



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 186 576**

② Número de solicitud: 200102269

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 31/20

A61P 35/00

A61P 9/10

A61P 9/12

A61P 3/04

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **11.10.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2003

⑦ Solicitante/s:
UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
Campus Universitario
Cr. Valldemossa, km. 7,5, Edif. Son Lledó
07071 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES

⑦ Inventor/es: **Escribá Ruiz, Pablo Vicente**

⑦ Agente: **Díez de Rivera de Elizaburu, Alfonso**

⑤ Título: **Ácido 2-hidroxioléico para utilizar como medicamento.**

⑤ Resumen:

Ácido 2-hidroxioléico para utilizar como medicamento.

La invención se refiere al ácido 2-hidroxioléico como agente antitumoral, como agente con actividad hipotensora y como agente que permite inducir una reducción del peso corporal. El ácido 2-hidroxioléico tiene aplicación como agente regulador de la actividad de proteínas G, así como de las entidades moleculares de su vía de transducción.

También se refiere a la utilización del ácido 2-hidroxioléico para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento del cáncer, de enfermedades cardiovasculares y de sujetos con obesidad.

ES 2 186 576 A1

DESCRIPCION

Ácido 2-hidroxioléico para utilizar como medicamento.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la aplicación del ácido 2-hidroxioléico (o α -hidroxioléico) como agente antitumoral, como agente con actividad hipotensora y como agente que permite inducir una reducción del peso corporal.

La presente invención también se refiere a la utilización del ácido 2-hidroxioléico para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades cardiovasculares y un medicamento destinado al tratamiento de sujetos con problemas de exceso de peso u obesidad.

Antecedentes de la invención

Los ácidos grasos son moléculas de amplia utilización, tanto en alimentación como en industria. El ácido 2-hidroxioléico, cuya síntesis ha sido descrita con anterioridad (Adam et al., 1998, Eur. J. Org. Chem. 9, 2013-2018), ha sido utilizado de forma industrial como emulsionante para preparaciones de productos cosméticos.

Así, por ejemplo, por un lado, la patente JP 10182338 se refiere a una composición emulsionante de aceite en agua que muestra baja irritabilidad y elevada compatibilidad con sales, que contiene: (A) tensioactivos no iónicos tales como monolaurato de polioxietileno sorbitol, monooleato de polioxietileno sorbitol y monoestearato de polioxietileno sorbitol, (B) ácidos grasos 2-hidroxi C10-C22 tales como el ácido 2-hidroxiestearico, (C) aceites y (D) agua, en donde la relación A/B está comprendida entre 1:0,01 y 1:2.

También la patente JP 09110635 se refiere a composiciones, útiles como productos farmacéuticos, cosméticos y productos alimentarios que contiene: (A) ésteres de ácido graso poliglicerilo, (B) ácidos grasos 2-hidroxi C10-C22, (C) aceites y (D) agua, donde la relación en peso de A/C y B/C es de 2,0 y 0,5 respectivamente, y muestra tamaños de partícula medio comprendidos entre 10 y 300 nm. Estas composiciones muestran buena estabilidad incluso en condiciones ácidas o de baja viscosidad o en presencia de elevadas cantidades de sales, siendo por tanto compatibles con la piel.

Por otro lado, este ácido graso, también ha sido empleado como inhibidor de la oleamida hidrolasa, acción que se asocia al efecto de inducción del sueño de esta sustancia (Patentes US 6096784 y WO 9749667).

Así, por ejemplo, la patente US 6096784 se refiere al diseño y síntesis de inhibidores de oleamida hidrolasa, responsables de la hidrólisis de un lípido (cis-9-octadecenamida) inductor del sueño. Los inhibidores más potentes poseen un grupo carbonilo electrofílico capaz de formar de manera reversible un (tio)hemiacetal o un (tio)hemicetal para imitar el estado de transición de una reacción catalizada por una proteasa de tipo cisteína o serina. Además de la actividad inhibitoria, algunos de los inhibidores mostraron actividad agonista lo cual induce el sueño en animales de laboratorio.

A la vista de los antecedentes citados, no existe todavía en el estado de la técnica otras aplicaciones relacionadas con el ácido 2-hidroxioléico de

especial interés en el campo terapéutico.

Objeto de la invención

La presente invención tiene por objeto encontrar nuevas aplicaciones del ácido 2-hidroxioléico no relacionadas con las descritas en el estado de la técnica.

Un primer objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente antitumoral.

Un segundo objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente con actividad hipotensora.

Un tercer objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente que induce reducción del peso corporal.

En especial, es objeto de la presente invención demostrar que el ácido 2-hidroxioléico tiene aplicación como agente regulador de la actividad de proteínas G, así como de las entidades moleculares de su vía de transducción, es decir de su ruta de propagación de señales.

Las aplicaciones que se describen a continuación para el ácido 2-hidroxioléico no han sido citadas por nadie previamente y su uso puede resultar beneficioso para el tratamiento de ciertas patologías. En particular, se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioléico presenta actividad antitumoral, actividad hipotensora (o antihipertensora) e induce reducciones del peso corporal.

