

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 907 630**

⑮ Int. Cl.:
A23L 33/10
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 17176132 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.12.2021 EP 3296284**

⑮ Título: **Uso no terapéutico de éster de hidroxibutirato**

⑯ Prioridad:

21.08.2008 US 90751 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.04.2022

⑮ Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESEN. BY THE SECRETARY OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, NAT. INST. OF HEALTH (50.0%)
Office of Technology Transfer Suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, MD 20852-3804, US y OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED (50.0%)**

⑯ Inventor/es:

CLARKE, KIEREN y VEECH, RICHARD LEWIS

⑯ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 907 630 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso no terapéutico de éster de hidroxibutirato

Campo de la invención

La presente invención se refiere a usos no terapéuticos de ésteres de hidroxibutirato, que elevan los niveles en sangre de cuerpos de cetona.

Antecedentes de la invención

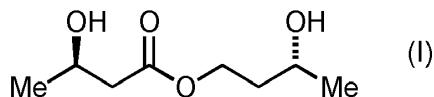
Los cuerpos de cetona incluyen (R)-3-hidroxibutirato y acetoacetato. Tal como se explica en la patente internacional WO2004/108740, en teoría, se podría administrar estos compuestos directamente para conseguir niveles elevados de cuerpos de cetona en un sujeto. Sin embargo, la administración directa de los compuestos no resulta práctica y es potencialmente peligrosa. Por ejemplo, la administración directa de (R)-3-hidroxibutirato o acetoacetato en su forma de ácido libre puede tener como resultado una acidosis grave tras la rápida absorción desde el tracto gastrointestinal. La administración de la sal sódica de estos compuestos en cantidades no reguladas también es inconveniente debido a la sobrecarga de sodio potencialmente peligrosa que puede acompañar a la administración de cantidades terapéuticamente pertinentes de los compuestos.

Frente a estos antecedentes, el documento WO2004/108740 divulga derivados de (R)-3-hidroxibutirato que sirven como precursores de los cuerpos de cetona, tales como acetoacetato y (R)-3-hidroxibutirato y que, por tanto, elevan las concentraciones en sangre de cuerpos de cetona cuando se administran a un sujeto. Entre los ejemplos de derivados se incluyen ésteres, como por ejemplo, ésteres derivados de diversos alcoholes.

En el documento WO04/105742 se enseñan compuestos que reducen el nivel de ácidos grasos libres en la circulación en el plasma de un sujeto para tratar el deterioro muscular o la fatiga. Cuerpos de cetona, como ésteres de cuerpo de cetona, son ejemplos dados de dichos compuestos.

Sumario de la invención

Se ha descubierto ahora de manera sorprendente que un enantiómero en particular de un éster en particular de 3-hidroxibutirato es un precursor eficaz y agradable al paladar del (3R)-hidroxibutirato de cuerpo de cetona. En consecuencia, la presente invención proporciona un uso no terapéutico de un compuesto es un sujeto sano para mejorar el rendimiento físico, en donde el compuesto es 3-hidroxibutirato de 3-hidroxibutilo que está enantioméricamente enriquecido con respecto a (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo de fórmula (I) :



La invención proporciona además un uso no terapéutico de una composición que se puede ingerir que comprende un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, y un vehículo dietética o farmacéuticamente aceptable para mejorar el rendimiento físico en un sujeto sano.

En una realización, la invención es también adecuada para el uso no terapéutico de un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento de una afección ligada a una pérdida o ganancia de peso. Por tanto, el compuesto se puede utilizar para tratar mantener un peso saludable, o para disminuir la relación entre el músculo graso y el músculo magro en un sujeto sano. El compuesto puede utilizarse de manera no terapéutica como suplemento dietético.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un gráfico del peso corporal diario (en gramos/rata/día) de ratas alimentadas con una dieta de hidratos de carbono, grasa o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 2 muestra un gráfico del consumo de alimento diario (en gramos/rata/día) para ratas alimentadas con una dieta de hidratos de carbono, grasa o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 3 contiene micrografías que presentan los niveles de cuerpos celulares FNDC positivos en el área del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y en el hipotálamo de ratas tratadas durante 14 días con una dieta de grasas, hidratos de carbono o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 5. Se observa un número significativamente mayor de cuerpos de celulares FNDC positivos en el NPV de la rata tratada con la dieta de cetona en comparación con las ratas tratadas con una dieta de grasas e hidratos de carbono. Se realizaron observaciones similares en el hipocampo de las ratas tratadas con cetonas.

La Figura 4 presenta micrografías que presentan los niveles de cuerpos celulares MC4R positivos en el área del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo de ratas tratadas durante 14 días con una dieta de grasas, hidratos de carbono

o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 5. Se observa un número significativamente mayor de cuerpos celulares MC4R positivos en las regiones magnocelular posterior (pm) y parvocelular medial (mpd) del NPV en las ratas tratadas con la dieta de cetona y la dieta de hidratos de carbono, con respecto a las ratas tratadas con la dieta de grasas.

5 La Figura 5 Presenta imágenes en aumento de las micrografías de la Figura 5. Las micrografías presentan la presencia de un área significativamente más densa de cuerpos celulares MC4R positivos en el NPV de ratas con una dieta de cetona o una dieta hidratos de carbono (Cho) en comparación con las ratas con la dieta de grasas. La Figura 6 contiene 10 micrografías que presentan los niveles de CART en el área posterior del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo de ratas tratadas durante 14 días con una dieta de grasas, hidratos de carbono o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 5. Se observa un número significativamente mayor de cuerpos celulares CARt positivos en los NPV de las ratas tratadas con dietas de cetona e hidratos de carbono con respecto a las ratas tratadas con la dieta de grasas. El máximo nivel de CART se observa en el NPV de las ratas tratadas con la dieta de cetona.

15 La Figura 7 presenta micrografías que presentan los niveles de CART en las áreas del núcleo ventromedial (VMH), núcleo arqueado (ARC) y eminencia media (ME) del hipotálamo de ratas tratadas durante 14 días con una dieta de grasas, hidratos de carbono o el compuesto de fórmula (I) ("cetona") en el ensayo que se describe en el Ejemplo 5. El 20 máximo número de cuerpos celulares CART positivos en estas áreas se observa en las ratas tratadas con la dieta de cetona.

25 La Figura 8 presenta imágenes en aumento de cada una de las micrografías de la Figura 7. Dichas imágenes en aumento muestran claramente la presencia de un número significativamente mayor de cuerpos celulares CART en el NPV de las ratas con la dieta de cetona con respecto a las ratas con dietas de grasas e hidratos de carbono.

30 La Figura 9 presenta otras imágenes en aumento de las micrografías de las Figuras 7 y 9, que muestran que los NPV de las ratas tratadas con dieta de cetona tienen la máxima densidad de cuerpos positivos CART positivos.

Descripción detallada de la invención

35 El compuesto de fórmula (I) es 3-hidroxibutilo enriquecido enantioméricamente con respecto al enantiómero (3R, 3R'). El término "enriquecido" tal como se emplea en el presente documento significa que el nivel de isómero enriquecedor es superior al nivel en el que se produciría normalmente el isómero en una mezcla racémica. Cuando se hace referencia al porcentaje de enriquecimiento, el isómero enriquecedor constituye el porcentaje del total de 3-hidroxibutilo de 3-hidroxibutilo presente. Generalmente, el 3-hidroxibutilo de 3-hidroxibutilo en la presente 40 invención está enriquecido enantioméricamente en al menos 90%, preferentemente 95% con respecto a (3R)-hidroxibutilo de (3R)-hidroxibutilo. Es decir, el 3-hidroxibutilo de 3-hidroxibutilo total presente, en al menos 90% y preferentemente 95% es el isómero (3R)-hidroxibutilo de (3R)-hidroxibutilo. En otra realización el 3-hidroxibutilo de 3-hidroxibutilo puede comprender al menos 97%, por ejemplo 98% o 99%, del enantiómero (3R, 3R).

45 El compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido, se puede preparar a través de un proceso que comprende llevar a cabo una reacción de transesterificación entre (3R)-hidroxibutilo de etilo y (R)-1,3-butanodiol en presencia de una enzima lipasa. La reacción se lleva a cabo normalmente a aproximadamente 40 °C durante un período de tiempo de aproximadamente 96 horas. En el Ejemplo 1, más adelante, se describe un ejemplo del procedimiento. Normalmente, se somete el producto de reacción a destilación de lámina enjuagada (BPF). Esto comprende un paso desgasificante, un segundo paso de corte ligero para eliminar los materiales de partida y, a continuación, un paso final. Las condiciones 50 del paso final son normalmente 145°C a 1,8 Torr).

Una muestra de 3-hidroxibutilo de 3-hidroxibutilo enriquecida con respecto al enantiómero (3R, 3R) proporciona niveles en sangre apreciablemente elevados de (3R)-hidroxibutilo, un cuerpo de cetona, cuando se consumen oralmente. El compuesto de fórmula (I) representa por lo tanto un medio eficaz para administrar (3R)-hidroxibutilo a un sujeto.

55 Hay dos ventajas en particular asociadas con la invención. En primer lugar, el enantiómero (3R, 3R) es agradable al paladar y tiene un gusto menos amargo que otros cuerpos de cetona. Por lo tanto, es particularmente adecuado para su administración oral. Esto contrasta con muchos otros cuerpos de cetona y sus derivados y precursores, que presentan de forma notoria un mal sabor y por tanto resultan difíciles de tolerar cuando se toman por vía oral. En segundo lugar, el enantiómero (3R, 3R) se escinde in vivo en la forma (3R)-hidroxibutilo y (R)-1,3-butanodiol. El (3R)-hidroxibutilo se libera inmediatamente proporcionando un efecto rápido tras la ingestión. El (R)-1,3-butanodiol se convierte en el hígado en (3R)-hidroxibutilo que se libera después en la sangre. En global, esto proporciona un perfil farmacocinético favorable, ya que se consiguen rápidamente los niveles elevados en sangre del (R)-3-hidroxibutilo deseado y después se sostienen durante un período de tiempo tras la ingestión del compuesto de fórmula (I).

