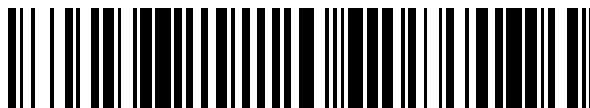


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 629**

21 Número de solicitud: 201131622

51 Int. Cl.:

C07C 59/42 (2006.01)

C07C 51/493 (2006.01)

A61K 31/201 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2013

Fecha de la concesión:

25.02.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.03.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (100.0%)
Ctra. de Valldemossa Km. 7,5
07122 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES**

72 Inventor/es:

**ESCRIBÁ RUIZ, Pablo Vicente;
BARCELÓ COBLIJN, Gwendolyn;
MARTÍN, María Laura;
TERÉS JIMÉNEZ, Silvia;
NOGUERA SALVÁ, María Antonia;
BUSQUETS XAUBET, Xavier;
SOTO SALVADOR, José Javier y
YUS ASTIZ, Miguel**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **ENANTIÓMEROS DE 2-HIDROXIDERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS Y SU USO COMO MEDICAMENTOS.**

57 Resumen:

Enantiómeros de 2-hidroxiderivados de ácidos grasos y su uso como medicamentos. La presente invención hace referencia al método de separación de los enantiómeros (o isómeros ópticos) [-] y [+] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos, a los propios enantiómeros, a composiciones farmacéuticas que los comprendan y a su uso como medicamentos. La presente invención también cubre un método in vitro de diagnóstico/pronóstico de dichas enfermedades basado en el nivel de expresión de dicha enzima EC 2.7.8.27, y un kit que comprende medios especialmente diseñados para llevar a cabo dicho diagnóstico/pronóstico. Además, la enzima EC 2.7.8.27 puede ser utilizada como diana terapéutica para seleccionar compuestos candidatos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por la misma.

ES 2 401 629 B1

DESCRIPCIÓN

**ENANTIÓMEROS DE 2-HIDROXIDERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS Y SU
USO COMO MEDICAMENTOS****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención hace referencia a un método de síntesis y separación de enantiómeros (o isómeros ópticos) [-] y [+] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos, a los propios enantiómeros aislados, a composiciones farmacéuticas que los comprendan, y a su uso como medicamentos en el tratamiento de enfermedades cuya etiología común está basada en alteraciones (de cualquier origen) de los lípidos de la membrana celular como, por ejemplo: alteraciones en el nivel, en la composición o en la estructura de dichos lípidos, así como en el tratamiento de enfermedades en las que la regulación de la composición y estructura lipídica de membrana induzca la reversión del estado patológico. El efecto terapéutico se consigue, preferentemente, a través de la regulación (activación o inhibición) de la actividad de la enzima ceramida:fosfocolina colinfosfotransferasa (EC 2.7.8.27, *IUBMB Enzyme Nomenclature*), o del nivel de su producto, la esfingomielina (SM).

Adicionalmente, tanto la enzima EC 2.7.8.27, como la esfingomielina (SM), pueden ser usadas como marcadores moleculares de las enfermedades anteriormente descritas. Por lo tanto, la presente invención también abarca un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de dichas enfermedades basado en la evaluación de la actividad de dicha enzima EC 2.7.8.27, y/o del nivel de SM; así como un kit que comprende medios especialmente diseñados para llevar a cabo dicho diagnóstico/pronóstico.

Además, la enzima EC 2.7.8.27 y/o la SM pueden ser utilizadas como dianas terapéuticas a la cuales dirigir moléculas capaces de revertir su estado alterado, y, consecuentemente, tratar aquellos procesos patológicos que se hubieran desarrollado, o se fueran a desarrollar en un futuro, como consecuencia de la actividad anormal de la enzima EC 2.7.8.27 o del nivel inadecuado de SM. Así, tanto la enzima EC 2.7.8.27, como la propia SM, pueden ser la base para el diseño procedimientos de selección (*screening*, en inglés) de compuestos candidatos con el objetivo de conseguir moléculas que, como por ejemplo los enantiómeros [-] y [+] de la

invención, tengan la capacidad de regular la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o el nivel de SM, ejerciendo un efecto terapéutico.

Así, la presente invención, debido a su amplio espectro de aplicación, es susceptible de ser englobada en el campo de la medicina y la farmacia de forma general.

5 ESTADO DE LA TÉCNICA

Las membranas celulares son estructuras que definen la entidad de las células y de los orgánulos en ellas contenidas. En las membranas o en sus proximidades ocurren la mayoría de los procesos biológicos. Los lípidos no sólo tienen un papel estructural, sino que regulan la actividad de importantes procesos. Es más, la regulación de la composición lipídica de la membrana también influye en la localización o la función de importantes proteínas implicadas en el control de la fisiología celular, como las proteínas G o la PKC (Escribá et al., 1995; Escribá et al., 1997; Yang et al., 2005; Martínez et al., 2005). Estos y otros estudios demuestran la importancia que tienen los lípidos en el control de importantes funciones celulares. De hecho, numerosas enfermedades en humanos tales como (entre otras): el cáncer, enfermedades cardiovasculares, procesos neurodegenerativos, obesidad, desórdenes metabólicos, inflamación, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes, se han relacionado con alteraciones en los niveles o en la composición de los lípidos presentes en las membranas biológicas, evidenciándose, además, los efectos beneficiosos que presentan los tratamientos con otros ácidos grasos distintos a los de la presente invención y que regulan la composición y estructura de los lípidos de membrana, pudiendo ser empleados para revertir dichas enfermedades (Escribá et al., 2006).

Los lípidos que se ingieren en la dieta regulan la composición lipídica de las membranas celulares (Alemany et al., 2007). Asimismo, diferentes situaciones fisiológicas y patológicas pueden cambiar los lípidos presentes en las membranas celulares (Buda et al., 1994; Escribá et al., 2006). Los cambios en la composición lipídica de las membranas influyen sobre la señalización celular, pudiendo dar lugar al desarrollo de enfermedades o bien a revertirlas (Escribá et al., 2006).

Diferentes estudios realizados durante los últimos años indican que los lípidos de membrana desempeñan un papel mucho más importante del que se les había asignado hasta ahora (Escribá et al., 2008). Un ejemplo de dicha importancia lo constituyen los peces que viven en ríos con temperatura variable, cuyos lípidos experimentan importantes cambios (cambios en abundancia y tipos de lípidos de membrana) cuando la temperatura baja desde 20°C (verano) hasta 4°C (invierno) (Buda et al., 1994). Estos cambios permiten el mantenimiento de sus funciones en tipos celulares de muy diversa naturaleza. Por ello, se podría decir, que los lípidos de membrana pueden determinar el buen o mal funcionamiento de múltiples mecanismos de señalización celular. Dado que un organismo enfermo lo es porque sus células están enfermas, las alteraciones en los lípidos de membrana pueden dar lugar a la aparición de enfermedades. De forma análoga, formulaciones terapéuticas, nutracéuticas o cosméticas, enfocadas a regular los niveles de lípidos de membrana, pueden prevenir y revertir (curar) procesos patológicos. Además, numerosos trabajos indican que el consumo de grasas saturadas y *trans*-monoinsaturadas está relacionado con el deterioro de la salud. Enfermedades vasculares y tumorales, entre otras, se han relacionado directamente con este tipo de lípidos (Stender et al., 2004). El deterioro de un organismo se manifiesta en la aparición de éstos y otros tipos de enfermedades.

Las membranas celulares constituyen la barrera selectiva a través de la cual una célula intercambia metabolitos e información con otras células y con el medio extracelular que la rodea. Sin embargo, las membranas desempeñan otras funciones muy importantes a nivel celular. Por una parte, sirven de soporte a proteínas implicadas en la recepción o emisión de mensajes que controlan importantes parámetros orgánicos. Dichos mensajes, mediados por numerosas hormonas, neurotransmisores, citoquinas, factores de crecimiento, etc., activan proteínas de membrana, que propagan la señal recibida al interior celular a través de otras proteínas, algunas de las cuales también se ubican en la membrana. Dado que (1) estos sistemas funcionan como cascadas de amplificación y (2) que los lípidos de membrana pueden regular la localización y función de dichas proteínas, la composición lipídica de las membranas puede tener un impacto importante en la funcionalidad celular. En concreto, la interacción de ciertas proteínas (denominadas periféricas, como las proteínas G, la proteína kinasa C, la proteína Ras, etc.) con la membrana celular depende de la composición lipídica de la

misma (Vögler et al., 2004; Vögler et al., 2008). Por otro lado, la composición lipídica de las membranas celulares está influenciada por el tipo y la abundancia de los lípidos ingeridos (Perona et al., 2007). De esto se deduce que la ingesta de lípidos puede regular la composición lipídica de las membranas, que a su vez puede controlar la interacción (y por ello la actividad) de importantes proteínas de señalización celular (Yang et al., 2005).

El hecho de que los lípidos de membrana puedan controlar la señalización celular, supone que también puedan regular el estado fisiológico de las células. De hecho, se han descrito efectos tanto negativos, como positivos de los lípidos sobre la salud (Escribá et al., 2006; Escribá et al., 2008). Estudios preliminares han demostrado que el ácido 2-hidroxioléico, que es un ácido graso monoinsaturado, es capaz de revertir ciertos procesos patológicos, como el sobrepeso, la hipertensión o el cáncer (Alemany et al., 2004; Martínez et al., 2005; Vögler et al., 2008).