En la presente invención se justifican las nuevas aplicaciones del ácido 2-hidroxioléico utilizando modelos experimentales, en particular sistemas de análisis *in vitro*, sistemas de cultivos celulares y organismos vivos. Todos estos modelos de análisis indican, sin lugar a dudas, que el ácido 2-hidroxioléico es una molécula que puede utilizarse para fabricar medicamentos destinados al tratamiento del cáncer, destinados al tratamiento de enfermedades cardiovasculares y destinados al tratamiento de sujetos con problemas de exceso de peso u obesidad, principalmente debido a su efecto como agente regulador de señales asociadas a proteínas G.

Descripción de la invención

En la presente invención por "ácido 2-hidroxioléico" se entiende ácido α -hidroxioléico, ácido octadecenoico C18:1 *cis* Δ 9 o ácido cis-2-Hidroxi-9-octadecenoico.

En la presente invención por "Proteínas G" se entiende proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, formadas por tres subunidades (una alfa, una beta y una gamma) que transmiten señales de receptores acoplados a proteínas G hacia efectores (adenilil ciclasa, guanilil ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos, etc.).

En la presente invención por "efecto agudo" se entiende el efecto que se produce en un plazo de tiempo comprendido entre minutos y algunas horas después de la administración de un fármaco.

En la presente invención por "efecto crónico" se entiende el efecto que se produce en un plazo de tiempo comprendido entre unos pocos días y varias semanas después de la administración de un fármaco.

• Un primer objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente antitumoral.

En primer lugar, el ciclo celular se encuentra regulado por factores de crecimiento que se unen a receptores específicos de la superficie celular. La unión de dichos factores de crecimiento con los receptores da lugar a una cascada de reacciones destinadas a activar quinasas mitogénicas que migran al núcleo y fosforilan proteínas. Dichas proteínas controlan la expresión de determinados genes que codifican para ciclinas (proteínas involucradas en la división celular) desencadenándose la mitosis.

Los receptores específicos de la superficie celular están acoplados a proteínas G, de manera que cuando se da la interacción del factor de crecimiento con el receptor se activa la proteína G desencadenándose la cascada de reacciones anteriormente mencionada.

Por tanto, una modulación de la localización y actividad de proteínas G permitiría controlar la división y crecimiento celular.

El mecanismo asociado al efecto antitumoral del ácido 2-hidroxioléico se basa en el hecho que el ácido 2-hidroxioléico induce la modulación de la localización y actividad de proteínas G.

Se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioléico actúa como inhibidor de la traslocación de proteínas G al núcleo (véase figura 1). De esta manera se consigue la inhibición de la proliferación celular, lo que queda confirmado por el aumento significativo de los niveles de las proteínas p21 y p53 (aumentos superiores al 300% en estas proteínas antiproliferativas). Dicho efecto da lugar a la muerte celular programada de las células tumorales.

Dicha alteración en la localización celular de proteínas G induce alteraciones en su función, superiores a las producidas por el fármaco daunomicina, de amplia utilización en el tratamiento del cáncer, tal y como puede observarse en el ensayo comparativo mostrado en la figura 2. Estas alteraciones activan las vías de muerte celular fisiológica o "programada" (también conocida como apoptosis).

Un importante regulador del ciclo celular es la proteína p53 que ejerce un control de tipo negativo frenando la división celular a nivel de G1 (etapa previa a la mitosis). Esta proteína es sintetizada por la propia célula en respuesta a la aparición o alteraciones del ADN. Si el ADN replicado puede influir negativamente en las células hijas, la proteína p53 se activa dando lugar a la muerte celular o apoptosis (muerte celular programada). La activación de dicha proteína p53 hace que se expresen otros genes que codifican para proteínas reguladoras como la p21 y la p16, entre otras, que bloquean la actividad de la ciclina cdk2 (involucrada en el proceso del ciclo celular).

En un estado de células tumorales la proteína p53 se inactiva, produciéndose la proliferación de las células dañadas. Sorprendentemente, la presencia del ácido 2-hidroxioléico permite que la proteína p53 se active y, por tanto, se llega a la muerte celular o apoptosis.

Con el fin de llevar a cabo el primer objetivo de la presente invención se han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*. Dichos modelos han permitido observar que el ácido 2-hidroxioléico ha demostrado poseer una actividad antitumoral superior

a la que presentan otros fármacos antitumorales, como por ejemplo las antraciclinas, y por lo tanto se trata de un compuesto de elevado interés terapéutico.

En modelos *in vitro* e *in vivo* se ha podido comprobar que por ejemplo, 200 μM de ácido oleico inducen una inhibición del 84% en la actividad de proteínas G en células NIH 3T3, mientras que 200 μM de daunomicina inducen una inhibición del 46% en dicha actividad.