60 Un compuesto de fórmula (I) actúa sobre los centros del apetito en el cerebro. En particular, un compuesto de fórmula (I) aumenta los niveles de diversos neuropéptidos anorexigénicos (neuropéptidos reconocidos por estar asociados con un menor consumo de comida y una disminución del apetito) en los centros del apetito del cerebro e induce también niveles más altos de malonil CoA, un metabolito asociado con la disminución del apetito y el consumo de comida. El

compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente es adecuado para mantener un peso saludable o disminuir la relación entre los músculos grados y los magros en un sujeto sano.

Un sujeto sano puede ser por ejemplo un individuo con un peso saludable para el que es importante el rendimiento físico y/o el aspecto físico. Entre los ejemplos se incluyen miembros del ejército, atletas, culturistas y modelos.

5 El compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, es también adecuado para su uso en promover la alerta o mejorar la función cognitiva.

Puede administrarse un compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un agente seleccionado de micronutrientes y medicamentos. El compuesto de fórmula (I) y el agente adicional se pueden formular en combinación en una sola composición para su ingestión. Alternativamente, es posible formular el compuesto de fórmula (I) y el agente adicional por separado para una administración por separado, simultánea o secuencial.

10 Cuando el agente adicional es un micronutriente, puede ser por ejemplo un mineral o una vitamina. Entre los ejemplos se incluyen hierro, calcio, magnesio, vitamina A, vitaminas B, vitamina C, vitamina D y vitamina E.

15 El compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, en concreto 3-hidroxibutirato de 3-hidroxibutilo enriquecido enantioméricamente con respecto al enantiómero (3R, 3R'), se puede formular en una composición que se puede ingerir que comprende además un vehículo dietética o farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden ser productos de comida, productos para beber, bebidas, suplementos, suplementos dietéticos, comidas funcionales o nutracéuticos.

20 La concentración del compuesto de fórmula (I) en la composición que se puede ingerir depende de diversos factores, entre los que se incluyen el formato de la composición en particular, el uso pretendido de la composición y la población objetivo. Por lo general, la composición tendrá un contenido del compuesto de fórmula (I) en una cantidad eficaz para reducir los niveles en plasma de ácidos grasos libres. Normalmente, la cantidad es la requerida para conseguir una concentración en la circulación de beta-hidroxibutirato (bHB) y/o acetoacetato de 10 pM a 20 mM, preferentemente de 50 pM a 10 mM, más preferentemente de 100 pM a 5 mM, en un sujeto que ingiere la composición. En una realización, se utiliza una cantidad para conseguir una concentración en la circulación de 0,7 mM a 5 mM, por ejemplo de 1 mM a 5 mM.

25 El objeto de la presente invención se hidroliza rápidamente en dos productos naturales, beta-hidroxibutirato (bHB) y (R)-1,3-butanodiol y, por tanto, es una fuente de calorías natural que se puede clasificar como comida y puede formar parte de un producto alimenticio.

30 Un producto alimenticio es un material comestible compuesto principalmente de uno o más macronutrientes entre proteína, hidratos de carbono y grasas. Un producto alimenticio puede contener asimismo uno o más micronutrientes como vitaminas o minerales u otros ingredientes de la dieta adicionales, como aromatizantes y colorantes.

35 Entre los ejemplos de productos alimentarios en los que se puede incorporar el compuesto de fórmula (I) como aditivo se incluyen barritas de aperitivo, barritas para sustituir la comida, cereales, repostería y formulaciones de probióticos, incluyendo yogures.

Entre los ejemplos de bebidas y productos para beber, se incluyen refrescos, bebidas de energía, mezclas de bebidas en seco, bebidas nutricionales, bebidas para sustituir la comida, composiciones para su rehidratación (por ejemplo durante el ejercicio o después de él) y té de hierbas para infusión o mezclas de hierbas para decocción en agua.

40 Una composición para rehidratación comprende normalmente agua, un hidrato de carbono azúcar y el compuesto de fórmula (I). La composición puede comprender asimismo aromatizantes, colorantes y conservantes adecuados, tal como podrán apreciar las personas especializadas. Los hidratos de carbono azúcar están presentes como fuente de energía, siendo conocidos los azúcares, entre los que se incluyen glucosa y trehalosa. Una bebida para sustituir la comida puede ser del tipo al que se recurre normalmente para su uso en regímenes para perder peso. Dichas formulaciones de bebida comprenden normalmente las cantidades adecuadas de uno o más macronutrientes, es decir, fuentes de proteína, grasa y/o hidratos de carbono, en combinación con ingredientes adicionales opcionales como agentes solubilizantes, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes.

45 En el presente documento, el término "nutracéutico" es un ingrediente alimentario, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio considerado por proporcionar un beneficio nutricional. Normalmente un nutracéutico comprende un micronutriente como vitaminas, minerales, hierbas o fitoquímicos en un nivel superior al que se encontraría en el producto alimenticio regular correspondiente. Dicho nivel se selecciona normalmente para optimizar el beneficio para la salud pretendido del nutracéutico cuando se toma ya sea como una ración o como parte del régimen de la dieta o en el curso de una terapia nutricional. En el caso de la presente invención el nivel sería un nivel eficaz para reducir los niveles en plasma de los ácidos grasos.

50 Un suplemento dietético es un producto que tiene por objeto suplementar la dieta normal de un sujeto humano y que contiene un ingrediente de dieta como, por ejemplo, vitaminas, minerales, hierbas u otro producto botánico, o un

aminoácido. Un suplemento dietético se presenta normalmente en un formato de dosificación unitaria y está diseñado para su consumo con la comida o antes o después de la comida, pero no en lugar de la comida. Un suplemento dietético, por tanto, se suele presentar en forma de comprimido o cápsula o como un polvo o granulado seco para espolvorearlo sobre la comida o añadirlo al agua o una bebida.

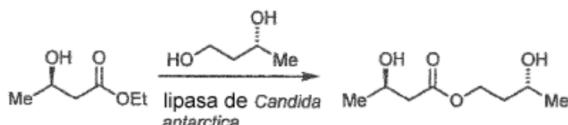
- 5 Un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, puede formularse en un suplemento dietético mezclándolo con un vehículo o excipiente dietética o farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo o excipiente puede ser un disolvente, un medio de dispersión, un revestimiento, un agente isotónico o para retardar la absorción, un edulcorante o similares. Entre ellos se incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos o para retardar la absorción, edulcorantes y similares. Se pueden preparar 10 vehículos adecuados a partir de una amplia gama de materiales incluyendo, pero sin limitarse a ellos, diluyentes, aglutinantes y adhesivos, lubricantes, disgragantes, agentes colorantes, agentes de volumen, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes y materiales diversos como tampones y adsorbentes que puedan necesitarse para preparar una forma de dosificación en particular. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas son muy conocidas en la técnica.
- 15 Por ejemplo, las formas sólidas orales pueden contener en combinación con el compuesto activo, diluyentes, como lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes como almidones, gomas arábigas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgragantes como almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; colorantes, edulcorantes, agentes 20 humectantes como lecitina; polisorbatos, lauril sulfatos. Dichas preparaciones se pueden fabricar según el modo habitual, como por ejemplo, por mezclado, granulado, formación de comprimidos, revestimiento con azúcar o procedimientos de revestimiento con película.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes 25 pueden contener un vehículo, como por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. En particular, un jarabe para paciente diabéticos puede contener como vehículos únicamente productos que no metabolicen en glucosa o que solamente metabolicen en una reducida cantidad en glucosa, como por ejemplo sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polialcohol vinílico.

30 Un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, también se formula convenientemente como un granulado o polvos. En dicha forma, se puede dispersar fácilmente en agua u otro líquido, como un té o un refresco, que pueda ser consumido por una persona, por ejemplo una bebida como la antes descrita. Asimismo, se puede encapsular, formar un comprimido o formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma de dosificación unitaria. Las formas de dosificación unitaria pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del extracto para una sola administración diaria, o pueden formularse en cantidades más pequeñas para proporcionar 35 varias dosis al día. La composición puede formularse por tanto, por ejemplo, en comprimidos, cápsulas, jarabes, elixires, formulaciones entéricas o cualquier otra forma de administración oral. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables se incluyen agua, aceite, emulsiones, alcohol y cualquier otro material adecuado.

La invención se describirá adicionalmente en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 1 Síntesis de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo



Se combinan (3R)-hidroxibutirato de etilo (aprox. 3 kg), (R)-1,3-butanodiol (aprox. 1,5 kg), y lipasa B de *Candida antártica* sobre un soporte sólido (aprox. 300 g) en un matraz evaporador rotatorio de 20 litros y se coloca en un evaporador Büchi a gran escala. Se evacúa el sistema a 8-10 torr con rotación a 40-45 °C hasta que se consume el diol (tal como se analiza por espectroscopía ¹H RMN; aprox. 3 días). Se filtra el material en bruto (neto) para separar la enzima y se elimina el exceso de (3R)-hidroxibutirato de etilo por evaporación (hasta una presión y una temperatura finales de 2-3 torr y 80-85 °C). Se hace circular agua en todo el proceso [-5 °C durante la reacción, +5 °C durante la eliminación de (3R)-hidroxibutirato de etilo]. Se añade carbono activo (8 medidas de espátula grande), se continúa el mezclado en el evaporador rotatorio durante 15 minutos y a continuación se filtra la mezcla neta a través de un tapón de Celite®, decantándose el producto (filtrado) directamente en vasos de plástico para su almacenamiento. Se lava el 45 tapón de Celite® con éter (aprox. 500 ml), se separa el disolvente del lavado al vacío y se añade el residuo al volumen para su almacenamiento.