Las enfermedades cardiovasculares están frecuentemente asociadas a la hiperproliferación de las células que constituyen los tejidos cardíaco y vascular. Esta hiperproliferación de células cardiovasculares da lugar a depósitos en el lumen interno de los vasos y cavidades del sistema cardiovascular que se traducen en una amplia gama de enfermedades, como la hipertensión, la aterosclerosis, la isquemia, infartos, etc. (Schwartz et al., 1986). De hecho, se ha sugerido el desarrollo de medicamentos que eviten la proliferación celular para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Jackson et al., 1992).

La obesidad se produce por una alteración entre el balance de ingesta y gasto energético que se debe, en parte, a alteraciones en los mecanismos que regulan estos procesos. Por otro lado, esta patología se caracteriza por la hiperplasia (aumento en el número de células) o hipertrofia (aumento en el tamaño) de las células del tejido adiposo, los adipocitos. Numerosos estudios demuestran que los ácidos grasos, bien libres o como parte de otras moléculas, pueden influir sobre una serie de parámetros relacionados con la homeostasis energética, como la masa de grasa corporal, el metabolismo lipídico, la termogénesis o la ingesta, entre otros (Vögler et al., 2008). En este sentido, la modificación de ácidos grasos podría ser una estrategia para regular la homeostasis energética y, por ello, el peso corporal. De hecho, en la presente

invención, se muestra cómo los niveles bajos de SM en células se asocian a proliferación celular incrementada y que dicha alteración se relaciona con el estado patológico de células humanas. Es más, la regulación de la enzima EC 2.7.8.27 mediante las moléculas descritas en la presente invención son capaces de normalizar
 5 los niveles de SM en células patológicas y, por ello, revertir las alteraciones patofisiológicas aquí descritas.

Los procesos neurodegenerativos dan lugar a una serie de enfermedades con diferentes manifestaciones, pero con la característica común de estar ocasionadas por degeneración de las células del sistema nervioso central y/o periférico. Algunos de
 10 estos procesos neurodegenerativos suponen una merma importante de la capacidad cognitiva de los pacientes, como la enfermedad de Alzheimer o la demencia senil. Otras, dan lugar a alteraciones de tipo motor, como la enfermedad de Parkinson o diferentes tipos de esclerosis. Finalmente, ciertas enfermedades neurodegenerativas pueden derivar en procesos en los que se desarrolla ceguera, problemas de audición,
 15 desorientación, alteraciones en el estado de ánimo, etc.

Un ejemplo de desorden neurodegenerativo bien caracterizado lo constituye la enfermedad de Alzheimer, en la que se ha observado la formación de placas seniles, formadas por restos de proteínas de membrana (como el péptido β -amiloide) procesadas erróneamente, que se acumulan en el exterior de las células, y de ovillos de
 20 neurofilamentos de proteína Tau, que aparecen en el interior celular. Este proceso se ha asociado a alteraciones en el metabolismo del colesterol y la consecuente alteración de los niveles de colesterol en las membranas (Sagin et al., 2008). De hecho, el desarrollo de esta enfermedad está relacionado con otras enfermedades en las que se han descrito alteraciones del metabolismo lipídico, y más concretamente del
 25 colesterol, como las de tipo cardiovascular.

Por otro lado, la esclerosis y otros procesos neurodegenerativos se relacionan con la “desmielinización”, cuyo resultado neto es la pérdida de lípidos en la cubierta de los axones neuronales, con las consiguientes alteraciones en el proceso de propagación de señales eléctricas que ello supone. La mielina es una capa lipídica que rodea los
 30 axones de muchas neuronas y que está formada por una sucesión de repliegues en espiral de la membrana plasmática de células de la glia (células de Schwann). Por todo

ello, está claro que los lípidos juegan un papel importantísimo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Es más, se ha comprobado que los ácidos grasos poliinsaturados naturales no modificados tienen un moderado efecto preventivo sobre el desarrollo de procesos neurodegenerativos (Lane et al., 2005).

- 5 Las enfermedades metabólicas forman un conjunto de patologías caracterizadas por la acumulación o el déficit de ciertas moléculas. Un ejemplo típico lo constituye la acumulación de colesterol y/o de triglicéridos por encima de los niveles normales. El aumento en los niveles de colesterol y/o triglicéridos, tanto a nivel sistémico (por ejemplo el aumento en los niveles plasmáticos) como a nivel celular (por ejemplo en
10 las membranas celulares) se asocian a alteraciones en la señalización celular que desembocan en disfunciones a varios niveles, y que se deben normalmente a errores en la actividad de ciertos enzimas o el control de dichas proteínas. Entre las metabolopatías más importantes se encuentran la hipercolesterolemia (elevados niveles de colesterol) y la hipertrigliceridemia (elevados niveles de triglicéridos).
15 Estas enfermedades tienen tasas de incidencia, de morbilidad y mortalidad elevadas, por lo que su tratamiento es una necesidad de primer orden.

- El papel protector de ciertos ácidos grasos insaturados sobre ciertas enfermedades ya ha sido descrito por diferentes investigadores. De esta forma, los ácidos grasos insaturados ralentizan el desarrollo de cáncer y tienen efectos positivos contra el
20 desarrollo de enfermedades cardiovasculares, patologías neurodegenerativas, metabólicas, obesidad, inflamación, etc. (Trombetta et al., 2007; Jung et al., 2008; (Florent et al., 2006). Sin embargo, la actividad farmacológica de estos compuestos es muy limitada debido a su rápida metabolización y escaso tiempo de vida media en la sangre. Por lo tanto se antoja necesario el desarrollo de ácidos grasos insaturados con
25 una metabolización más lenta, consecuencia de la cual su presencia en la membrana celular se vea aumentada, en comparación a los ácidos grasos insaturados hasta ahora utilizados, y que faciliten la interacción de proteínas periféricas de señalización celular.

- 30 Ahondando en la importancia de los lípidos de la membrana celular, los esfingolípidos o esfingofosfolípidos son una clase importante de lípidos de las membranas celulares y son los más abundantes en los tejidos de los organismos más complejos. Las

moléculas de los esfingolípidos presentan propiedades anfipáticas, es decir, tanto hidrófobas como hidrófilas, lo que les permite desempeñar un papel importante en la formación de membranas biológicas. Algunos de los glucoesfingolípidos se encuentran en la superficie de los glóbulos rojos de la sangre y el resto de células
5 actuando como antígenos y constituyendo los grupos sanguíneos.

Por lo tanto, los esfingolípidos tienen una gran importancia biológica por el papel de señalización celular que desempeñan. Concretamente, la SM es un tipo de esfingolípido muy abundante en las membranas celulares de todos los organismos (Huitema et al., 2004). Se localiza principalmente en la monocapa externa de la
10 membrana plasmática donde tiene una función esencial en la formación de microdominios denominados *lipid rafts*, que son áreas especializadas de la membrana celular con importantes funciones en la señalización celular, ya que en estos dominios se concentran proteínas que interaccionan entre sí gracias a la aproximación que se deriva de su unión a los lípidos (Simons y Toomre, 2000). La enzima EC 2.7.8.27 es
15 responsable de la síntesis de SM mediante la transferencia de una fosfocolina al grupo hidroxilo primario de la ceramida para formar la SM y el 1,2-diacilglicerol (DAG). Esta enzima ocupa una posición central en el metabolismo de esfingolípidos y glicerofosfolípidos. La EC 2.7.8.27 se localiza en la membrana plasmática, en el aparato de Golgi y también se ha detectado su actividad en la membrana nuclear y en
20 la cromatina (Albi et al., 1999). La EC 2.7.8.27 también actúa como regulador de los niveles de ceramida y del diacilglicerol (DAG) siendo ambas moléculas a su vez reguladoras de la muerte celular programada por apoptosis y por autofagia (Jiang et al., 2011; Van Helvoort et al., 1994; Tafesse et al., 2006). La cabeza polar de la SM es muy voluminosa e impide el anclaje de proteínas, como Ras, que tienen lípidos
25 ramificados (como los restos isoprenilo, farnesilo o geranilgeranilo), mientras que favorece el anclaje de otras proteínas que tienen restos de ácidos grasos saturados (como los ácidos mirístico o palmítico).

Por lo tanto, dada la importancia de la enzima EC 2.7.8.27 y de la SM en el correcto funcionamiento y estructura de la membrana celular, y la sabida relación existente
30 entre las alteraciones tanto estructurales como funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular con el desencadenamiento de varias enfermedades como, por

ejemplo: cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad, enfermedades neurodegenerativas y metabólicas; sería muy importante encontrar compuestos capaces de regular la actividad de dicha enzima y, consecuentemente, el nivel de SM, y con ello poder revertir patologías cuyo origen se deba a una actividad de la enzima anormal y/o a un nivel alterado de SM.

Adicionalmente, sería importante encontrar compuestos capaces de regular la actividad de otras enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, por ejemplo la enzima serin-palmitoil transferasa (EC 2.3.1.50); o la enzima estearoil-CoA desaturasa (ECD, EC 1.14.19.1) responsable de la síntesis de ácido oleico. La ceramida producida por la actividad de la EC 2.3.1.50 es una molécula lipídica de gran interés biológico. Un papel relevante relativo a la ceramida es su participación en la inducción de apoptosis, también denominada muerte celular programada (Lladó et al., 2010). La apoptosis es un proceso biológico muy regulado que sirve para eliminar células no útiles o que comprometen la salud del organismo. En este sentido, es frecuente que las células tumorales desarrollen mecanismos moleculares para escapar a la apoptosis (Lladó et al., 2010).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención se focaliza en resolver las alteraciones en los niveles celulares de SM, dando lugar a compuestos capaces de revertir el nivel de expresión alterado de la enzima EC 2.7.8.27 mediante su activación (en caso de que la enzima esté infra-expresada o que presente una actividad reducida) o mediante su inhibición (en caso de que la enzima esté sobre-expresada o que presente una actividad aumentada), consiguiendo controlar los niveles de SM sintetizados por dicha enzima y, consecuentemente, revertir los procesos patológicos debidos a la desregulación de la enzima o a niveles anormales de SM.