La efectividad antitumoral del ácido 2-hidroxioléico aparece en la figura 5, donde se observa la desaparición de unas metástasis tumorales cerebrales, formadas a partir de un adenocarcinoma pulmonar, tras el tratamiento con ácido 2-hidroxioléico. El tratamiento con esta molécula produjo la desaparición del cáncer de pulmón. Estos resultados demuestran que (a) el ácido 2-hidroxioléico es una sustancia que puede ser utilizada para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer; (b) que su espectro de acción es amplio (ha sido efectivo sobre células leucémicas, de cáncer pulmonar y cerebral) y (c) que supera a otras moléculas utilizadas para el tratamiento del cáncer por su potencia antitumoral, por su ausencia de efectos secundarios y por ser su administración por vía oral, aunque también pueda realizarse por vía intravenosa o subcutánea.

• Un segundo objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente con actividad hipotensora.

Además de la acción antitumoral, se ha podido comprobar que el ácido 2-hidroxioléico también tiene un marcado efecto hipotensor, ya que induce reducciones de las presiones arteriales sistólica y diastólica.

La presión arterial está controlada por varios sistemas de receptores acoplados a proteínas G, tales como receptores vasopresina, adrenérgicos, etc.

La interacción entre las hormonas involucradas en el control de la presión arterial con los receptores asociados a proteínas G estimuladoras se ve afectada por la acción del ácido 2-hidroxioléico.

Dicho ácido inhibe la comunicación entre receptor, proteína G y efector. El resultado es una alteración de las señales de AMP cíclico y óxido nítrico, que da lugar a una reducción en la presión arterial. La mayor ventaja farmacológica del ácido 2-hidroxioléico es que, a diferencia de otros fármacos hipotensores, no tiene efectos bradicárdicos (es decir, no disminuye la frecuencia cardíaca).

• Un tercer objeto de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioléico posee actividad como agente que induce reducción del peso corporal.

Además de la actividad antitumoral e hipotensora del ácido 2-hidroxioléico, el ácido 2-hidroxioléico induce la reducción del peso corporal.

El peso corporal está mediado, entre otros, por factores como la capacidad metabólica del individuo y el control de la ingesta.

El control de la ingesta viene determinado por la sensación de saciedad, la cual a su vez se regula a nivel hormonal. Así por ejemplo, la deficiencia de nutrientes estimula la secreción de hor-

monas que dan lugar a una sensación de apetito. Después de la ingesta, una vez repuesto los nutrientes, se estimula la secreción de hormonas que dan lugar a una sensación de saciedad.

Se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioléico produce un efecto de saciedad, facilitando el control de la ingesta de alimentos. Este control también está mediado por receptores acoplados a proteínas G, como receptores de hormonas tales como citoquinas, leptinas, adrenoreceptores, etc..., y otras involucradas en el control de la ingesta.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la localización celular de proteína $G\alpha_i2$ marcada con fluoresceína en astrocitos primarios de cerebro de rata. En células control, el marcaje indica la presencia de esta proteína en toda la célula, en especial en el núcleo (flecha). En células tratadas con 2-hidroxioléico, el marcaje aparece en membrana y citosol, pero no en núcleo (flecha).

La figura 2 muestra la fijación de [35 S]GTP γ S a membranas de células NIH 3T3 transfectadas con el adrenoceptor $\alpha_{2A/D}$ de rata. Este parámetro mide la actividad de proteínas G. La presencia de 2-hidroxioléico induce una disminución de la función de las proteínas G aun mayor que la antraciclina daunomicina. Las antraciclinas son potentes fármacos antitumorales, por lo que el 2-hidroxioléico es potencialmente más eficaz ante tumores.

La figura 3 muestra la degradación de la Poli-ADP Ribosa polimerasa (PARP) en células de cáncer de pulmón humano (A549) (figura 3a) y células de leucemia humana (Jurkat) (figura 3b: E, etopósido; O, ácido 2-hidroxioléico). La disminución de los niveles de este enzima, o la evidencia de su degradación, indican el inicio de la apoptosis o muerte celular programada.

La figura 4 muestra el efecto del ácido 2-hidroxioléico (O) sobre la viabilidad de células Jurkat tras 48 h de cultivo. Dicho efecto inductor de la muerte de células de leucemia humana es más pronunciado que el del etopósido (Et), un conocido agente inductor de apoptosis y fármaco antitumoral. El número de células viables se determinó por citometría de flujo, utilizando 7-amino actinomicina D como marcador y un cultivo sin tratamiento (control, C) como patrón de referencia.

La figura 5 muestra metástasis (tumores) cerebrales, formadas a partir de un adenocarcinoma pulmonar. La imagen de la izquierda (5a) corresponde a los tumores antes del tratamiento y las de la derecha (5b y 5c) corresponden a los tumores después del tratamiento con 2-hidroxioléico. Como se aprecia, uno de los tumores ha desaparecido y el otro se ha reducido a 1/8 del volumen inicial.

La figura 6a muestra el efecto agudo (2 horas) y crónico (3 inyecciones diarias durante 7 días) del ácido hidroxioléico (30 mg/kg) sobre la presión arterial sistólica en ratas Sprague-Dowley. Dosis inferiores de esta molécula (1-10 mg/kg) produjeron efectos similares, aunque menos marcados. *P<0.01.