50

Ejemplo 2 Ensayo *in vivo* de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo - dietas con control de calorías

Se alojaron ratas Wistar macho adultas jóvenes (a partir de un peso de 70 g) (Harlan UK Limited) (n = 50) a aproximadamente 20°C en un fotoperíodo de luz: oscuridad inverso 12h: 12h. Se alimentó a las ratas con pienso de

laboratorio convencional (Chow) (SDS, Essex, RU) antes de comenzar las dietas experimentales: (a) normal "occidental" (Occidental) en la que un 34% de las kilocalorías provenía de la adición de palmitato (n = 20), (b) alto contenido en hidratos de carbono (CHO) en la que un 70% de las kilocalorías provenía de la adición de almidón de maíz (n = 10) o (c) dieta de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo (monoéster) en la que un 30% de las kilocalorías provenía de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo (n = 20).

A continuación, se muestran las composiciones de macronutrientes de las tres dietas. Todas las dietas tuvieron el mismo contenido de energía en kCal/g pero diferentes macronutrientes.

Tabla 1

Dieta	Energía (kCal/g)	Grasas	Proteína	Hidratos de carbono (% kCal)	Monoéster
Occidental	1,76	34	27	39	0
Hidratos de carbono	1,76	4	26	70	0
Monoéster	1,76	4	27	39	30

Las dietas y el monoéster fueron fabricados en la Universidad de Oxford. Se proporcionó agua ad libitum. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de ética de experimentación con animales de Oxford y el Ministerio del Interior.

- 15 Se alojaron individualmente las ratas una semana antes del comienzo de los experimentos para que estuvieran acostumbradas a vivir en un entorno solitario cuando se iniciara el estudio. Consumieron pienso de laboratorio convencional ad libitum hasta que se las asignó una dieta experimental. Se alimentó a las ratas con dietas Occidental y de hidratos de carbono con el mismo número de calorías que las que consumieron las ratas alimentadas con monoéster el día anterior.
- 20 Se alimentó a todas las ratas durante 66 días. Transcurrido este período, se determinaron el peso corporal de la rata y los pesos de la grasa de las patas y el corazón. En la Tabla 2 se muestran los resultados.

Tabla 2

Características físicas de la rata	Dieta occidental (n=20)	Dieta de hidratos de carbono (n=10)	Dieta de monoéster (n=20)
Peso corporal final (g)	226 ± 5	213 ± 8	213 ± 5
Peso del corazón (g)	0,69 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,64 ± 0,02
Peso corazón / corporal (g)	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,01
Grasa epididimal (g)	2,49 ± 0,3	1,99 ± 0,2	1,48 ± 0,2*
Peso grasa epididimal / corporal	1,08 ± 0,2	0,93 ± 0,2	0,69 ± 0,1*

*P<0,05

25 Los resultados de la Tabla 2 demuestran que el peso de la grasa de la pata fue significativamente menor transcurridos 66 días de ensayo en las ratas que se habían alimentado con la dieta de monoéster que en las ratas que siguieron una dieta occidental (es decir, alto contenido en grasa) o una dieta de hidratos de carbono. La relación entre la grasa y el peso corporal también fue significativamente menor en las ratas alimentadas con monoéster.

Ejemplo 3 Ensayo *in vivo* de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo - dietas de alimentación de harinas

30 Se repitió el Ejemplo 2 utilizando los mismos alimentos que los indicados en la Tabla 1, pero se alimentó a las ratas con harinas. Las ratas de este ejemplo, por tanto, tuvieron la opción de consumir el alimento de cada harina en la cantidad que quisieran, en lugar de controlarlas calóricamente, como en el Ejemplo 2.

35 Se trazó un gráfico del peso corporal diario (en gramos por rata al día) en relación con el tiempo para las ratas de cada uno de los tres grupos de dieta durante los primeros seis días del ensayo. En la Figura 1 se muestra el gráfico resultante. Se utilizó el análisis de varianza unidireccional con ensayo de comparación múltiple de Tukey-Kramer (n = 8 por grupo, **p<0,001). Se observa un peso corporal significativamente reducido a partir del tercer al sexto día en las ratas alimentadas con dieta de monoéster. El peso corporal de las ratas de este grupo alimentado con dieta de hidratos de carbono permaneció alto a lo largo del procedimiento de alimentación.

Las ratas alimentadas con harina con la dieta de monoéster consumieron menos alimento y perdieron más peso que las ratas de los otros dos grupos de dieta. Se trazó el gráfico del consumo de alimento diario (en gramos por rata al

día) en relación con el tiempo para las ratas de cada uno de los tres grupos de alimentación durante los primeros siete días del ensayo. En la Figura 2, se muestra el gráfico resultante. También en este caso, se utilizó un análisis de varianza unidireccional con ensayo de comparación múltiple de Tukey-Kramer ($n = 8$ por grupo, $***p < 0,001$). Las ratas con la dieta de monoéster presentaron un consumo de alimento diario coherentemente reducido a lo largo del período en comparación con las ratas de las dietas de hidratos de carbono y occidental.

Ejemplo 4 Ensayo *in vivo* de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo - dietas isonitrogenosas e isocalóricas

En un estudio de 28 días, se distribuyeron aleatoriamente ratas Wistar hembra y macho, de pesos de aproximadamente 350 g, en uno de los tres grupos de dieta ($n = 10$ machos y 10 hembras/grupo) y se les administró o bien una dieta de hidratos de carbono (CHOD), o bien una dieta humana normal (NHD) o bien una dieta de cetona (KD).

Las dietas fueron isonitrogenosas e isocalóricas, difiriendo únicamente en las cantidades relativas de hidratos de carbono, grasas y cetonas. En KD, se utilizó cetona como dieta de monoéster de cetona (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo (es decir, el compuesto de fórmula (I)). En KD, aproximadamente 1/3 de la energía se derivó del éster de cetona, mientras que en NHD y CHOD, 1/3 de la energía se derivó de palmitato y almidón, respectivamente. En la Tabla 3 se resumen las composiciones de las dietas experimentales (expresadas en% de calorías).

15

Tabla 3

	Dieta de cetona (KD)	Dieta normal humana (NHD)	Dieta de hidratos de carbono (CHOD)
Hidratos de carbono	38,5	38,6	70,2
Proteína	26,9	27,0	26,2
Grasa	3,7	34,3	3,7
Monoéster de cetona	31	0	0
Total	100	100	100

En la Tabla 4, a continuación, se resumen las composiciones de las dietas experimentales (g/100g).

Tabla 4

	Dieta de cetona	Dieta normal humana (NHD)	Dieta de hidratos de carbono (CHOD)
Pienso para roedores	25,7	25,7	25,7
Gelatina sin azúcar	13,4	13,4	13,4
Agua	49,6	55,1	46,3
Aceite de palma	0	5,8	0
Harina de maíz	0	0	14,5
Monoéster de cetona	11,4	0	0
Total	100	100	100

El día 28 del estudio, las ratas macho del grupo KD pesaban significativamente menos que las ratas macho en los grupos CHOD y NHD (390 ± 26 g frente a 418 ± 15 g y 413 ± 16 g, respectivamente). La cantidad total de peso que ganaron las ratas macho en el grupo KD fue significativamente menor que la cantidad total de peso que ganaron los grupos CHOD y NHD. El consumo de alimento fue significativamente menor en los machos alimentados con KD en comparación con los machos alimentados con las dietas CHOD y NHD (consumo de alimento durante los días 22 a 29: 239 ± 17 g frente a 269 ± 7 g y 269 ± 7 g, respectivamente). El consumo medio de monoéster de cetona en los machos fue aproximadamente 11 g/kg cuerpo/peso/día.

20

En los días 15, 22 y 28 del estudio, las ratas hembra del grupo KD pesaron significativamente menos que las ratas hembra en los grupos CHOD y NHD (el día 28: 240 ± 13 g frente a 253 ± 12 g y 258 ± 13 g, respectivamente). La cantidad total de peso que ganaron las ratas hembra en el grupo KD fue significativamente menor que la cantidad total de peso que ganaron las ratas de los grupos CHOD y NHD. El consumo de alimento fue significativamente menor en las ratas que se alimentaron con KD en comparación con las hembras alimentadas con las dietas CHOD y NHD (consumo de alimento durante los días 22 a 29: 175 ± 12 g frente a 191 ± 5 g y 194 ± 7 g, respectivamente). El consumo medio de monoéster de cetona en las hembras fue aproximadamente 13,0 g/kg cuerpo/peso/día.

25

Ejemplo 5 Efecto de (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo en los niveles de neuropéptido, los niveles de intermediarios del ciclo de Krebs y CoA y los niveles de nucleótidos libres en el cerebro

30

El día 14 del estudio, se distribuyeron aleatoriamente ratas Wistar que pesaban aproximadamente 250 g en uno de los tres grupos de dieta ($n = 6$ ratas/grupo) y se les administró o bien una dieta de hidratos de carbono ("almidón"), o bien una dieta humana normal ("grasa") o bien una dieta de éster de cetona, en la que el éster de cetona utilizado fue monoéster de cetona (3R)-hidroxibutirato de (3R)-hidroxibutilo (es decir el compuesto de fórmula (I)). Estas tres dietas fueron consumidas en un par de comidas durante 3 horas al día. La composición de las dietas expresada en g/100g se resume en la Tabla 5 y en la Tabla 6 se resumen las composiciones expresadas en%.