Así, para la consecución de dicho objetivo, en la presente invención se llevó a cabo un procedimiento de síntesis y aislamiento de los enantiómeros [-] y [+] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos, los cuales, como se demuestra más abajo en los ejemplos, son capaces de regular la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y,

consecuentemente, el nivel de SM sintetizada. Estos ácidos grasos presentan mayor vida media en sangre que los ácidos grasos naturales. De hecho, la presente invención hace referencia a composiciones farmacéuticas que comprendan dichos enantiómeros, y a su uso como medicamentos en el tratamiento de enfermedades cuya etiología
5 común está basada en alteraciones (de cualquier origen) de los lípidos de la membrana celular como, por ejemplo: alteraciones en el nivel, en la composición o en la estructura de dichos lípidos, así como en el tratamiento de enfermedades en las que la regulación de la composición y estructura lipídica de membrana induzca la reversión del estado patológico. El efecto terapéutico se consigue, preferentemente, a través de
10 la regulación (activación o inhibición) de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y/o del nivel de su producto, la SM.

Además de la regulación efectuada sobre la enzima EC 2.7.8.27, la presente invención demuestra que, por ejemplo en células U118, el compuesto 2OHOA regula la actividad de otros enzimas implicados en el metabolismo lipídico. Así, se investigó la
15 enzima EC 2.3.1.50. En la presente invención, se muestra que el 2OHOA estimula la actividad de la EC 2.3.1.50 (**Ejemplo 8 y Figura 9**), provocando la muerte celular programada en células de leucemia humana. Por otro lado, también se encontró una reducción importante en los niveles de ácido oleico en las membranas de células U118 tratadas con 2OHOA demostrándose que el 2OHOA es un potente inhibidor de la EC
20 1.14.19.1, enzima responsable de la síntesis del ácido oleico a partir del ácido esteárico (**Ejemplo 9 y Figura 10**).

Los enantiómeros [-] y [+] de la invención se diferencian en la dirección de desvío de la luz polarizada. Si el isómero óptico desvía la luz polarizada hacia la derecha (en orientación con las manecillas del reloj) se representa con el signo [+] (es el isómero
25 dextrógiro o forma dextro). En cambio, si el isómero óptico desvía la luz polarizada hacia la izquierda (en orientación contraria con las manecillas del reloj) se representa con el signo [-] (es el isómero levógiro o forma levo).

Concretamente la presente invención evidencia que el enantiómero [-] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos actúa como activador de dicha enzima regulando
30 positivamente la síntesis de SM, un esfingolípido que, como se explica más arriba, es mayoritario en las membranas de células humanas y animales, e indispensable para la

correcta estructuración de la bicapa lipídica y funcionamiento de la célula. Por lo tanto, dicho enantiómero [-] puede ser usado para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de aquellas patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular, tales como: cáncer, obesidad, hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, etc.

Tal y como se muestra en los ejemplos de la invención, es importante hacer notar que el enantiómero [-] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos exhibe un efecto terapéutico mejorado respecto al racémico (que contiene cantidades iguales de los dos enantiómeros). Además, también es destacable el hecho de que el enantiómero [-] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos presenta menor toxicidad y efectos secundarios que el racémico y que el enantiómero [+] (ver **Tabla 3, Ejemplo 7**).

Además, la presente invención también demuestra que el enantiómero [+] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos actúa como inhibidor de dicha enzima EC 2.7.8.27 regulando negativamente la síntesis de SM, pudiendo ser utilizado en investigación básica para el estudio de la regulación de la propia enzima EC 2.7.8.27, o para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una actividad anormalmente alta de la enzima EC 2.7.8.27, y/o un nivel anómalamente alto de SM, como, por ejemplo, la fibrosis quística (Slomiany et al., 1982).

Adicionalmente, dado que la enzima EC 2.7.8.27 es responsable de la síntesis de SM y, por ende, de la correcta estructura y función de la membrana celular, tanto la enzima como la propia SM podrían considerarse como marcadores moleculares, utilizables para llevar a cabo un método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades basadas en alteraciones en la membrana celular. Consecuentemente, la presente invención también hace referencia a un kit para llevar a cabo el diagnóstico o pronóstico de dichas patologías, el cual comprende reactivos o medios capaces de evaluar la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y/o el nivel de SM y, consecuentemente, implementar dicho diagnóstico/pronóstico.

- Por el mismo motivo, dicha enzima y/o su producto, la SM, pueden ser consideradas como dianas terapéuticas a las cuales dirigir moléculas capaces de regular la actividad de la enzima, y/o el nivel de SM, y, consecuentemente, revertir aquellos procesos patológicos que se hubieran desarrollado, o se fueran a desarrollar en un futuro, como consecuencia de la alteración en la actividad de la enzima o en el nivel de SM. Así, a modo de ejemplo, el enantiómero [-] de la invención sirve para ilustrar el posible uso de la enzima EC 2.7.8.27 como diana terapéutica, al activar su función enzimática en procesos patológicos en los que dicha función es deficitaria, consiguiendo restablecer el nivel de SM a niveles normales. Por otro lado, la medición de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o los niveles de SM también serían útiles para realizar procedimientos de selección (*screening*, en inglés) de compuestos candidatos con el objetivo de conseguir otras moléculas que, como los enantiómeros [-] y [+] de la invención, tuvieran la capacidad de regular la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y/o el nivel de SM, siendo capaces de revertir procesos patológicos.
- Consecuentemente, la presente invención evidencia la particular importancia de seleccionar compuestos con características estructurales exclusivas como son: ácidos grasos con al menos un doble enlace, con un total de átomos de carbono (C) igual o menor a 20, y un radical sustituido, particularmente el radical hidroxilo (OH), en el carbono 2 (o carbono α).
- Concretamente, los compuestos a los que hace referencia la presente invención son los enantiómeros [-] y [+] de Fórmula I:



(I)

- donde a , b y c pueden tomar valores independientes entre 0 y 6, teniendo en cuenta que la suma total de carbonos de la molécula sea ≤ 20 .

Además, se establece que la forma terapéutica preferida de la presente invención es el enantiómero [-] de Fórmula I, el cual se presenta como la forma más efectiva en la activación de la enzima EC 2.7.8.27, por delante de la forma racémica, y del

enantiómero [+] de Fórmula I que se presenta como un inhibidor de la enzima EC 2.7.8.27.

En un aspecto preferido, la presente invención hace referencia especial a los enantiómeros [+] y [-] de Fórmula I con los siguientes valores de *a*, *b* y *c*:

5

Tabla 1

Fórmula	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
HOOC- HOCH -(CH ₂) ₆ -(CH=CH-CH ₂) ₁ -(CH ₂) ₆ -CH ₃	6	1	6
HOOC- HOCH -(CH ₂) ₆ -(CH=CH-CH ₂) ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	6	2	3
HOOC- HOCH -(CH ₂) ₆ -(CH=CH-CH ₂) ₃ -(CH ₂) ₀ -CH ₃	6	3	0
HOOC- HOCH -(CH ₂) ₃ -(CH=CH-CH ₂) ₃ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	3	3	3

En un aspecto particularmente preferido la presente invención hace referencia al enantiómero [-] de fórmula [-]HOOC-**HOCH**-(CH₂)₆-(CH=CH-CH₂)₁-(CH₂)₆-CH₃, nombrado, a efectos de la presente invención, [-]2OHOA.

- 10 En otro aspecto particularmente preferido la presente invención hace referencia al enantiómero [+] de fórmula [+]HOOC-**HOCH**-(CH₂)₆-(CH=CH-CH₂)₁-(CH₂)₆-CH₃, nombrado, a efectos de la presente invención, [+]2OHOA.

A modo de ejemplo, las enfermedades caracterizadas por un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y, consecuentemente, por un nivel de SM anormalmente bajo en las membranas celulares, y que podrían ser tratadas con el enantiómero [-] de la invención son:

- 15
- El cáncer: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón (ver **Tabla 2**).
- 20
- Patologías vasculares: hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca, etc.
 - Patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

- Otras patologías: lesión medular, enfermedad de Alzheimer, esclerosis, celulitis, etc.

Por lo tanto, más específicamente, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a un enantiómero [-] o [+] de un compuesto de Fórmula I:



(I)

caracterizado porque a , b y c pueden tomar valores independientes entre 0 y 6, con la condición de que el número total de carbonos sea ≤ 20 . En un aspecto preferido de la invención el compuesto resulta de la selección de al menos una de las siguientes
10 combinaciones de valores a , b y c : $a=6$, $b=1$ y $c=6$; $a=6$, $b=2$ y $c=3$; $a=6$, $b=3$ y $c=0$; y $a=3$, $b=3$ y $c=3$.

Además, un aspecto preferido de la presente invención hace referencia a los compuestos de fórmula: $[+]\text{HOOC-HOCH-(CH}_2\text{)}_6\text{-(CH=CH-CH}_2\text{)}_1\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$.

Otro aspecto particularmente preferido de la presente invención hace referencia a los
15 compuestos de fórmula: $[-]\text{HOOC-HOCH-(CH}_2\text{)}_6\text{-(CH=CH-CH}_2\text{)}_1\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$.

