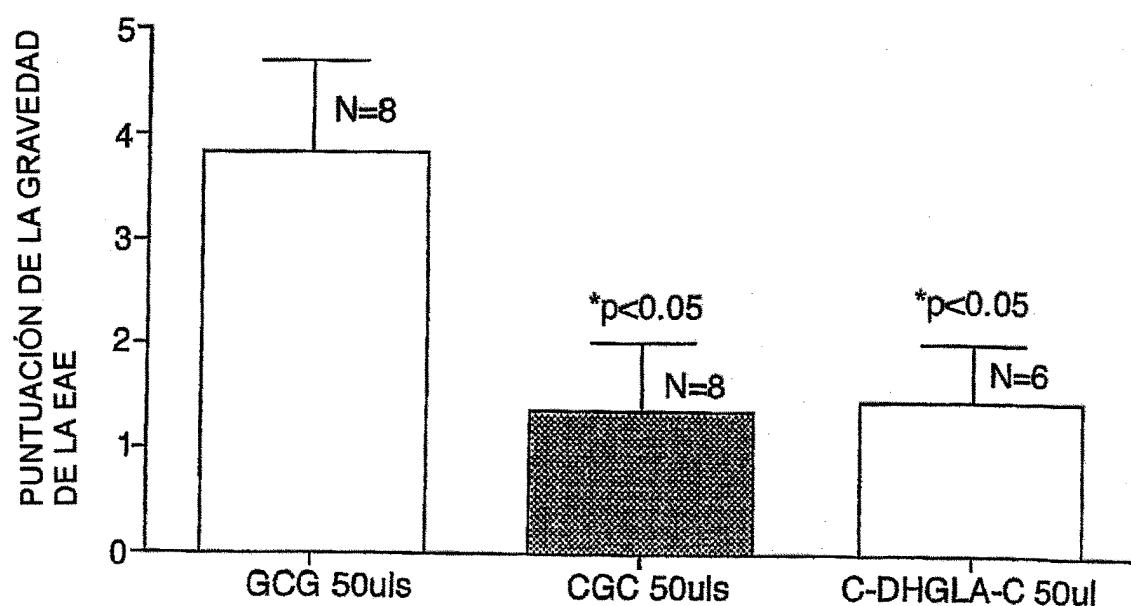
Fig. 18.
ESTUDIO 6. MOG EAE EN RATONES C57BL

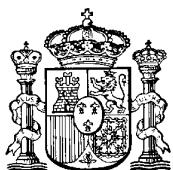


[Para AAA y CAC n = 10/grupo, los ratones mueren temprano pero los supervivientes tienen la enfermedad suave]

Fig.19.

MOG EAE EN RATONES C57BL
ESAYO DEL PRINCIPIO CON SN-2





(11) ES 2 304 094
(21) Nº de solicitud: 200650014
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 13.08.2004
(32) Fecha de prioridad: 18.08.2003
14.05.2004

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1419768 A1 (SUNTORY LIMITED) 19.05.2004, todo el documento.	1-18
X	WO 0197793 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 27.12.2001, página 8, líneas 12-30; página 9, línea 27 - página 10, línea 2; reivindicaciones 1,8.	1-11,16,17
X	US 4701469 A (FRANCOIS MENDY, PIERRE BARTHELEMY) 20.10.1987, columna 1, líneas 9-26; columna 3, líneas 5-25; columna 4, línea 55 - columna 5, línea 27; reivindicaciones 1-3.	12-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 08.08.2008	Examinador M. Cortés Duro	Página 1/2
--	------------------------------	---------------

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200650014

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/232 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07C 69/587 (2006.01)

C11C 3/02 (2006.01)