Tabla 5

Componente	Almidón	Grasa	Éster de cetona
Pienso	25,7	25,7	25,7
Gelatina sin azúcar	13,4	13,4	13,4
Agua	46,3	55,1	49,6
Aceite de palma	0	5,8	0
Almidón de maíz	14,5	0	0
Éster de cetona	0	0	11,4
Total	100	100	100

Tabla 6

Componente	Almidón	Grasa	Éster de cetona
Hidratos de carbono	70,2	38,6	38,5
Proteína	26,2	27	26,9
Grasa	3,7	34,3	3,7
Éster de cetona	0	0	31
Total	100	100	100

5 Se observó que las ratas que siguieron una dieta de éster de cetona consumieron menos alimento y ganaron menos peso que las que siguieron dietas suplementadas con almidón (hidratos de carbono) o grasa. El resultado se correspondió con los resultados de los Ejemplos 2 a 4.

Después de consumir las 3 dietas en un par de comidas durante 3 horas al día durante 14 días, se midieron los niveles de varios intermediarios del ciclo de Krebs y CoA en el cerebro enzimáticamente y por espectrometría de masas utilizando técnicas normales. En la Tabla 7 se muestran los resultados.

10 Tal como se puede observar en la Tabla 7, se descubrió que las ratas alimentadas con éster de cetona tenían niveles más altos de malonil CoA en el cerebro (en negrita en la tabla). Malonil CoA es un metabolito conocido por estar asociado con un menor consumo de comida; se sabe que disminuye el apetito (Wolfgang, M. J. and Lane, M. D. (2006) J. Biol. Chem. 281, 37265-37269). Estos datos se corresponden con el uso de una dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) para disminuir el apetito. Los valores de la Tabla 7 son medias, en μ moles/g de peso húmedo, \pm SEM con $n = 6$ a 8. CoA se da en nmoles/g de peso en húmedo.

15 Tabla 7: Intermediarios de ciclo de Krebs y CoA en el cerebro

	Almidón	Grasa	Éster de cetona
Citrato	$0,199 \pm 0,006$	$0,205 \pm 0,005$	$0,222 \pm 0,010$
Isocitrato	$0,0080 \pm 0,0006$	$0,0086 \pm 0,0004$	$0,0093 \pm 0,008$
α -cetoglutarato	$0,128 \pm 0,007$	$0,138 \pm 0,008$	$0,140 \pm 0,008$
Succinilo CoA (μ M)	$0,831 \pm 0,075$	$0,777 \pm 0,158$	$0,910 \pm 0,207$
Succinato	$0,0800 \pm 0,0022$	$0,0822 \pm 0,0034$	$0,0864 \pm 0,0033$
Fumarato	$0,0728 \pm 0,0042$	$0,0801 \pm 0,0055$	$0,0745 \pm 0,0058$
L-Malato	$0,179 \pm 0,011$	$0,192 \pm 0,012$	$0,181 \pm 0,013$
Oxaloacetato calc.	$0,0026 \pm 0,0003$	$0,0021 \pm 0,0001$	$0,0026 \pm 0,0004$
Acetil CoA (μ M)	$7,87 \pm 1,32$	$8,20 \pm 1,02$	$6,43 \pm 0,53$
Malonil CoA (μ M)	$0,954 \pm 0,061$	$1,02 \pm 0,14$	$1,26 \pm 0,13$

^ap < 0,05 entre cetona de éster y almidón

20 Después de alimentar a las ratas con las dietas durante 14 días, se determinaron las relaciones del nucleótido libre y las concentraciones de nucleótido libre. Se realizaron las mediciones en el cerebro congelado y se calcularon las relaciones de metabolito de las ratas tal como se ha descrito anteriormente (Veech, R. L. y col., J. Biol. Chem. 254: 6538-47, 1979). En la tabla 8 se muestran los resultados. Los valores de la Tabla 8 se dan como la media \pm SEM ($n = 6$ a 8). Se asumió que el pH citosólico era 7,2.

Tabla 8: Relaciones de nucleótido libre calculadas y concentraciones de nucleótido libre calculadas

	Almidón	Grasa	Éster de cetona
[NAD ⁺]/[NADH] citosol libre de Lactato/Piruvato	319 ± 23	$256 \pm 29^{a,b}$	357 ± 27
[NAD ⁺]/[NADH] mitocondria libre de α KGxNH ₄ ⁺ /Glut	$0,62 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,17$
[NAD ⁺]/[NADPH] citosol libre de α KGxCO ₂ /IsoCit	$0,028 \pm 0,002$	$0,028 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,003$

EhCoQ/CoQH ₂ mV de Fum/Succ	29,6 ±0,5	30,5 ±0,8	28,9 ±0,6
[Mg ²⁺] libre mM de [Cit]/[Isocit]	1,5 ±0,26	1,5 ±0,11	1,5 ±0,13
Posible fosforilación desde Kg+g (Eqn 1) M ⁻¹	27,100 ± 4,020	26,800 ± 2,700	38,100 ± 3,390 ^{a,b}
ΔG' ATP kJ/mol	-58,6 ± 0,4	-58,6 ± 0,2	-59,6 ± 0,2 ^{a,b}
[ADP] citosol libre mM/g de PCr/Cr	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,001
[AMP] citosol libre mM/g de K _{miocinasa}	0,0004 ± 0,00003	0,0004 ± 0,00003	0,0004 ± 0,00003

^ap < 0,05 entre éster de cetona y almidón, ^bp < 0,05 entre éster de cetona y grasa, ambos examinados según el ensayo U de Mann-Whitney.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que, tras 14 días de dieta, la posible fosforilación del cerebro y el AG de hidrólisis de ATP fueron significativamente más altas en las ratas alimentadas con éster de cetona que en las ratas alimentadas con las dietas de hidratos de carbono y grasas. El único cambio en el cerebro de las ratas alimentadas con cetona fue una mayor energía: fosforilación y Ag. Este aumento de la energía se corresponde con los efectos de cetonas en el corazón de ratas en funcionamiento por perfusión (Sato, K., Kashiwaya, Y., Keon, C. A., Tsuchiya, N., King, M. T., Radda, G. K., Chance, B., Clarke, K., y Veech, R. L. (1995) FASEB J. 9, 651-658). Sin embargo, los grandes cambios redox que se observan en el corazón con la perfusión de cetona no fueron observados.

Estos datos se corresponden con el uso de una dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) para aumentar la eficiencia metabólica del cerebro y promover así una mejor función cognitiva, tratar o reducir los efectos de enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y corea de Huntington o, por ejemplo, proteger el cerebro y el sistema nervioso central contra la neurodegeneración como consecuencia del envejecimiento, trauma, anoxia y similares.

15 *Efectos del compuesto de cetona de fórmula (I) en la señalización de neuropéptido en el cerebro*

Después de 14 días de alimentación con una dieta de grasas, hidratos de carbono o éster de cetona, se examinaron los niveles de diversos neuropéptidos reconocidos por estar asociados con una disminución del consumo de alimento y una disminución del apetito (péptidos "anorexigénicos") en el área del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y en el hipocampo del cerebro de rata. Se midieron los niveles de neuropéptido utilizando técnicas de anticuerpo convencionales aplicadas sobre cerebros seccionados de las ratas. En las micrografías de las Figuras 3 a 9 se muestran los resultados.

Los péptidos medidos fueron Factor neurotrópico derivado del cerebro (FNCD), receptor 4 de hormona estimulada por melanocito (MC4R) y transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART). Además de ser anorexigénicos, estos péptidos tienen otras acciones importantes, según lo cual:

- FNDC disminuye el apetito y también se conoce por prevenir la apoptosis en los ganglios basales y otras áreas de interés de modo que se prevé que el aumento de FNDC inhiba la neurodegeneración, además de disminuir el apetito;
- CART es conocido por promover la alerta y disminuir el apetito, de manera similar a la cafeína o modafinilo (un fármaco estimulante para estimular el ánimo y potenciar la memoria), de modo que se prevé que el aumento de los niveles de CART mejoren la función cognitiva además de disminuir el apetito;
- MC4R facilita la descomposición de péptidos grandes en diversas hormonas entre las que se incluyen la hormona de estimulación de melanocito que a su vez regula el apetito. Las mutaciones de MC4R son conocidas por causar obesidad.

Por lo tanto, estos péptidos son de vital importancia en muchos de los aspectos terapéuticos importantes de la alimentación con éster de cetona además de suprimir el apetito. Sobre todo en a) promover la alerta y mejorar la función cognitiva y b) inhibir la neurodegeneración por diversas causas, como el envejecimiento, trauma, anoxia y similares.

Los resultados de la Figura 3 muestran significativamente más cuerpos celulares FNDC positivos en el NPV de Ratas tratadas con dieta de cetona en comparación con las ratas con una dieta de grasas e hidratos de carbono. Se observó algo similar en el hipocampo de las ratas tratadas con cetonas. Tal como se sabe, el NPV es una parte del cerebro que controla el apetito, mientras que el hipocampo es importante para la memoria. Por lo tanto, los resultados corroboran que una dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) puede utilizarse para disminuir el apetito, inhibir la neurodegeneración y promover la función cognitiva.