Un segundo aspecto de la presente invención hace referencia al uso de al menos un compuesto de los anteriormente mencionados para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de la membrana celular, debidas
20 a la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o del nivel o concentración de SM en células en general y en membranas, en particular.

Incluso la presente invención hace referencia a la propia composición farmacéutica que comprenda al menos uno de dichos compuestos y, opcionalmente, vehículos farmacéuticamente aceptables. Así, los compuestos de la presente invención pueden
25 administrarse de forma independiente o formulados en composiciones farmacéuticas donde se combinan con excipientes como por ejemplo: ligantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, edulcorantes, saborizantes, colorantes, transportadores, etc., y combinaciones de los mismos. Asimismo, los compuestos de la

invención pueden formar parte de composiciones farmacéuticas en combinación con otros principios activos.

Para el uso de los compuestos de la invención como medicamentos, su administración puede llevarse a cabo por cualquier vía como, por ejemplo, vía enteral (mediante el
 5 aparato digestivo), vía oral (mediante píldoras, comprimidos o jarabes), vía rectal (mediante supositorios o enemas), vía tópica (mediante cremas o parches), vía inhalatoria, vía parenteral inyectada, vía inyección intravenosa, vía inyección intramuscular o vía inyección subcutánea, en la forma arriba indicada o en cualquier tipo de forma farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo: metilos, etilos,
 10 fosfatos, otros radicales de tipo ester, eter, alquilo, etc.

En un aspecto preferido, la invención hace referencia al uso del compuesto $[-]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_7-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales en la membrana celular debidas a
 15 un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, seleccionándose las patologías preferiblemente entre: cáncer preferentemente cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón; patologías vasculares preferentemente hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías,
 20 angiogénesis, hiperplasia cardíaca o patologías metabólicas; patologías metabólicas preferentemente: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

En otro aspecto preferido, la invención hace referencia al uso del compuesto de fórmula $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_7-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ para la elaboración
 25 de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales en la membrana celular debidas a un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente elevado de SM en la membrana celular, siendo la patología, por ejemplo, la fibrosis quística.

Un tercer aspecto de la presente invención hace referencia a un método de tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de la membrana celular, debidas a la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o del nivel de SM, que comprende la administración al paciente
 5 de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de los citados anteriormente o composiciones que los comprendan.

En un aspecto preferido, la invención hace referencia a un método para el tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales en la membrana celular debidas a un déficit en la actividad de la enzima
 10 EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto $[-]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ o de una composición que lo comprenda. En un aspecto preferido las patologías se seleccionan preferiblemente entre: cáncer preferentemente cáncer de próstata, cáncer de mama,
 15 cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón; patologías vasculares preferentemente hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca o patologías metabólicas; patologías metabólicas preferentemente: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

En otro aspecto preferido, la invención hace referencia a un método de tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales en la membrana celular debidas a un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente elevado de SM en la membrana celular, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto
 25 $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ o de una composición que lo comprenda. En una realización preferida la patología es, por ejemplo, la fibrosis quística.

A los efectos de la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente eficaz” a aquella que revierte la enfermedad o la previene sin mostrar efectos
 30 secundarios adversos. También se entendería por “cantidad terapéuticamente eficaz”,

aquella que, produciendo un efecto terapéutico significativo, tuviera un nivel de toxicidad aceptable cuando la enfermedad tratada fuera muy grave o mortal.

Un cuarto aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para la selección de compuestos candidatos útiles en el tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de la membrana celular, que comprende la evaluación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, o del nivel de SM, en presencia de dicho compuesto candidato. Es decir, la presente invención comprende el uso de la enzima EC 2.7.8.27, o de la propia SM, como dianas terapéuticas a las que dirigir compuestos con el objetivo de prevenir y/o tratar las patologías anteriormente descritas.

El quinto aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular que comprende la determinación de la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormal de SM en la membrana celular u otros compartimentos celulares. Es decir, la presente invención comprende el uso de la enzima EC 2.7.8.27, o de la propia SM, como marcador molecular a través de las cuales se pueda realizar el diagnóstico y/o pronóstico de las patologías anteriormente descritas. La importancia de la SM en la estructura y actividad de la membrana celular, y de la enzima EC 2.7.8.27 como responsable de producir este fosfolípido, hacen que la detección de la concentración/actividad celular de ambas en tejidos, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina y/o otros fluidos corporales, pueda ser empleada en la preparación de kits de detección, diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías comprendidas en la presente invención, como, por ejemplo: cáncer, hipertensión, obesidad y enfermedades metabólicas. Por esto, tanto la SM, como la enzima EC 2.7.8.27 constituyen biomarcadores para la detección de enfermedades humanas, y, como se ha dicho más arriba, son dianas terapéuticas para el diseño de nuevas terapias para humanos.

En un aspecto preferido, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular que

comprende la determinación de un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, donde, de forma preferida, las patologías se seleccionan entre: cáncer preferentemente cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón; patologías vasculares preferentemente hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca o patologías metabólicas; patologías metabólicas preferentemente: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

En otro aspecto preferido, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular que comprende la determinación de un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormalmente alto de SM en la membrana celular, donde, de forma preferida, la patología es fibrosis quística.

El sexto aspecto de la presente invención hace referencia a un kit para ser usado en el método de pronóstico/diagnóstico definido más arriba que comprende medios útiles para la determinación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o del nivel de SM en la membrana celular. Dichos medios útiles comprenden la técnica TLC y HPTLC, cromatografía de gases, análisis de imagen, espectroscopia de absorción o fluorescencia, microscopia óptica, de fluorescencia y microscopia confocal.

El último aspecto de la presente invención hace referencia a un método de aislamiento y purificación de los enantiómeros de 2OHOA de la invención que comprende los siguientes pasos:

1. Esterificación de la mezcla racémica de 2-hidroxiolateo de sodio con una disolución de ácido sulfúrico en etanol, preferentemente al 10%.
2. Hidrólisis enantioselectiva del éster, catalizada por la lipasa de *pseudomonas fluorescens* (Amane Lipase, cas #9001-62-1) a 25 °C.
3. Control del progreso de la reacción mediante cromatografía líquida.
4. Hidrólisis de la mezcla con HCl diluido hasta pH menor de 2.

5. Extracción de los productos en metil-perbutil-éter (MTBE) y lavado de la fase orgánica.
6. Eliminación del disolvente a vacío para obtener un crudo con la mezcla de ácido y éster.
- 5 7. Separación de ácido y éster mediante cristalización del primero.
8. Volver al paso 1) en el caso del ácido y paso 2) en el caso del éster para iniciar el reprocesado de cada una de las fracciones aisladas (ácido y éster) hasta obtener la pureza enantiomérica deseada (95% de exceso enantiomérico, que equivale a un 97,5% del enantiómero deseado y 2.5% del no deseado).

10

La separación y aislamiento de los dos enantiómeros del 2OHOA no es conocida hasta la fecha. Especialmente el aislamiento del enantiómero [-] no había podido llevarse a cabo hasta la fecha debido a su dificultad técnica.

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1.**

- A.** El compuesto 2OHOA induce un aumento significativo en la síntesis de SM en distintas líneas celulares de cáncer de cerebro humano (U118, SF767 y 1321N1), células de cáncer de pulmón humano (A549) y células de leucemia humana (Jurkat), pero no en células no tumorales (células de fibroblastos de pulmón humano MRC5).
- 20 Asimismo, se ha estudiado también el efecto antitumoral sobre éstas y otras líneas tumorales (ver **Tabla 2**). Las células fueron tratadas vehículo (agua con 5% de etanol, Control) o con el compuesto 2OHOA, durante 24 horas a una concentración de 200 μ M. Los valores del eje de ordenadas representan la media $\pm$ ESM (error estándar de la media de un número de experimentos $n = 3-5$) de los niveles de SM (porcentaje sobre fosfolípidos totales), determinados mediante procesos cromatográficos
- 25 (seguidos por determinación espectroscópica e análisis de imagen), como porcentaje respecto de los lípidos totales comparados con los niveles de células sin tratar (control). Los niveles de SM medidos en células tumorales son significativamente inferiores a los de células normales y el compuesto 2OHOA sólo indujo cambios
- 30 significativos en células de cáncer. Estos resultados indican que la enzima EC 2.7.8.27 es una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y un biomarcador para el

seguimiento de la patología y su evolución durante terapias, y que, por otro lado, el compuesto 2OHOA es un activador de esta enzima y revierte los bajos niveles de SM que presentan las células tumorales.

B. Imágenes de microscopia confocal mostrando el marcaje de la SM celular mediante unión de lysenina en células de glioma humano U118 tratadas con vehículo (Control) o con 2OHOA (200 μ M). Se puede apreciar en las células tumorales que la cantidad de SM en la membrana es escasa y que los tratamientos con 2OHOA inducen un aumento dramático en la cantidad de de SM en la membrana, claro indicador de la activación de la enzima EC 2.7.8.27. Este experimento, además, muestra claramente que el aumento en el nivel de SM celular se debe principalmente a una acumulación en la membrana plasmática de las células tumorales.

Figura 2. El compuesto 2OHOA induce un aumento en la síntesis de SM de manera dependiente de su concentración y del tiempo del tratamiento. Los valores del eje de ordenadas representan la media $\pm$ ESM de los niveles de SM (porcentaje sobre fosfolípidos totales) respecto al control sin tratamiento ($n = 3-5$). Los niveles se SM fueron determinados mediante cromatografía en capa fina y análisis de imagen o cromatografía de gases:

A: Células cancerosas U118 de glioma humano tratadas a una concentración de 200 μ M a distintos tiempos (2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas). Las barras blancas corresponden a células tratadas con vehículo (control).