La figura 6b muestra el efecto del ácido 2-hidroxioléico (30 mg/kg) sobre la presión arterial

en humanos. *P<0.05, **P<0.01.

La figura 7 muestra el efecto del ácido 2-hidroxioléico sobre el peso corporal (3 inyecciones diarias de 30 mg/kg). Los animales (ratas Sprague-Dowley) tenían acceso libre a comida y agua en todo momento.

Ensayos experimentales

Ensayos antitumorales

La inducción de apoptosis o muerte celular programada, se evidenció en células de cáncer humanas: línea A549 de cáncer de pulmón y células Jurkat, de leucemia humana. En estas células, el ácido 2-hidroxioléico indujo la muerte celular, lo que indica su actividad antitumoral tal y como se muestra en la figura 3. Mediante experimentos de citometría de flujo, se determinó que en presencia de ácido 2-hidroxioléico la cantidad de células de leucemia humana (Jurkat) vivas era sólo un 10 % de las que quedaron vivas con etopósido.

En la figura 3 puede observarse que la presencia de 2-hidroxioléico en células de cáncer de pulmón humano induce la degradación de la PARP (marcador de apoptosis) desde concentraciones de 10 μ M (10^{-5} M, "-5") en comparación con las células no tratadas (control, "C"). En células Jurkat, concentraciones de 2-hidroxioléico de 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M (O1, O2, O3, respectivamente) también indujeron la degradación de la PARP (figura 3) en comparación con las células control (C). Este efecto se comparó con el producido por el fármaco antitumoral Etopósido, a concentraciones de 25 y 250 μ M (E1 y E2, respectivamente).

Estos resultados, en una serie de líneas celulares humanas de varios tipos de cáncer, indican que el ácido 2-hidroxioléico tiene un espectro de acción potencialmente amplio y que puede ser aplicado a una amplia variedad de diferentes tipos de cáncer. En diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*, el ácido 2-hidroxioléico ha mostrado ser más potente que otros fármacos antitumorales, como la daunomicina o el etopósido (figuras 2, 3 y 4).

Ensayos hipotensores

El ácido 2-hidroxioléico indujo reducciones significativas en la presión arterial en ratas. Estas bajadas se produjeron tanto de forma aguda (a las 2 horas del tratamiento, 19 ± 6 mm Hg, P<0,01, n=6) como de forma crónica (1 semana, 26 ± 7 mm Hg, P<0,001, n=6). Asimismo, tratamientos agudos y crónicos de 1 mg/kg a 10 mg/kg también produjeron reducciones significativas de la presión arterial y dependientes de concentración.

Finalmente, se observó que en humanos el ácido 2-hidroxioléico también producía disminuciones importantes de la presión arterial, véase figura 6b.

Estos datos indican claramente que el ácido 2-hidroxioléico es un agente eficaz para el tratamiento clínico/farmacológico de la hipertensión arterial.

Ensayos de control del peso corporal

Además de la actividad antitumoral e hipotensora del ácido 2-hidroxioléico, también se ha constatado que induce la reducción del peso corporal.

Ratas tratadas con esta sustancia disminuyeron su peso corporal durante tratamientos crónicos (desde 5 hasta 17 días). En estos experimen-

tos, las ratas tratadas con el ácido 2-hidroxioléico tenían acceso libre a comida y agua, de forma similar al grupo de ratas tratadas control. En estas condiciones, las ratas experimentaron una disminución del peso corporal progresiva a partir del primer día de tratamiento, hasta 17 gramos en el séptimo día de tratamiento (5% del peso corpo-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ral normal de una rata de Sprague-Dowley de 2-3 meses de edad). Experimentos similares realizados en ratones adultos, durante períodos de hasta 28 días con 500 mg/kg de ácido 2-hidroxioléico, demuestran reducciones en el peso corporal de un 15% a un 25%, respecto a ratones control (no tratados).

REIVINDICACIONES

1. Ácido 2-hidroxioléico para su utilización como agente regulador de la actividad de proteínas G y de las entidades moleculares de la vía de transducción.
2. Ácido 2-hidroxioléico para su utilización como agente antitumoral.
3. Ácido 2-hidroxioléico para su utilización como agente con actividad hipotensora.
4. Ácido 2-hidroxioléico para su utilización como agente que induce reducciones del peso corporal.
5. Utilización del ácido 2-hidroxioléico según

la reivindicación 1 y/ó 2, para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento del cáncer.

6. Utilización del ácido 2-hidroxioléico según la reivindicación 1 y/ó 3, para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

7. Utilización del ácido 2-hidroxioléico según la reivindicación 1 y/ó 4, para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento de sujetos con problemas de peso u obesidad.