Las micrografías de las Figuras 4 y 5 presentan una densidad significativamente mayor de cuerpos celulares MC4R positivos en las regiones magnocelular posterior (pm) y parvocelular medial (mpd) del NPV en ratas tratadas con la

cetona o la dieta de hidratos de carbono (Cho), en comparación con las ratas tratadas con la dieta de grasas. Esto corrobora que la dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) se puede utilizar para disminuir el apetito y promover la pérdida de peso.

- 5 Las Figuras 6, 8 y 9 presentan los niveles de CART en el área del núcleo paraventricular posterior (NPV) del hipocampo de ratas tratadas durante 14 días con la dieta de grasas, la dieta de hidratos de carbono o la dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I). La Figura 7 muestra los niveles de CART en las áreas del núcleo ventromedial (VMH), el núcleo arqueado (ARC) y la eminencia media (ME) del hipotálamo. Se observa un número significativamente mayor de cuerpos celulares CART positivos en los NPV de ratas tratadas con las dietas de cetona e hidratos de carbono que en las ratas tratadas con la dieta de grasas. El nivel máximo de CART se observa en el NPV de ratas tratadas con la dieta de cetona. Asimismo, las ratas tratadas con la dieta de cetona contiene el número máximo de cuerpos celulares CART positivos en las áreas del núcleo ventromedial (VMH), el núcleo arqueado (ARC) y la eminencia media (ME) del hipocampo. Estos resultados corroboran también que una dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) puede utilizarse para disminuir el apetito, inhibir la neurodegeneración y promover la mejora de la función cognitiva. En suma, las micrografías de las Figuras 3 a 9 muestran como la dieta de cetona produce
- 10 - más FNDC en el núcleo paraventricular y en el hipocampo (Figura 3) ;
- 15 - más CART en el núcleo paraventricular (Figuras 6 a 9) ; y
- más actividad MC4R en el núcleo paraventricular (Figuras 4 y 5).

20 Estos datos se corresponden con el uso de una dieta que comprende el compuesto de cetona de fórmula (I) para disminuir el apetito, inhibir la neurodegeneración y promover la mejora de la función cognitiva.

Ejemplo 6 Composición de comprimido

Se fabricaron comprimidos con un peso de 0,15 g cada uno y que contenían 25 mg del compuesto de fórmula (I) del siguiente modo:

Composición para 10.000 comprimidos

- 25 Compuesto de fórmula (I) (250 g)
- Lactosa (800 g)
- Almidón de maíz (415g)
- Polvo de talco (30 g)
- Esterato de magnesio (5 g)
- 30 Se mezclaron el compuesto de fórmula (I), lactosa y la mitad del almidón de maíz. A continuación, se hizo pasar la mezcla a través de un tamiz de 0,5 mm de tamaño de malla. Se suspendió el almidón de maíz (10 g) en agua templada (90 ml). Se utilizó la pasta resultante para granular el polvo. Se secó el granulado y se rompió en pequeños fragmentos sobre un tamiz de 1,4 mm de tamaño de malla. Se añadió la cantidad restante de almidón, talco y magnesio, se mezcló cuidadosamente y se procesó en comprimidos.

Ejemplo 7 Formulación de jarabe

Compuesto de la invención 250 mg

Solución de sorbitol 1,50 g

Glicerol 2,00 g

Benzoato sódico 0,005 g

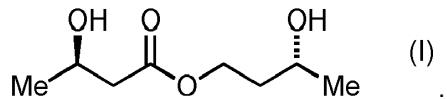
40 Aroma 0,0125 ml

Agua purificada en cantidad suficiente para 5,00 ml

Se disolvió el compuesto de fórmula (I) en una mezcla de glicerol y la mayor parte del agua purificada. A continuación, se añadió una solución acuosa del benzoato sódico a la solución, seguido de la adición de la solución de sorbitol y, finalmente, el aroma. Se obtuvo el volumen con agua purificada y se mezcló a fondo.

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de un compuesto en un sujeto sano para mejorar el rendimiento físico, en donde el compuesto es 3-hidroxibutirato de 3-hidroxibutilo enriquecido enantioméricamente con respecto a (3*R*)-hidroxibutirato de (3*R*)-hidroxibutilo de fórmula (I):



2. Uso no terapéutico de una composición que se puede ingerir que comprende un compuesto tal como se define en la reivindicación 1 y un vehículo dietética o farmacéuticamente aceptable para mejorar el rendimiento físico en un sujeto sano.

10 3. Uso no terapéutico según la reivindicación 2 de una composición en la que la composición es un producto alimenticio, un producto para beber, una bebida, un suplemento alimenticio, un suplemento dietético, un alimento funcional o un nutracéutico.

4. Uso no terapéutico según la reivindicación 1 de un compuesto para promover la alerta o mejorar la función cognitiva en un sujeto sano.

15 5. Uso no terapéutico según la reivindicación 1 de un compuesto, en donde el compuesto está enriquecido enantioméricamente hasta al menos el 90% con respecto a (3*R*)-hidroxibutirato de (3*R*)-hidroxibutilo.