B: Células U118 tratadas durante 24 horas a distintas concentraciones (25-400 μ M).

Figura 3. El compuesto 2OHOA induce un aumento de SM nuclear. Células de cáncer U118 fueron tratadas durante 24 horas con vehículo (control) o con 2OHOA a una concentración 200 μ M. Los valores del eje de ordenadas representan la media $\pm$ ESM ($n = 3-5$) de los niveles de SM respecto al control (100%) sin tratamiento.

Figura 4. El compuesto 2OHOA actúa de forma directa sobre la enzima EC 2.7.8.27. En A, B y C, en todos los casos, se incubaron las células o extractos celulares o medio de incubación con el sustrato fluorescente de este enzima NBD-Cer (nitro-benzoxadiazol-il) ceramida], en presencia o ausencia (control, barras blancas) de

2OHOA (barras negras). A continuación, se extrajeron los lípidos y se determinaron los niveles de formación de NBD-SM por HPTLC. Los valores se presentan en el eje de ordenadas como la media $\pm$ ESM ($n = 3-5$):

5 **A:** Experimento *in vivo* de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27: se incubaron células U118 con NBD-Cer durante 4 horas y luego se trataron con el compuesto 2OHOA (200 μ M) a distintos tiempos (5, 15, 60 minutos y 24 horas). Luego las células se homogenizaron y se midió la metabolización del fluoróforo NBD-Cer para convertirse en NBD-SM.

10 **B:** Experimento *in vitro* de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 en extractos celulares, en los que se midió la actividad del enzima tras matar las células. Este experimento demuestra que el compuesto 2OHOA es capaz de activar la enzima EC 2.7.8.27 mediante interacción directa. Para estos experimentos, los homogenizados celulares se incubaron con el compuesto 2OHOA (200 μ M) y NBD-Cer durante 2 horas.

15 **C:** Efecto del compuesto 2OHOA sobre la actividad de las isoformas 1 y 2 de la enzima EC 2.7.8.27. La activación de las isoformas EC 2.7.8.27 (1) y EC 2.7.8.27 (2) se determinó mediante el ensayo de su actividad en la superficie celular.

Figura 5. Relación estructura-función en la activación de la enzima EC 2.7.8.27. Aumento de SM en células U118 inducido por distintos ácidos grasos (200 μ M, 24 h).
 20 Control, vehículo; 18:1n-9 (ácido octadecenoico); 2Me-18:1n-9 (ácido 2-metiloctadecenoico); 2OH-18:0 (ácido 2-hidroxi octadecanoico); 2OHOA (2OH-18:1n-9, ácido 2-hidroxi octadecenoico); 2OH-18:2n-6 (ácido 2-hidroxi linoleico); 2OH-18:3n-6 (ácido 2-hidroxi- γ -linolenico); 2OH-18:3n-3 (ácido 2-hidroxi- α -linolenico); 2OH-20:4n-6 (ácido 2-hidroxi araquidonico); 2OH-20:5n-3 (ácido 2-
 25 hidroxieicosapentaenoico); 2OH-22:6n-3 (ácido 2-hidroxi docosahexaenoico). Los valores del eje de ordenadas representan la media $\pm$ ESM ($n = 3-5$) de los niveles de SM, determinados mediante cromatografía en capa fina, respecto al control sin tratamiento (100%). Los ácidos grasos de 20 átomos de C o más no producen cambios significativos en la actividad de este enzima. La presencia de otros radicales en el

carbono 2 (como H o CH₃) y la falta de dobles enlaces en la estructura del ácido graso dieron lugar a moléculas inactivas

Figura 6.

A: Se muestran que los cambios en la composición de la membrana celular inducen la translocación de la proteína Ras desde la membrana al citoplasma. Los niveles elevados en membrana del compuesto 2OHOA y SM impiden el anclaje de la proteína Ras en la membrana. La figura muestra imágenes de microscopia óptica de contraste de fases (Ph.C) de células de glioma humano (SF767), y microscopia confocal, usando un anticuerpo específico contra Ras marcado fluorescentemente, tras 10 minutos (confocal 1) y 24 horas (confocal 2) de tratamiento con vehículo (control) o compuesto 2OHOA.

B: La translocación de la proteína Ras impide la inactivación de la proteína Raf, así como la siguiente activación en la cascada de señalización de la proteína MEK, tal y como se observa por la reducción en estado de la forma fosforilada (activa) de ambas proteínas, determinado por inmunoblot en células U118 cultivadas en ausencia (Control) no presencia de 150, 200 o 250 µM de 2OHOA.

C: Finalmente, se produce una reducción dramática en el estado de actividad de la proteína MAP kinasa (ERK1 y ERK2), también determinado mediante inmunoblot con anticuerpos específicos, a las concentraciones de 2OHOA indicadas en B.

D: Los estados de actividad (niveles de forma fosforilada) de Akt y EGFR también decrecen tras incubación con 250 µM de 2OHOA.

En los paneles **B** a **D**, el eje de ordenadas indica el porcentaje de fosfoproteína respecto a las células SF767 sin tratar (control). El eje de abscisas indica la concentración (micromolar) del compuesto 2OHOA.

Figura 7. Especificidad de la acción de los enantiómeros [-] y [+], y de la mezcla racémica +/- de 2OHOA, en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27. La figura muestra los niveles de SM (porcentaje de SM sobre los lípidos totales) en células de glioma U118 tras el tratamiento con la mezcla racémica del ácido 2-hidroxioléico (+/-), con el

compuesto [-]2OHOA y con el compuesto [+]2OHOA. Las células se trataron 24 horas a una concentración de 50 μ M (50) y 100 μ M (100). Los valores del eje de ordenadas representan la media $\pm$ ESM (n= 3-5) de los niveles de SM determinados mediante cromatografía en capa fina como porcentaje respecto a los lípidos totales, comparados con los niveles de células sin tratar (control). Como se puede apreciar, el enantiómero [-] produce incrementos de SM, lo que indica que es un activador de la enzima EC 2.7.8.27, y el enantiómero produce una reducción de los niveles de SM (obvios sobre todo a una concentración de 100 μ M [+]2OHOA), lo que indica que es un inhibidor de esta enzima.

- 10 **Figura 8.** Esta figura muestra el efecto del ácido 2OHOA racémico (+/-) y los isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA sobre diferentes procesos patológicos en modelos animales.

A. Efecto sobre el volumen de tumores derivados de células de cáncer de pulmón humano (A549): se infectaron ratones inmunodeprimidos con células de cáncer de pulmón humano y 7 días después (cuando los tumores eran observables) se comenzaron los tratamientos con vehículo (control), 2OHOA racémico (+/-), y los isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg $\cdot$ día, 15 días, oral). Las barras corresponden a valores de media $\pm$ EEM del incremento en volumen (mm^3) de los tumores (n = 6). El tratamiento con 2OHOA racémico (+/-) indujo reducciones significativas ($P < 0.01$) con respecto al control. El isómero óptico [-]2OHOA indujo reducciones significativas respecto a todos los demás tratamientos ($P < 0.01$).

B. Efecto sobre la presión arterial: se trataron ratas hipertensas (cepa SHR) con 2OHOA racémico (+/-) y sus isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg, cada 12 h, 15 días, oral). Todas las moléculas indujeron reducciones significativas ($P < 0.01$) en la presión arterial sistólica (mmHg, eje de ordenadas, y) de ratas SHR, siendo el isómero [-]2OHOA el más potente en la inducción de efectos hipotensores. Se muestran valores de media $\pm$ EEM de presión sistólica (n = 6).

C. Efecto sobre el peso corporal: se trataron ratas SHR con 2OHOA racémico (+/-) y sus isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg $\cdot$ día, 5 días, oral). Todas las moléculas indujeron reducciones significativas ($P < 0.01$) en el peso de los animales

a partir del tercer día de tratamiento, siendo el isómero [-]2OHOA el más potente en la inducción de reducción de peso corporal. Se muestran valores de media $\pm$ EEM del peso corporal (eje de ordenadas) frente al tiempo de tratamiento en días (eje de abcisas, $n = 6$).

- 5 **D.** Efecto sobre los niveles de colesterol y triglicéridos: se trataron ratas SHR con 2OHOA racémico (+/-) y sus isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg, 12h, 15 días, oral). Todas las moléculas indujeron reducciones significativas ($P < 0.01$) en los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol total (CHOt), siendo el isómero óptico [-]2OHOA el más potente en la inducción de reducciones en los niveles de estos
- 10 lípidos. Se muestran valores de media $\pm$ EEM de los niveles séricos de lípidos expresados en mg/dl (eje de ordenadas; $n = 6$).

Figura 9. Regulación de la actividad de la enzima 2.3.1.50. El eje de ordenadas (y) muestra los niveles de incorporación de [3 H]palmitato (dpm/mg proteína) en diferentes fracciones lipídicas de células U118 incubadas en ausencia (Control, barras blancas) o presencia de 2OHOA (barras negras). Sólo se encontró un incremento

15 significativo de radiactividad en las fracciones de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer), lo que claramente indica la activación selectiva de la EC 2.7.8.27 y de la enzima 2.3.1.50.