8. Utilización del ácido 2-hidroxioléico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde dicho medicamento se administra por vía oral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

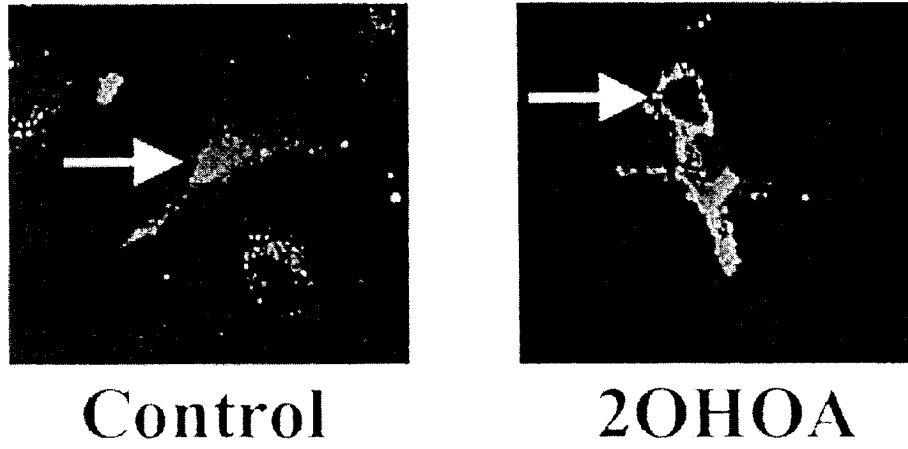


FIG. 1