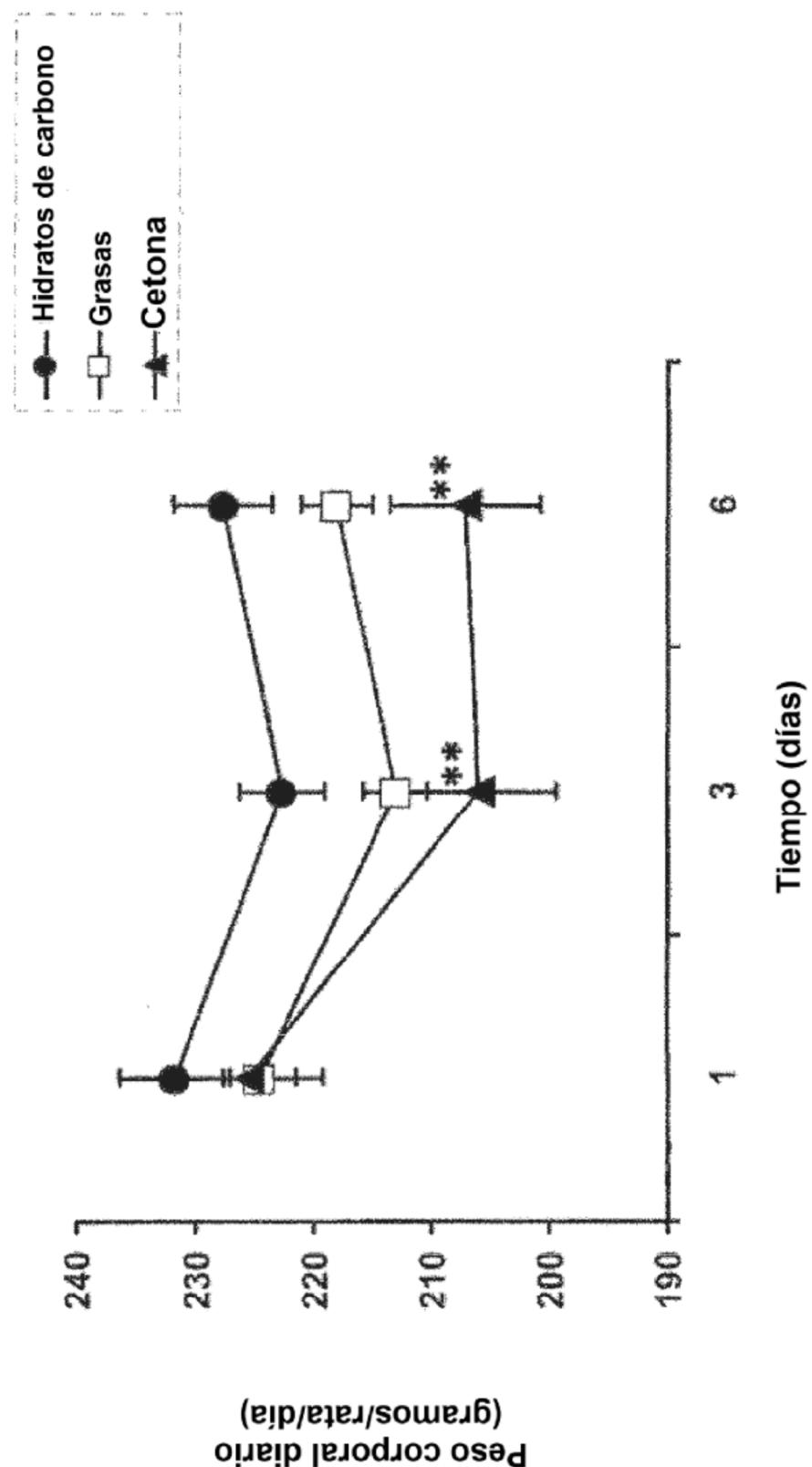


Fig. 1

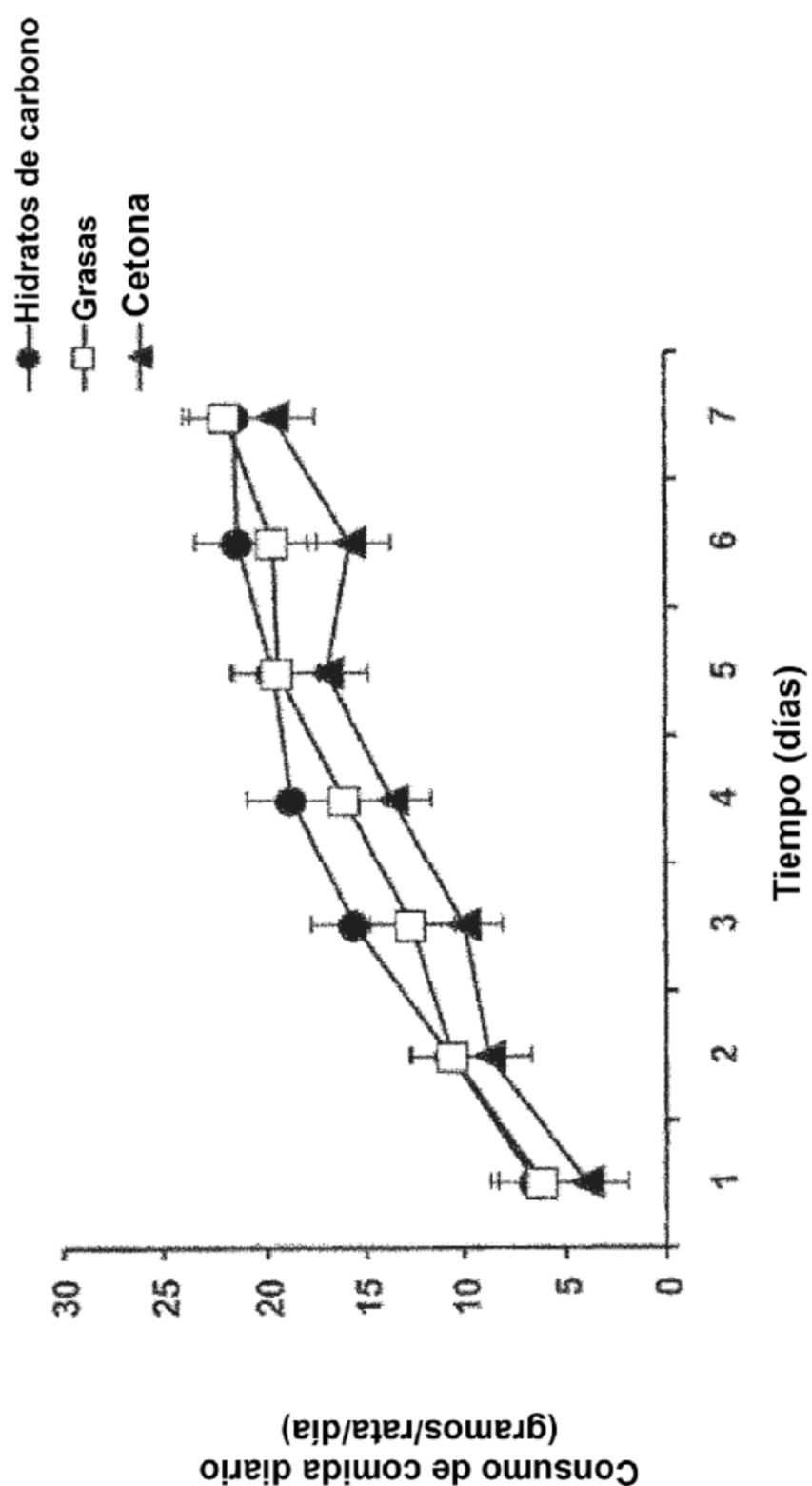


Fig. 2

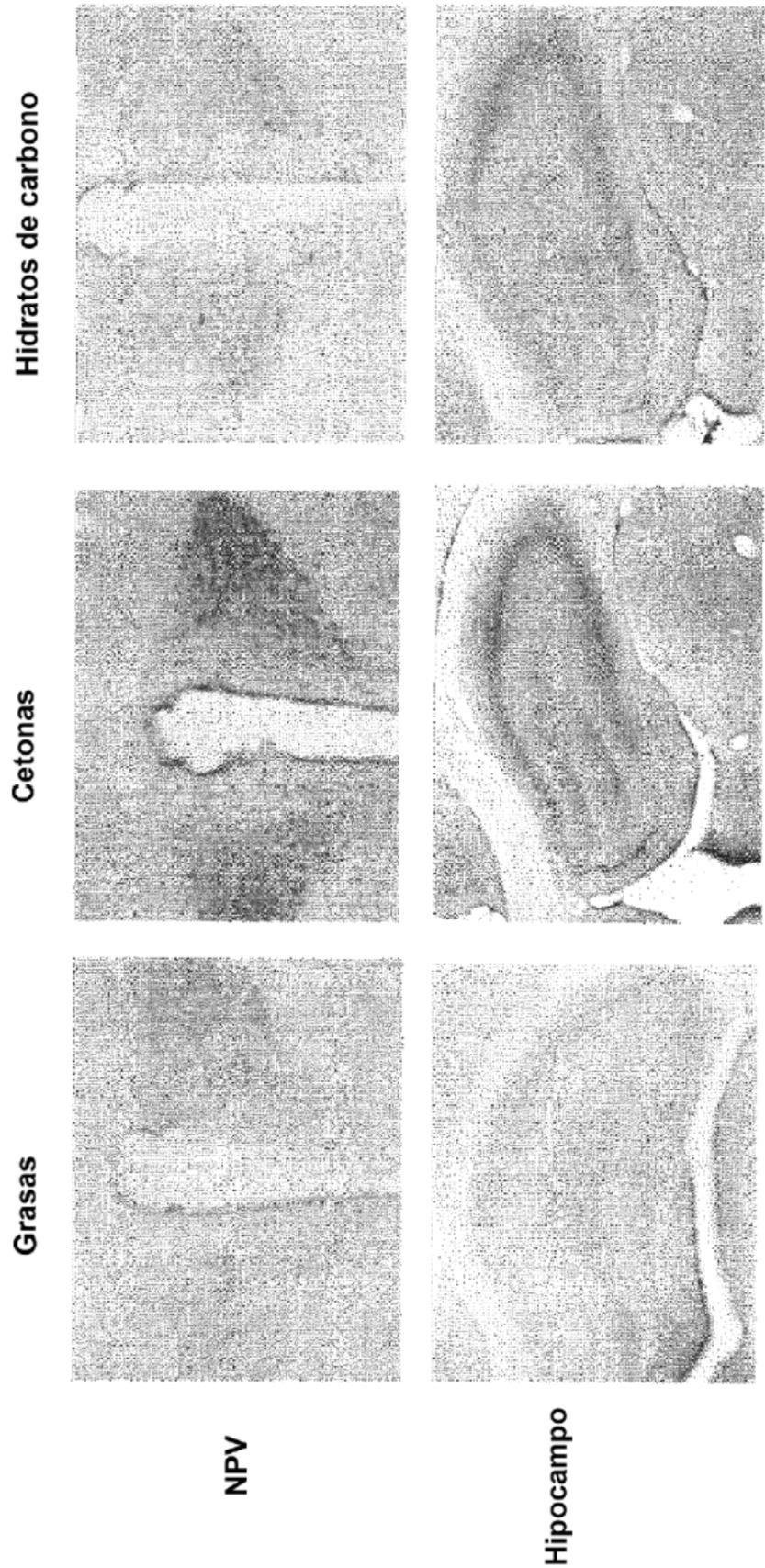


Fig. 3