Figura 10. Regulación de la actividad de la enzima 1.14.19.1. El eje de ordenadas (Y) muestra los niveles de incorporación de [3 H]oleato (dpm/mg proteína) en membranas de células U118 incubadas en ausencia (Control, barra blanca) o presencia de 2OHOA (barra negra). La reducción en incorporación de oleico tritiado en los lípidos de

20 membranas de células incubadas en presencia de 2OHOA demuestra la inhibición de la enzima 1.14.19.1.

25 **Descripción detallada de la invención**

A continuación se exponen los ejemplos que ilustran las realizaciones detalladas y preferidas de la invención, sin limitar el alcance de protección de la misma.

Ejemplo 1. Metodología para la obtención de los enantiómeros [+] y [-] de los compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos.

Procedimiento

- En un reactor de 1 L se introducen 100 g de la sal de sodio de 2OHOA y se adicionan
- 5 500 mL de ácido sulfúrico en etanol (10% peso). La mezcla se refluje durante 16 h y se comprueba por TLC que la conversión es completa. Al finalizar la reacción, se neutraliza con bicarbonato de sodio saturado y se concentra a vacío para eliminar el etanol. Sobre la emulsión acuosa se añaden 250 mL de AcOEt (acetato de etilo) para extraer el 2-hidroxioleato de etilo, se seca sobre sulfato y se concentra a sequedad.
- 10 En un reactor de 1 L con agitación mecánica se disuelven 100 g de 2-hidroxioleato de etilo (mezcla racémica) en 50 mL de MTBE. Sobre la disolución se añaden 267 mL de tampón fosfato (1 M, pH 7) y 1.3 g de lipasa AK derivada de *pseudomonas*. La emulsión se agita a temperatura ambiente (25°C) hasta alcanzar el 50% de conversión (HPLC, Luna C8, 5µm, MeOH/agua/HCOOH). La reacción se detiene mediante
- 15 hidrólisis con HCl 3N hasta alcanzar pH ácido (menor de 2), se extrae con MTBE y se lava con salmuera hasta que el pH de las aguas es mayor o igual a 5. El crudo se purifica por cristalización para separar la fracción de ácido hidrolizada (60% de exceso enantiomérico) y la de éster sin hidrolizar (75% de exceso enantiomérico).
- Cada fracción requiere de dos reprocesados, repitiendo el procedimiento de
- 20 esterificación/hidrólisis por separado, hasta alcanzar un ee $\geq 95\%$ para cada enantiómero, que se hidroliza y transforma en la sal de sodio final. El rendimiento final del proceso es del 40-50% (20-25% de cada enantiómero).

Metodología empleada

- Las condiciones descritas para la resolución cinética son las mejores obtenidas en el
- 25 proceso de optimización, después de estudiar dos lipasas (una derivada de *Pseudomonas* y otra de *Candida Antarctica*), disolventes (acuosos, orgánicos o bifásicos), temperaturas, fuerza iónica, agitación, pH y dilución. También se ha determinado la forma más adecuada de seguir la reacción de hidrólisis y la purificación de los productos. Por ello, el método para obtener LP181A1 quiral es

distinto de cualquiera de los que se puede encontrar en la bibliografía, la mayoría de los cuales requieren altas diluciones y purificaciones por cromatografía.

Escalado del proceso

5 El método se ha llevado a cabo a escalas de 1-150 g obteniendo resultados similares y reproducibles. Los enantiómeros pueden separarse por cristalización, lo que facilita el proceso a escala de kilos. La pérdida de rendimiento se debe a la manipulación y procesos de workup, sin embargo, no se generan impurezas nuevas y las aguas de lavado y cristalización podrían juntarse y reprocesarse nuevamente.

Ejemplo 2. Las células tumorales tienen niveles más bajos de SM en sus 10 **membranas.**

Se midieron los niveles de SM, cultivadas en ausencia (control) o presencia de 200 μM de [-]2OHOA, en las membranas de células normales (MRC-5 e IMR90) y de células tumorales de varias clases (ver **Tabla 2**). En todos los casos, se detectó que las membranas de células tumorales contienen niveles de SM en torno a la mitad o un
15 tercio de los niveles que presentan las células normales (**Figura 1**). Por ello, se puede asegurar que la concentración de SM es un biomarcador que indica la tumorigenicidad de células humanas. Así, en la presente invención se ha generado un método de diagnóstico para la detección de los procesos patológicos descritos y patologías en las que se alteren los niveles de SM, así como para el seguimiento de la eficacia de la
20 terapia aplicada. A partir de este conocimiento, la presente invención también incluye kits de diagnóstico de estas enfermedades.

Tabla 2. Efecto del [-]2OHOA en los niveles de esfingomielina.

Línea Celular	Tipo de Cáncer	% SM antes del tratamiento	% SM tras el tratamiento	Efecto¹	Técⁿ2
T98G	Glioma (humano)	5	19	+	4
A172	Glioma (humano)	8	23	+	4
U118	Glioma (humano)	10	28	+	1,2,3,4,5
SF767	Glioma (humano)	5	24	+	1,2,3
U87	Glioma (humano)	11	21	+	5
SF268	Glioma (humano)	12	26	+	5
1321N1	Glioma (humano)	12	27	+	1
C-6	Glioma (rata)	10	20	+	5
SH-SY5Y	Neuroblastoma (humano)	14	22	+	5
A549	Cáncer pulmón (humano)	12	33	+	1,2,3
Jurkat	Leucemia (humano)	12	27	+	1
U937	Linfoma (humano)	12	24	+	5
HepG2	Cáncer hígado (humano)	14	35	+	4
MDA-MB-231	Cáncer de mama (humano)	13	31	+	1
PC3	Cáncer próstata (humano)	12	27	+	1
BXPC3	Cáncer de páncreas (humano)	13	26	+	4
HeLa	Cáncer de útero (humano)	9	21	+	4
HT29	Cáncer de colon (humano)	11	21	+	5
IMR90	Fibroblasto no tumoral (humano)	21	23	-	1
MRC-5	Fibroblasto no tumoral (humano)	20	24	-	1

(1) Efecto antiproliferativo: + inhibición crecimiento celular,- ausencia de efecto.

(2) Técnica utilizada para el análisis: 1) TLC ó HTPLC, 2) cromatografía de gases, 3) análisis de imagen, 4) espectroscopia de fluorescencia, 5) microscopio confocal o de fluorescencia.

Ejemplo 3. El 2OHOA eleva los niveles de SM mediante la activación de la enzima EC 2.7.8.27.

El 2OHOA eleva los niveles de SM en células tumorales tratadas como se indicó anteriormente. Los incrementos de SM en las células tumorales tratadas con 2OHOA
 5 fueron dependientes del tiempo de tratamiento y la concentración empleada en los mismos (**Figura 2**), lo cual demuestra la especificidad de esta molécula. La SM es un lípido de membrana que impide la unión de ciertas moléculas implicadas en la proliferación celular, como la proteína Ras. En este sentido, se midieron los niveles de Ras mediante microscopía confocal, empleando un anticuerpo marcado con
 10 fluorescencia, y se pudo detectar que el marcaje pasaba de la membrana (**Figura 6**: 95-99% de la fluorescencia total detectada en membranas antes del tratamiento) al citoplasma (94-97% de la fluorescencia detectada en el interior celular tras tratamiento con 2OHOA) en células de glioma humano, de cáncer de pulmón y de leucemia. La translocación de Ras de la membrana al citoplasma supone la ausencia de
 15 interacciones productivas entre Ras y los Receptor-Tirosina-Kinasa (RTK) o entre Ras y Raf, por lo que las proteínas de la vía de las MAP kinasa no reciben activación y las células tumorales dejan de proliferar y comienzan los programas de muerte celular.

Otro efecto asociado a la reducción de proliferación celular es el aumento de los niveles de SM nuclear. Los tratamientos con 2OHOA dieron lugar aumentos en los
 20 niveles de SM nuclear (**Figura 3**), lo que demuestra que se induce la inhibición de la proliferación celular.

Ejemplo 4. La regulación de la enzima EC 2.7.8.27 depende de la estructura molecular del ácido graso.

Los estudios *in vitro*, usando el sustrato específico fluorescente de la enzima EC
 25 2.7.8.27, NBD-Cer, indican que 2OHOA interacciona directamente con éste, viéndose la activación enzimática desde los primeros minutos de incubación en los cultivos de células (**Figura 4A**). La rapidez de este fenómeno indica claramente la interacción directa y eficaz entre el enantiómero 2OHOA y la enzima EC 2.7.8.27. Por ello, la presente invención hace referencia al uso de los compuestos anteriormente citados

como activadores (enantiómero [-]), o inhibidores (enantiómero [+]) específicos de la enzima EC 2.7.8.27.

Por otro lado, la activación de la enzima EC 2.7.8.27 depende del número de átomos de carbono que tiene el ácido graso, de forma que los ácidos grasos de más de 20 átomos de C no producen cambios significativos en la actividad de este enzima (**Figura 5**). Además, otros requisitos para la activación de la enzima EC 2.7.8.27 son la presencia de un grupo OH en el carbono 2 y uno o más dobles enlaces, ya que la presencia de otros radicales (como H o CH₃) y la falta de dobles enlaces en la estructura del ácido graso dieron lugar a moléculas inactivas (**Figura 5**). La SM tiene una estructura molecular que determina los efectos producidos sobre la fisiología celular y que justifica la reversión de diferentes procesos patológicos. Su cabeza polar voluminosa impide el anclaje de Ras a la membrana mediante su resto isoprenilo (que prefiere regiones de membrana con fosfolípidos de cabeza polar pequeña, como la fosfatidiletanolamina), lo que a su vez impide la señalización posterior a través de las proteínas de la cadena de las MAP kinasas. La inactivación de esta vía induce, entre otros fenómenos, la parada en la proliferación de células tumorales (**Figura 8A y Tabla 2**).