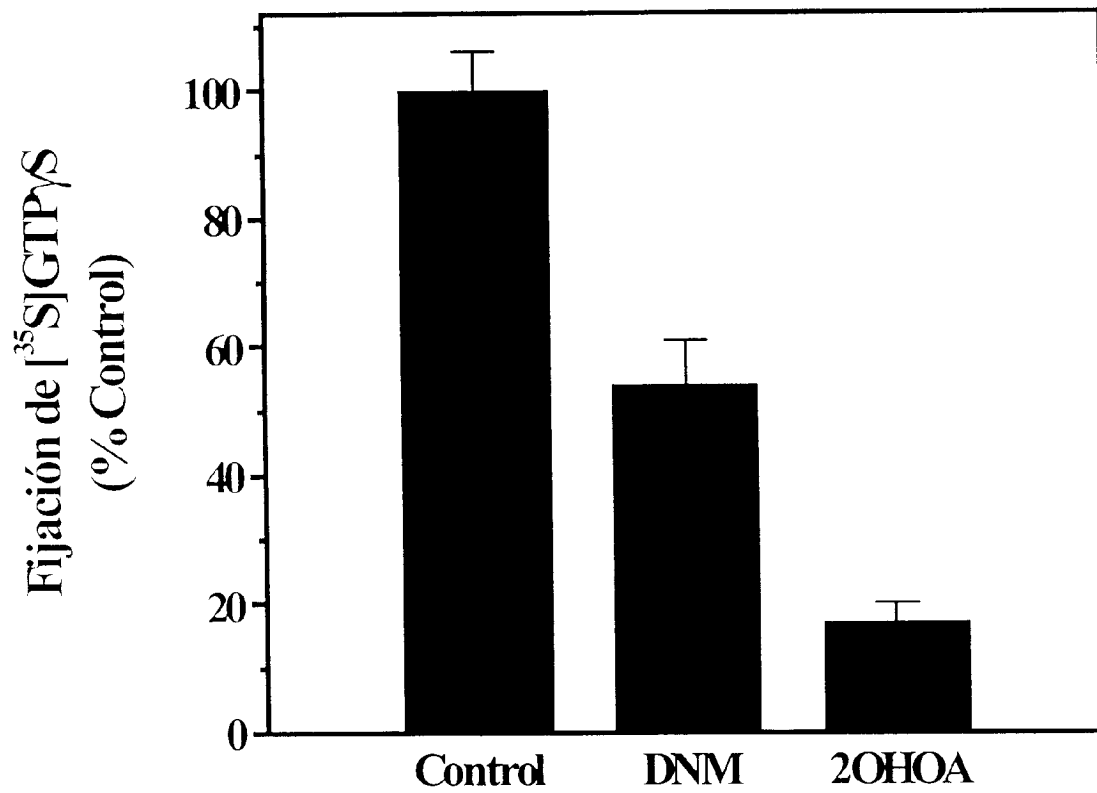


FIG. 2

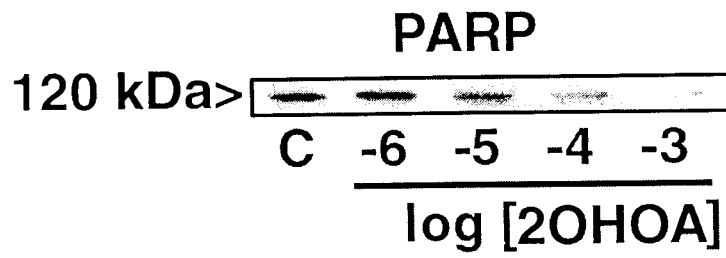


FIG. 3a

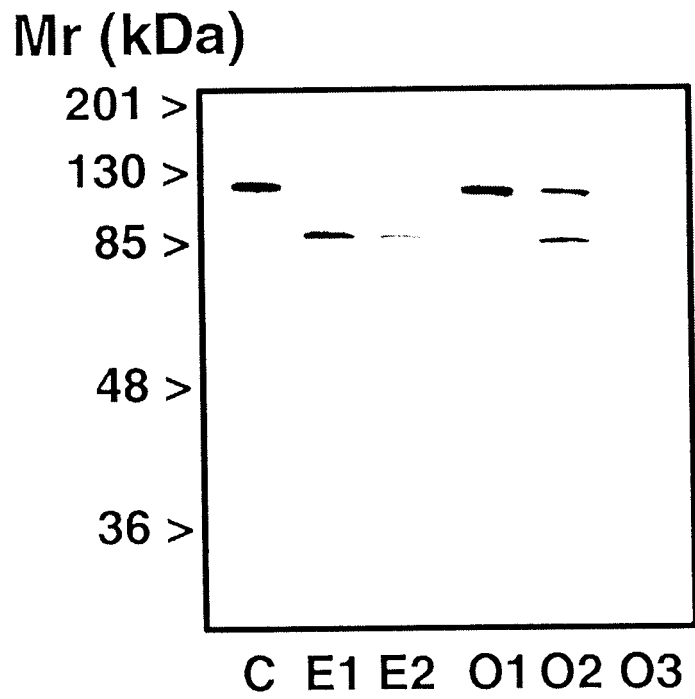


FIG. 3b

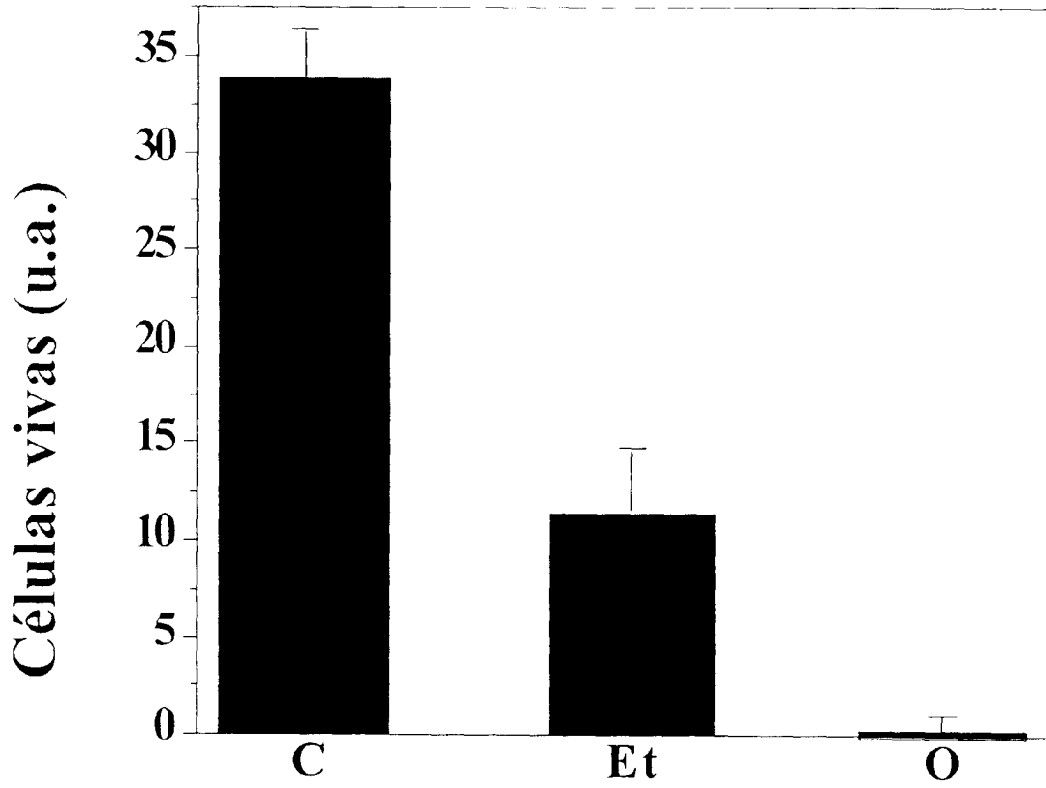
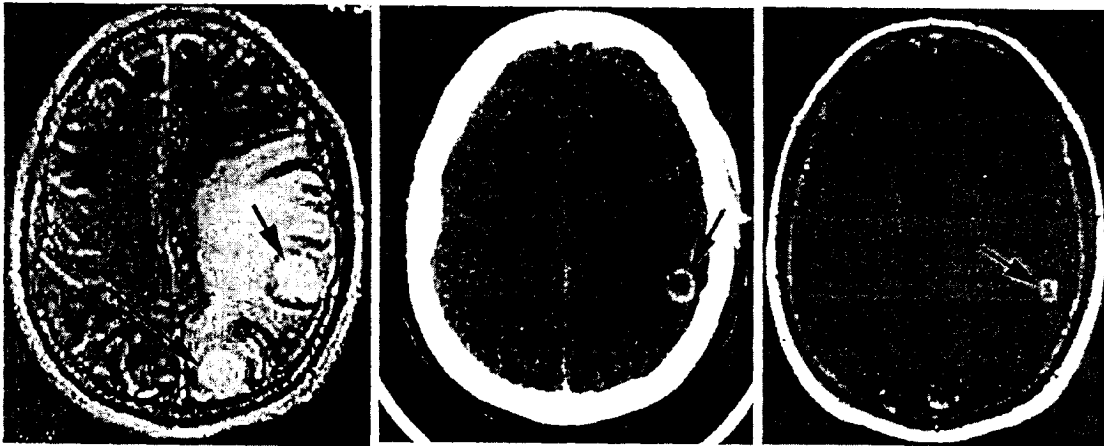