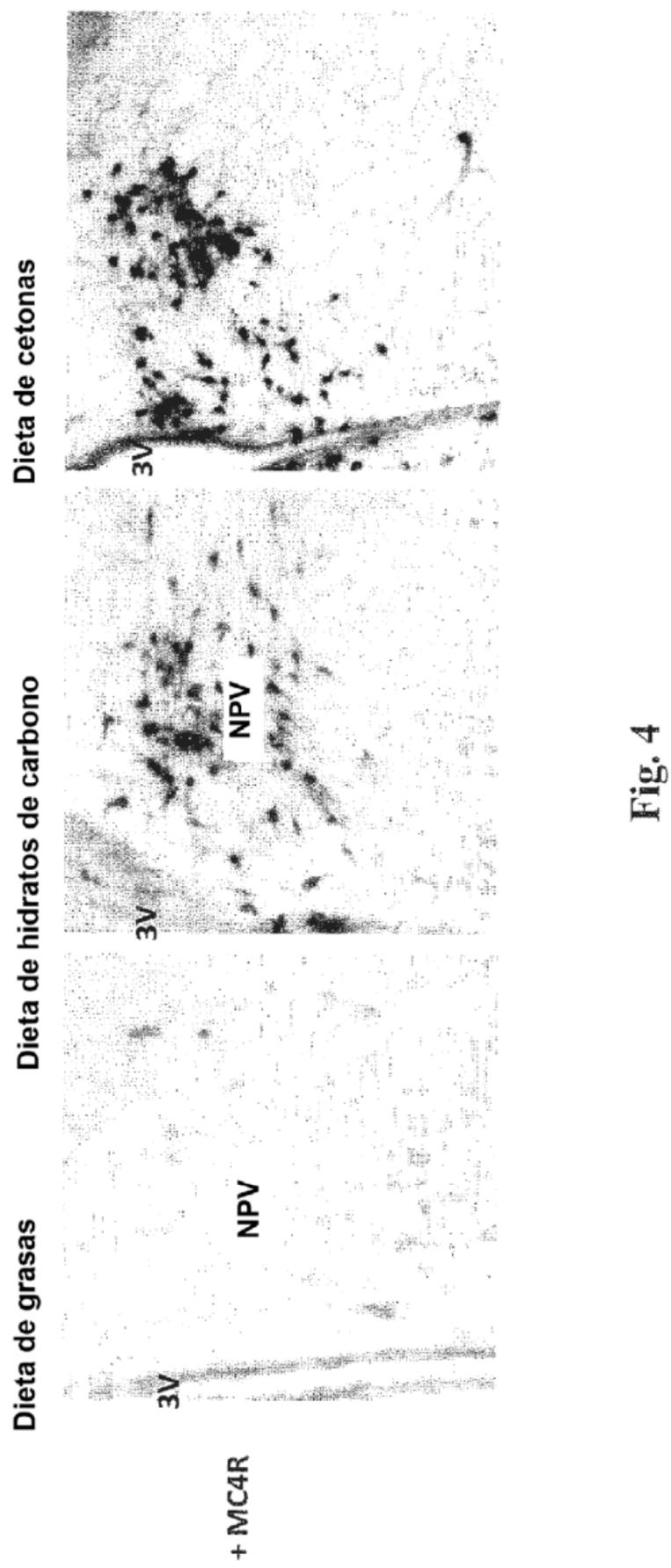


Fig. 4

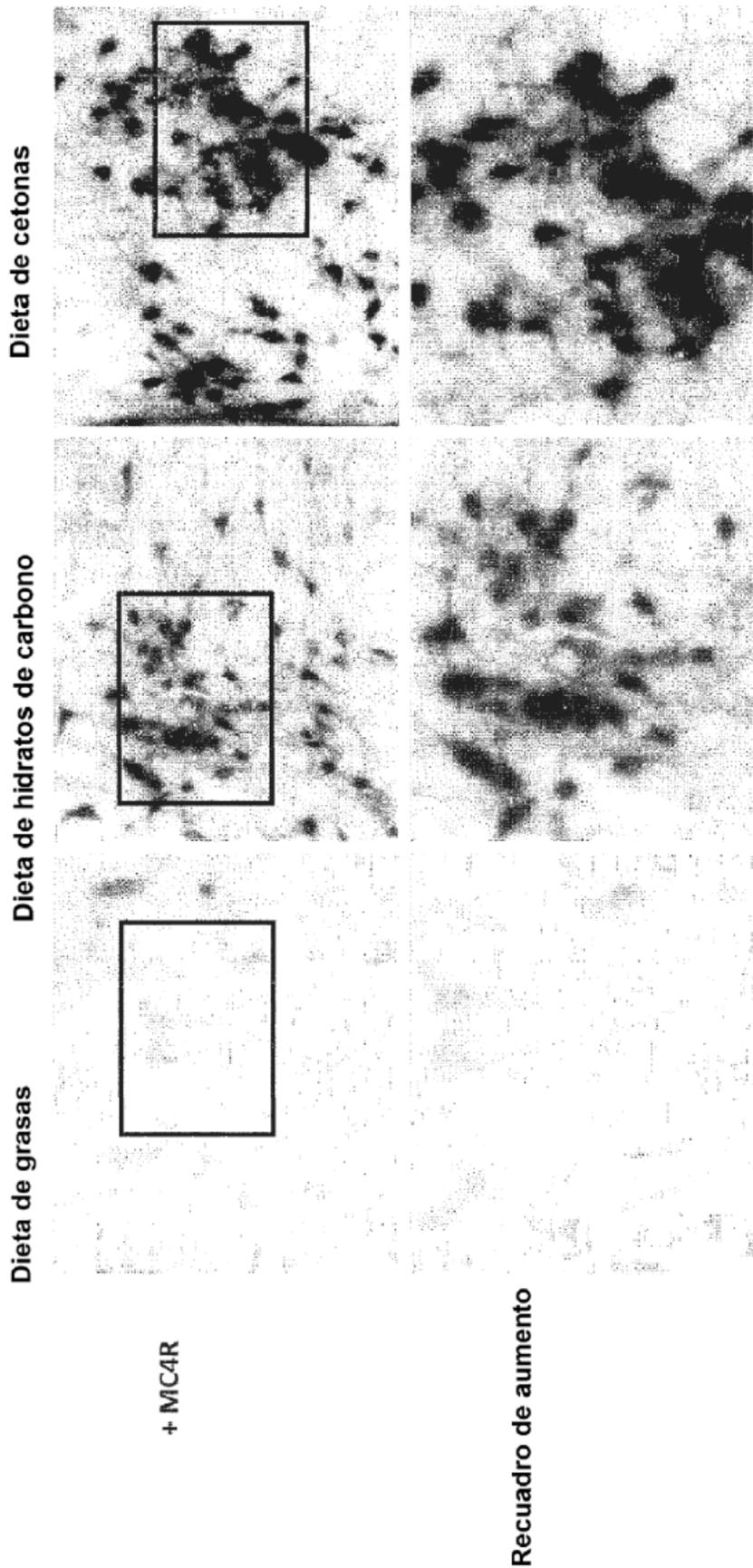
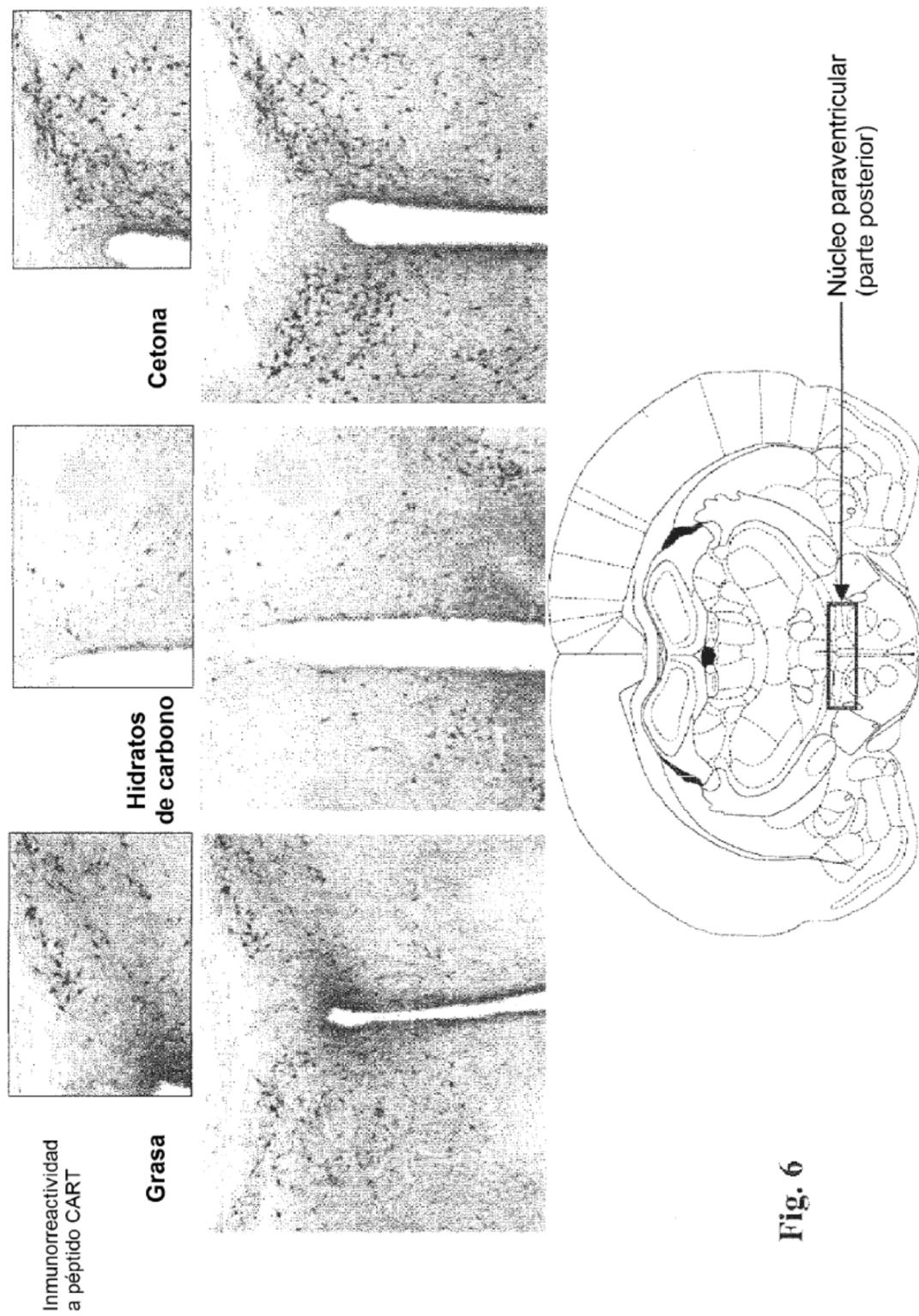
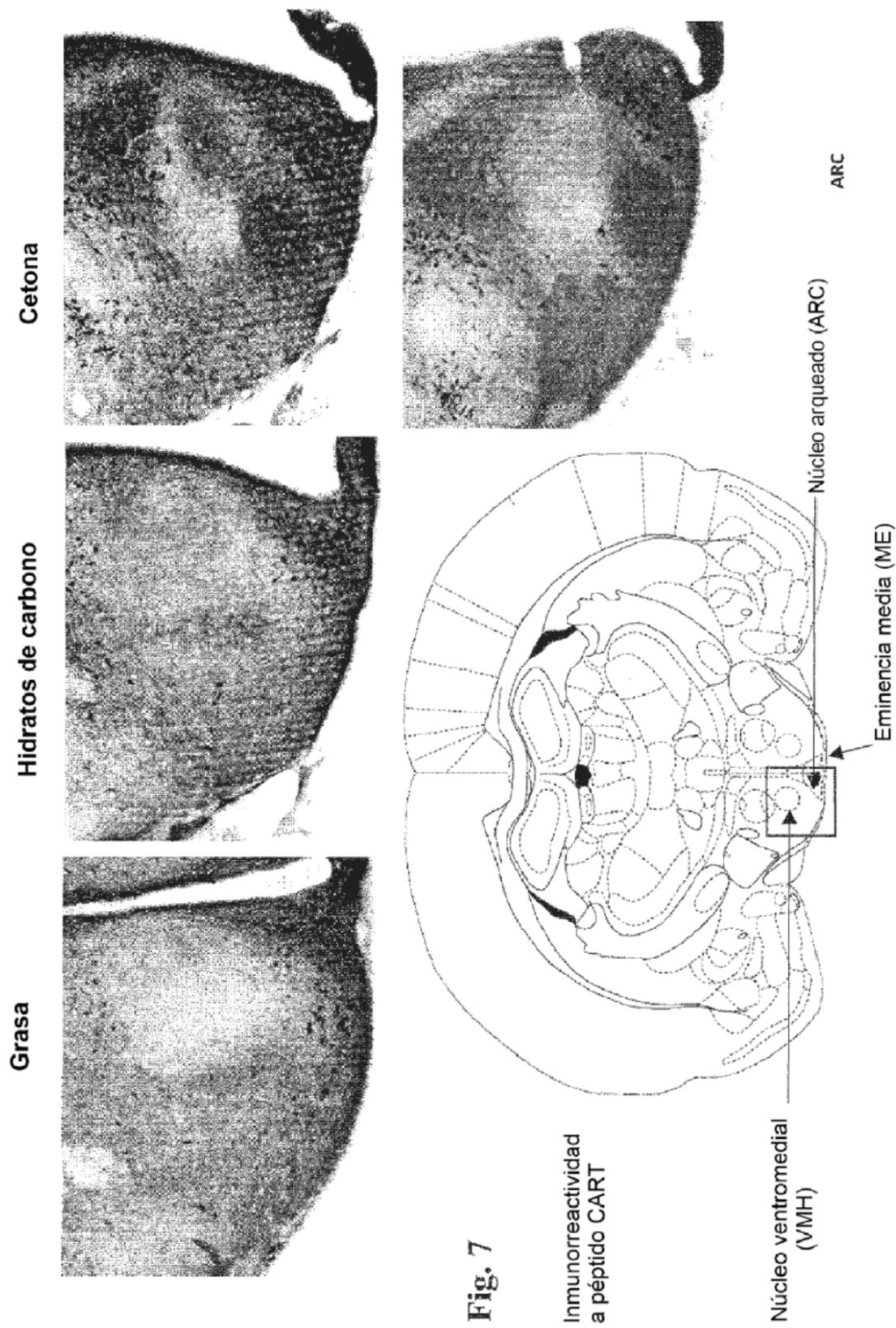