Ejemplo 5. Los isómeros [-] de ácidos grasos C18, como [-]2OHOA, son activadores específicos de la enzima EC 2.7.8.27.

La conformación estructural relativa de los grupos hidroxilo de los carbonos 1 y 2 (C1 y C2) da lugar a dos enantiómeros o isómeros ópticos que se denominan [-] y [+]. Mediante el proceso descrito en la presente invención (**Ejemplo 1**), se han sintetizado y aislado dichos isómeros y se ha medido su capacidad de activar la enzima EC 2.7.8.27. La **Figura 7** muestra la activación de dicho enzima, medida a través de los niveles de SM en membranas de células de glioma humano U118, tras 24 horas de incubación en presencia de 50 y 100 mM de cada uno de los isómeros, así como de la mezcla racémica (que contiene aproximadamente la misma cantidad de cada uno de ellos). La **Figura 7** muestra cómo el 2OHOA racémico produce incrementos significativos en los niveles de SM en membranas de células U118. Asimismo, el isómero óptico [-]2OHOA es capaz de producir incrementos aún mayores en los niveles de SM. Por el contrario, el isómero óptico [+]2OHOA no sólo no induce

aumentos de SM, sino que produce una reducción en los niveles de SM en membranas. Estos datos indican que el isómero óptico [-]2OHOA es un activador específico de la enzima EC 2.7.8.27 y que el isómero óptico [+]2OHOA es un inhibidor específico de este enzima. Por ello, la presente invención protege el uso para
 5 aplicaciones terapéuticas del isómero óptico [-]2OHOA como activador de la enzima EC 2.7.8.27 y del isómero óptico [+]2OHOA como inhibidor específico de este enzima.

Ejemplo 6. Los isómeros [-] de ácidos grasos C18, como [-]2OHOA, usados como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas.

10 El enantiómero [-]2OHOA y derivados mostrados en esta invención tienen aplicaciones terapéuticas en diferentes ámbitos, como el tratamiento del cáncer, la obesidad, las patologías cardiovasculares, la diabetes, el síndrome metabólico, la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, la lesión medular, la enfermedad de Alzheimer y otros procesos. Por ello, se estudiaron los efectos terapéuticos de cada
 15 uno de los isómeros, así como de la mezcla racémica, en diferentes modelos patológicos.

La **Figura 8A** muestra el efecto de tratamientos orales (15 días, 600 mg/kg diarios, n = 6) con el 2OHOA racémico, y de los enantiómeros [-]2OHOA y [+]2OHOA, sobre el volumen de tumores derivados de cáncer de pulmón humano (células A549) en
 20 ratones desnudos. Como se puede apreciar, el efecto del isómero óptico [-]2OHOA es superior al del racémico. Por otro lado, tras tratamientos de 15 días con el isómero óptico [+]2OHOA no se produjeron cambios significativos en el volumen de los tumores. Este resultado demuestra que el isómero [-]2OHOA es el que activa la enzima EC 2.7.8.27 y el que tiene actividad terapéutica antitumoral. Por otro lado, se
 25 investigó la actividad antitumoral de estos compuestos en diferentes líneas de cáncer humano (ver **Tabla 2**).

Además, se estudió el efecto de los isómeros arriba indicados sobre la presión arterial, el peso corporal y los niveles de triglicéridos y colesterol en ratas SHR (**Figura 8B, 8C y 8D**). De forma análoga a lo indicado anteriormente, se produjo un efecto
 30 terapéutico mayor cuando se utilizó el isómero [-]2OHOA. Así, los animales tratados

con el isómero [-]2OHOA durante 3 días redujeron en 53 mm Hg su presión sistólica, mientras que los tratados con el isómero [+]2OHOA redujeron su presión sistólica en 33 mm Hg (los animales tratados con el compuesto racémico redujeron la presión en 44 mm Hg). De forma similar, entre los días 1 y 5 de tratamiento, las ratas tratadas con el racémico perdieron 11 gramos de peso (aproximadamente un 3% del peso corporal), en tanto que los animales del grupo tratado con el enantiómero [-]2OHOA perdieron 21 gramos y los animales del grupo tratado con el enantiómero [+]2OHOA sólo perdieron 7 gramos de peso. Finalmente, también se observó un efecto superior del enantiómero [-]2OHOA en la reducción de los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol total (CHOt) (**Figura 8D**). En este sentido, los niveles basales plasmáticos de TG en ratas SHR son de 108 mg/dl, y se redujeron hasta 56 mg/dl tras tratamientos de 2 semanas con enantiómero [-]2OHOA. Por otro lado, el tratamiento con el enantiómero [-]2OHOA indujo una reducción de los niveles de TG plasmáticos hasta 47 mg/dl, mientras que el enantiómero [+]2OHOA sólo produjo una disminución modesta hasta 81 mg/dl. De forma paralela, los niveles de CHOt se redujeron desde 73 mg/dl hasta 43 mg/dl (racémico), 36 mg/dl (enantiómero [-]2OHOA) y 59 mg/ml (enantiómero [+]2OHOA), respectivamente.

Por todo ello, esta invención evidencia que los isómeros ópticos [-] de hidroxiácidos grasos insaturados de 18 átomos de C son las moléculas más eficaces con actividad terapéutica para el tratamiento de las patologías arriba indicadas.

Ejemplo 7. Eficacia, toxicidad y efectos secundarios de los enantiómeros de la invención.

Este ejemplo refleja el estudio realizado en ratones inmunodeprimidos infectados con células de glioma humano (SF767) y tratados durante 15 días (oral) con las dosis indicadas (**Tabla 3**). Dicha tabla muestra el volumen de los tumores al final del tratamiento y los síntomas observados durante los días que duró el mismo. Nótese, una vez más, que la eficacia del enantiómero [-]2OHOA es superior a la del compuesto racémico 2OHOA, y que el enantiómero [+]2OHOA no mostró actividad tras 15 días de tratamiento a las dosis indicadas.

- Por otro lado, la dosis que indujo reducciones de aproximadamente un tercio del volumen de los tumores, no indujo ningún efecto secundario en animales tratados con [-]2OHOA (50 mg/kg), mientras que los animales tratados con el compuesto racémico 2OHOA a una dosis que indujo reducciones similares en el volumen de los tumores (600 mg/kg) mostraron importantes efectos secundarios (**Tabla 3**). Además, a 200 mg/kg, el enantiómero [-]2OHOA indujo reducciones del volumen del tumor de un 89% sin efectos adversos observables, mientras que a la misma dosis, el compuesto racémico sólo indujo reducciones del 23% en el volumen de los tumores y algunos de los animales presentaron efectos adversos en respuesta al tratamiento.
- De estos resultados se deduce que el enantiómero [-]2OHOA tiene una mayor potencia y que a las dosis terapéuticas máximas no produce efectos adversos, mientras que el compuesto racémico tiene un efecto más modesto e induce ciertos efectos no deseados a dosis terapéuticas. En el tratamiento de procesos tumorales, las diferencias en eficacia entre el enantiómero [-]2OHOA y el racémico pueden suponer diferencias de meses o años en la esperanza de vida de los pacientes. Es más, las diferencias en eficacia se pueden traducir en la curación o no de un determinado cáncer en un paciente. Por otro lado, las diferencias en toxicidad a dosis terapéuticas se pueden traducir en una mayor calidad de vida en los pacientes que reciben la forma enantiomérica [-]2OHOA. Dado que el mecanismo de acción del compuesto está relacionado con la actividad sobre el enzima EC 2.7.8.27 y que los enantiómeros [-] y [+] tienen un efecto contrapuesto sobre dicha enzima (**Figura 7**), la administración del compuesto racémico supone la presencia de una forma molecular que tiene un efecto opuesto al principio activo ([-]2OHOA), revirtiendo parte del efecto terapéutico que tiene el último.

Tabla 3

Dosis mg/k g	2OHOA		[-]2OHOA		[+]2OHOA	
	Efecto ¹	Toxicidad ²	Efecto ¹	Toxicidad ²	Efecto ¹	Toxicidad ²
50	+2%	No	-35%	No	-2%	No
75	-7%	No	-54%	No	+7%	No
100	-8%	No	-65%	No	-3%	No
150	-17%	No	-78%	No	+1%	No
200	-23%	Diarrea 16% Comportamiento 16%	-89%	No	-4%	Diarrea 16% Comportamiento 16%
400	-39%	Diarrea 32% Comportamiento 16%	-91%	Diarrea 16% Comportamiento o 16%	-2%	Diarrea 16% Comportamiento 32%
600	-37%	Diarrea 50% Comportamiento 50%	-86%	Diarrea 32% Comportamiento o 50%	+3%	Diarrea 66% Comportamiento 50%

1. Variación del tamaño del tumor tras **15 días de tratamiento** (oral) a la dosis indicada respecto a los animales no tratados (n = 6 en todos los grupos).

- 5 2. Síntomas registrados y porcentaje de animales en los que se ha observado. Los síntomas en comportamiento incluyen reducción de la movilidad durante al menos 30 minutos, pelo erizado, saltos (jumping), o confinamiento en una esquina de la jaula.