FIG. 4



October, 2000

April, 2001

June, 2001

FIG. 5a

FIG. 5b

FIG. 5c

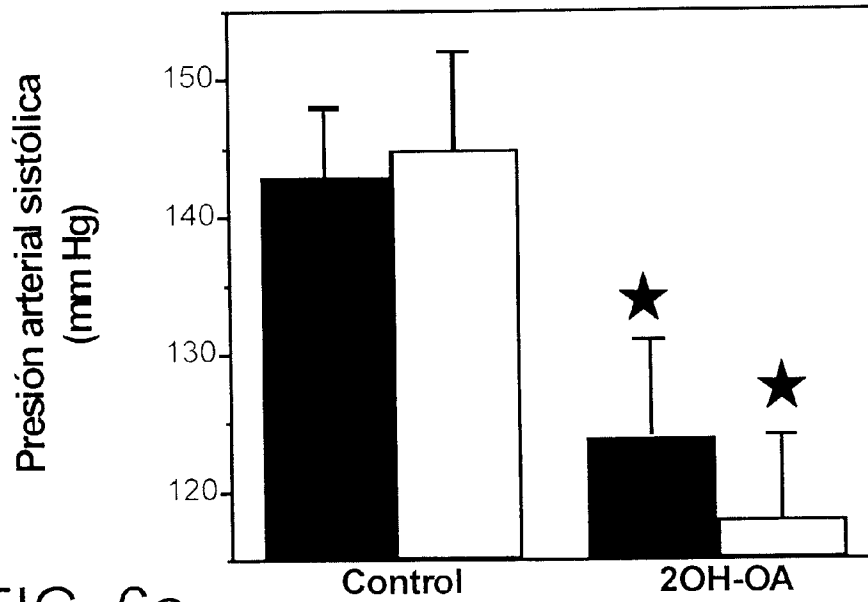


FIG. 6a

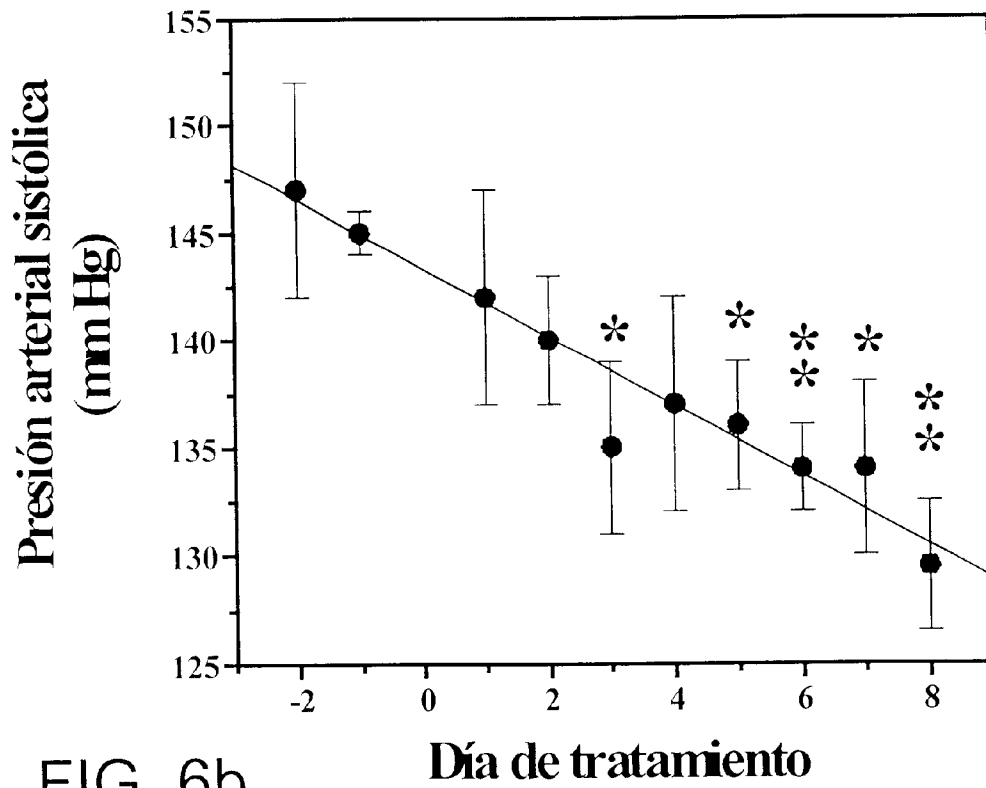


FIG. 6b

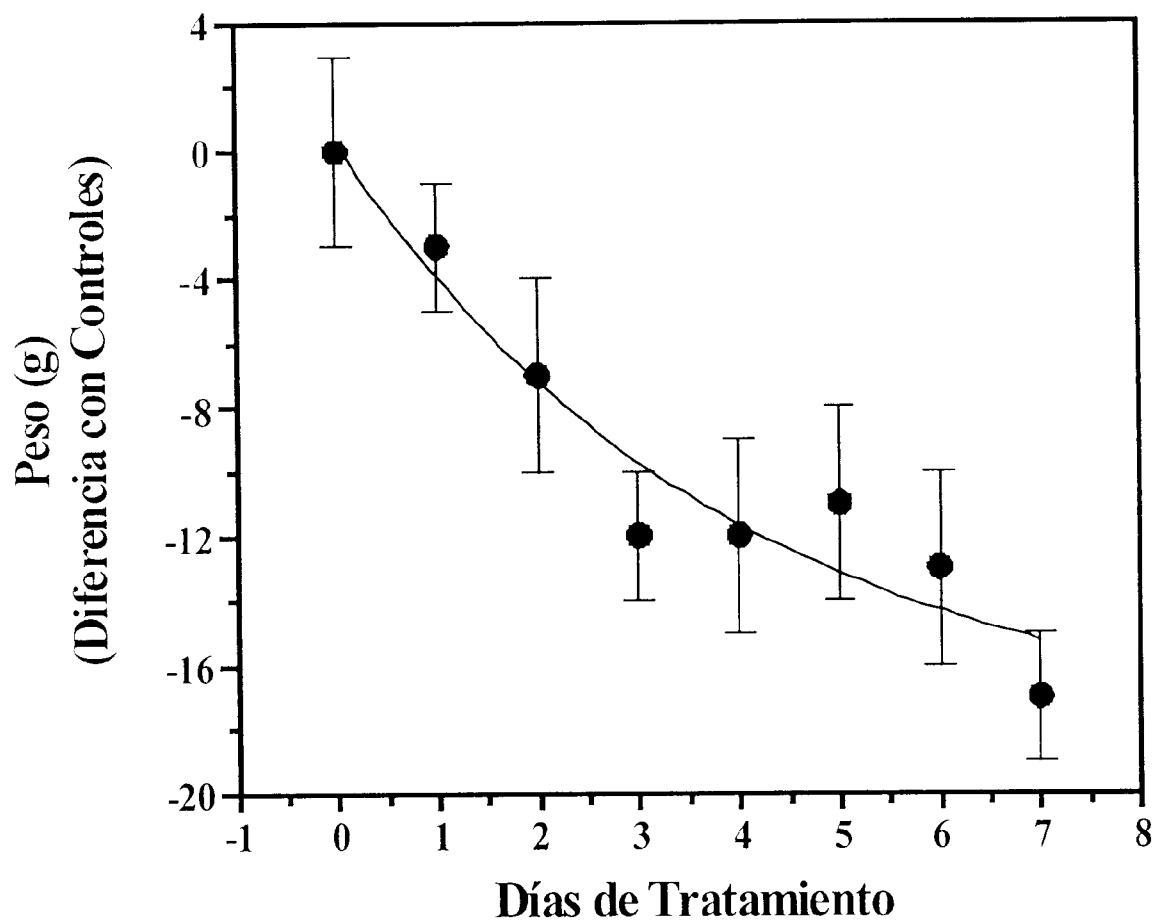


FIG. 7



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 31/20, A61P 35/00, 9/10, 9/12, 3/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9401100 A1 (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 20.01.1994, todo el documento.	2,5,8
A	US 6214875 B1 (YANG Z.) 10.04.2001, todo el documento.	2,5,8
A	AWAD ATIF, B. et al.: "18:1 n7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphorate release in HT-29 cells compared to n9 fatty acids", Cancer Letters, 1995, Vol. 91 (1), páginas 55-61, ISSN:0304-3835, todo el documento, en particular, resumen.	2,5,8
A	SEBASTIANO, B. et al.: "Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and supresses development of premalignant lesions in rat mammary gland", Nutrition and Cancer, 2001, Vol. 41 (1-2), páginas 91-97, ISSN:0163-5581, todo el documento, en particular, página 57, columna 2, líneas 7-9.	2,5,8
A	DE CATERINA, R. et al.: "The direct effect of injectable cyclosporine and its vehicle, cremophor, on endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression: Ricinoleic acid inhibits coronary artery endothelial activation", Transplantation (Baltimore), (1995), Vol. 60 (3), páginas 270-275, ISSN:0041-1337, todo el documento.	6,8

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 n.º:

Fecha de realización del informe

01.04.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1