Fig. 5





Immunorreactividad a péptido CART

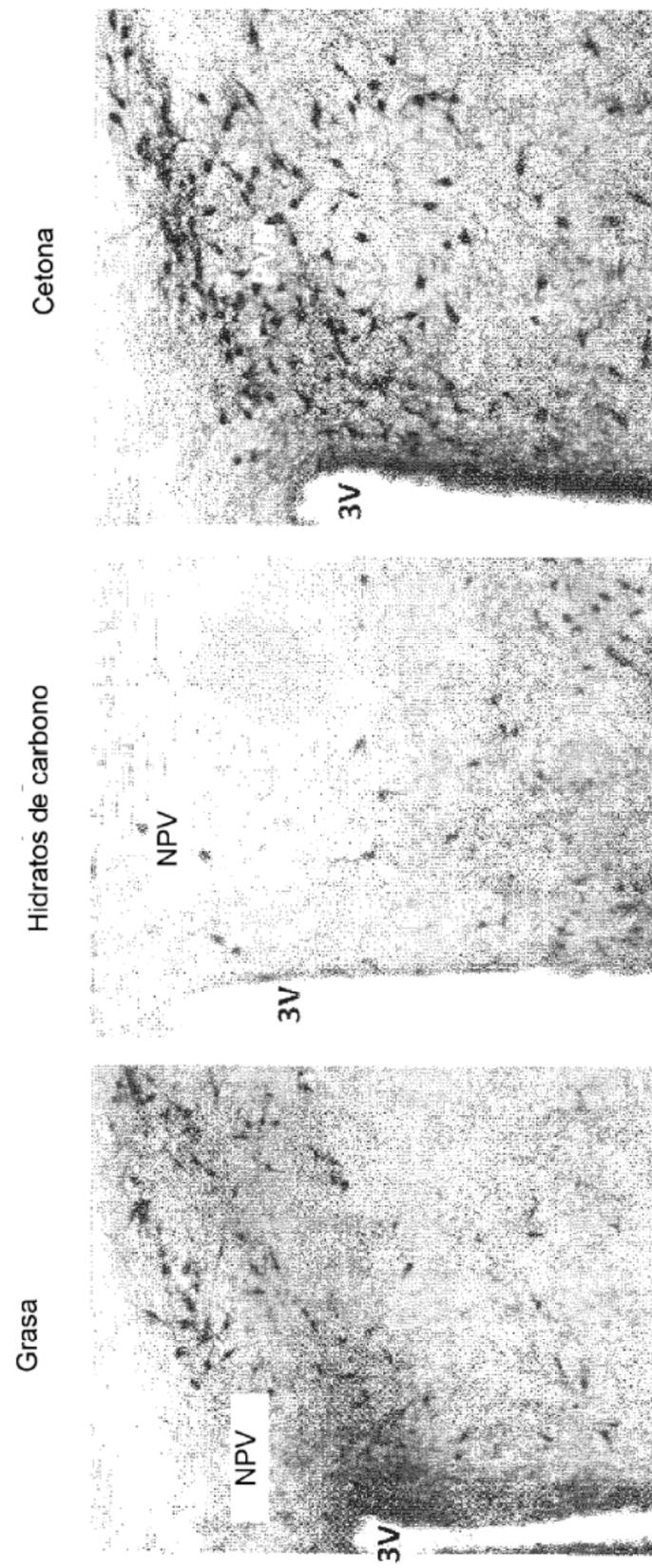


Fig. 8

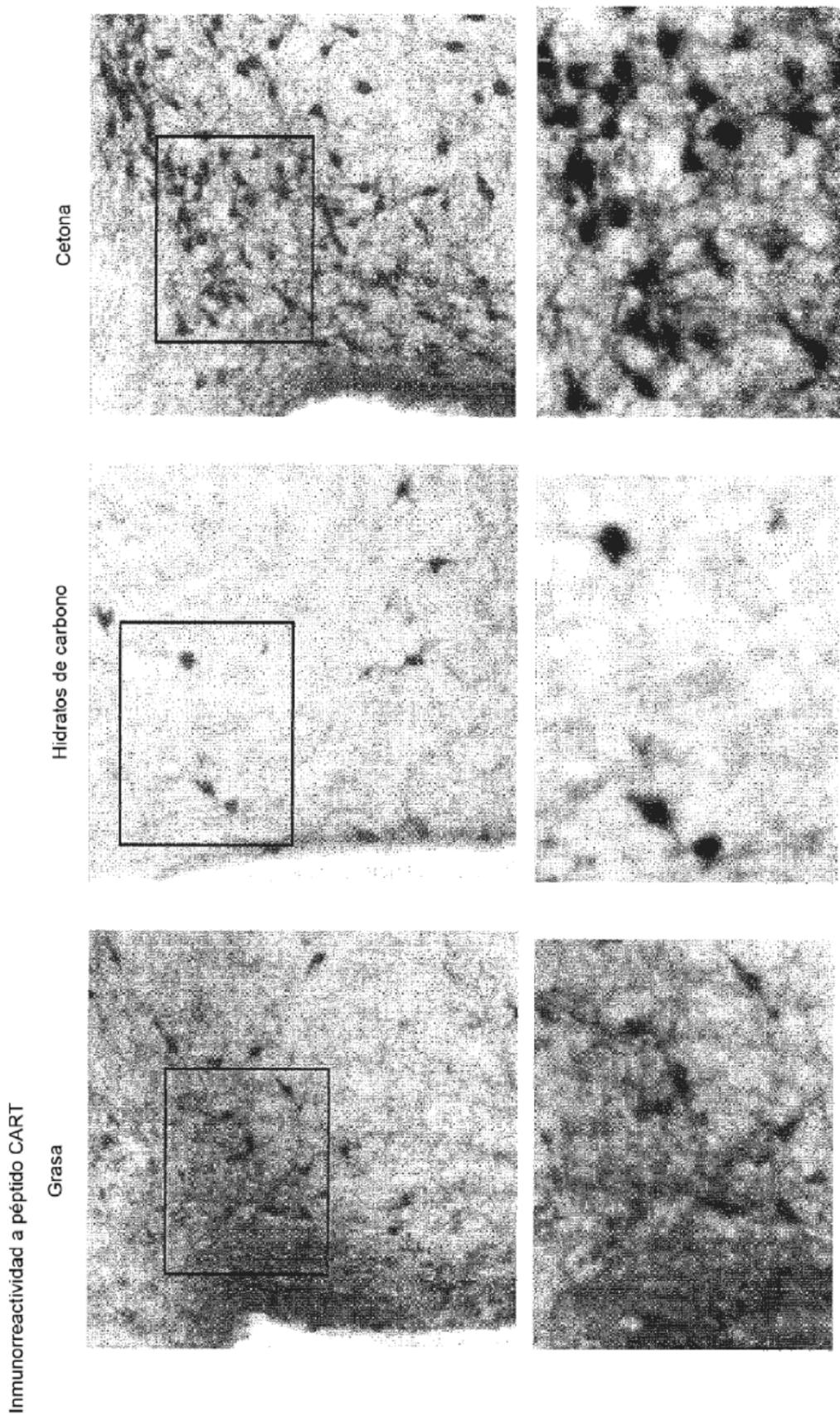


Fig. 9