10 **Ejemplo 8. Regulación de los compuestos de la invención sobre la actividad de la enzima EC 2.3.1.50.**

Se incubaron células de glioma humano U118 en presencia o ausencia (control) de 2OHOA (200 μ M, 24 h) y luego se incubaron con [³H]palmitato durante 5 minutos. Tras dichos períodos de incubación, los lípidos celulares se extrajeron y se separaron mediante TLC. Las bandas correspondientes a cada especie lipídica se extrajeron y la cantidad de palmitato radiactivo incorporado se midió mediante centelleo líquido. Como se puede apreciar, no sólo hubo una incorporación importante en la fracción de SM (indicador de la activación de la EC 2.7.8.27), sino también en la fracción de ceramida, lo que demuestra la activación de la enzima EC 2.3.1.50 (serín-palmitoil transferasa). Por todo ello, se puede concluir que el 2OHOA es un activador específico de la enzima EC 2.3.1.50 (**Figura 9**).

Ejemplo 9. Regulación de los compuestos de la invención sobre la actividad de la enzima EC 1.14.19.1.

El ácido oleico es sintetizado a partir del ácido esteárico mediante la actividad del enzima estearoil-CoA desaturasa (EC 1.14.19.1). Este enzima es crucial en el metabolismo lipídico, ya que es limitante en la síntesis de ácidos grasos. Para estudiar si esta reducción se debía a la regulación de la EC 1.14.19.1, se incubaron células U118 en presencia o ausencia de 2OHOA (200 μ M, 24 h) y, posteriormente, en presencia de [3 H]oleato (5 minutos). Se pudo constatar que la incorporación de ácido oleico radiactivo en membranas de células U118 incubadas en presencia de 2OHOA era significativamente menor que en las células control (**Figura 10**). Este resultado indica que el 2OHOA es un potente inhibidor de la EC 1.14.19.1, cuya regulación se ha sugerido que puede ser importante en el tratamiento de diferentes patologías humanas.

REFERENCIAS

1. Albi, E. y M. V. Magni (1999). Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS Lett* **460**: 369-72.
2. Alemany R, Terés S, Baamonde C, Benet M, Vögler O, Escribá PV. (2004) 2-hydroxyoleic acid: a new hypotensive molecule. *Hypertension*. **43**: 249-54.
3. Alemany R, Perona JS, Sánchez-Domínguez JM, Montero E, Cañizares J, Brezan R, Escribá PV y Ruiz-Gutiérrez V (2007) G protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. *BBA Biomembr.* **1768**:964-975.
- 10 4. Buda C, Dey I, Balogh N, Horvath LI, Maderspach K, Juhasz M, Yeo YK, Farkas T (1994) Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**:8234-8238.
5. Escriba PV, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. (1995) Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:7595-7599.
- 15 6. Escriba PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas T, García-Sevilla JA (1997) Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:11375-11380.
- 20 7. Escribá PV (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **12**:34-43
8. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquets X, Horváth I, Barceló-Coblijn G (2008) Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell. Mol. Med.* **12**:829-875.
- 25 9. Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fife A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T. (2006) Docosahexanoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem.* **96**:385-95.
- 30

10. Huitema, K., et al. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J* **23**:33-44.
11. Jackson CL, Schwartz SM (1992) Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension* **20**: 713-716.
- 5 12. Jiang Q, et al. (2011). Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.26054.
13. Jung UJ, Torrejon C, Tighe AP, Deckelbaum RJ. (2008). N-3 Fatty acids and cardiovascular disease mechanisms underlying beneficial effects. *Am J Clin Nutr*.
10 **87**:2003S-2009S.
14. Lane RM, Farlow MR.(2005) Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 46: 949-968.
15. Lladó V, Gutierrez A, Martínez J, et al. Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J. Cell Mol Med*. 2010; 13: 1-12.
- 15 16. Martínez J, O, Casas J, F, Alemany R, Prades J, Nagy T, Baamonde C, Kasprzyk P, Terés S, Saus C, Escribá PV. (2005) Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of minerval. *Mol Pharmacol* 67:531-40.
17. Perona JS, Vögler O, Sánchez-Domínguez JM, Montero E, Escribá PV y Ruiz-Gutierrez EV (2007) Consumption of virgin olive oil influences membrane lipid composition and regulates intracellular signaling in elderly adults with type 2 diabetes mellitus. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62: 256-263.
20
18. Sagin FG, Sozmen EY (2008) Lipids as key players in Alzheimer disease: alterations in metabolism and genetics. *Curr Alzheimer Res* 5:4-14.
- 25 19. Simons, K. y D. Toomre (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-9.
20. Slomiany A, Murty VL, Aono M, Snyder CE, Herp A y Slomiany BL (1982) Lipid composition of tracheobronchial secretions from normal individuals and patients with cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. **10**:106-111.

21. Stender S, Dyerberg J (2004) Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.* **48**:61-66.
22. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. (1985). Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* **58**:427-444.
- 5 23. Tafesse, F. G., P. Ternes, et al. (2006). The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* **281**(: 29421-5.
24. Trombetta A, Maggiora M, Martinasso G, Cotogni P, Canuto RA, Muzio G. (2007). Arachidonic and docosahexanoic acids reduce the growth of A549 human lung tumor cells increasing lípido peroxidation and PPARs. *Chem Biol Interact.*
10 **165**:239-50.
25. Van Helvoort, A., W. van't Hof, et al. (1994). Conversion of diacylglycerol to phosphatidylcholine on the basolateral surface of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. Evidence for the reverse action of a sphingomyelin synthase. *J Biol Chem* **269**: 1763-9.
- 15 26. Vögler O, Casas J, Capó D, Nagy T, Borchert G, Martorell G y Escribá PV. (2004) The G betagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures. *J Biol Chem.* **279**:36540-36545.
27. Vögler O, López-Bellan A, Alemany R, Tofé S, González M, Quevedo J, Pereg V, Barceló F y Escribá PV.(2008) Structure-effect relation of C18 long-chain fatty
20 acids in the reduction of body weight in rats. *Int J Obes.* **32**: 464-473.
28. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Litchman AH (2007) Combination of Rimonabant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1805-1812.
29. Yang, Q, Alemany, R, Casas, J, Kitajka, K, Lanier, SM, Escribá PV (2005)
25 Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 68:210-7.

REIVINDICACIONES

1. Enantiómero [-] o [+] de un compuesto de Fórmula I:



(I)

caracterizado porque a , b y c pueden tomar valores independientes entre 0 y 6, con la condición de que el número total de carbonos sea ≤ 20 .

2. Enantiómero, según la reivindicación 1, resultante de la selección de al menos una de las siguientes combinaciones de valores a , b y c :

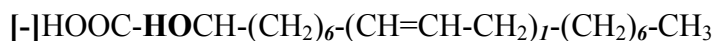
$$a=6, b=1 \text{ y } c=6$$

$$a=6, b=2 \text{ y } c=3$$

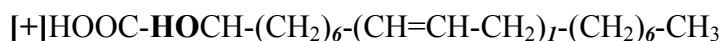
$$a=6, b=3 \text{ y } c=0$$

$$a=3, b=3 \text{ y } c=3$$

3. Enantiómero, según la reivindicación 2, caracterizado por la fórmula:



4. Enantiómero, según la reivindicación 2, caracterizado por la fórmula:



5. Enantiómero, según las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por ser una sal de sodio.

6. Composición farmacéutica que comprende al menos un enantiómero de las reivindicaciones 1 a 5 y, opcionalmente, cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Uso de al menos un enantiómero de la reivindicación 1 para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional de la membrana celular, debida a la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y del nivel de esfingomielina.

8. Uso del enantiómero de fórmula $[-]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_l-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$, según la reivindicación 7, para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional en la membrana celular debida a un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente bajo de esfingomielina.
9. Uso, según la reivindicación 8, caracterizado porque la patología se selecciona entre: cáncer, preferentemente, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro o cáncer de pulmón.
10. Uso, según la reivindicación 8, caracterizado porque la patología se selecciona entre: patologías vasculares, preferentemente, hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; o patologías metabólicas, preferentemente, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.
11. Uso del enantiómero de fórmula $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_l-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$, según la reivindicación 7, para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional en la membrana celular debida a un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente elevado de esfingomielina.
12. Uso, según la reivindicación 11, caracterizado porque la patología es la fibrosis quística.
13. Método *in vitro* para la selección de compuestos candidatos útiles en el tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional de los lípidos localizados en la membrana celular que comprende la evaluación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o del nivel de esfingomielina en presencia de dicho compuesto candidato.

14. Método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional de los lípidos localizados en la membrana celular caracterizado porque comprende la determinación de la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormal de esfingomielinea en una muestra biológica del individuo.
5
15. Método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional de los lípidos localizados en la membrana celular, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende la determinación de un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormalmente bajo de esfingomielinea en una muestra biológica del individuo.
10
16. Método *in vitro*, según la reivindicación 15, donde las patologías se seleccionan entre: cáncer, preferentemente, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro o cáncer de pulmón.
15
17. Método *in vitro*, según la reivindicación 15, donde las patologías se seleccionan entre: patologías vasculares, preferentemente, hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; o patologías metabólicas, preferentemente, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólica u obesidad.
20
18. Método *in vitro* para el pronóstico/diagnóstico de patologías cuya etiología común sea la alteración estructural y/o funcional de los lípidos localizados en la membrana celular, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende la determinación de un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormalmente alto de esfingomielinea en una muestra biológica del individuo.
25
19. Método *in vitro*, según la reivindicación 18, donde la patología es la fibrosis quística.
30

20. Kit para ser usado en el método de pronóstico/diagnóstico de las reivindicaciones 13 a 19 que comprende medios útiles para la determinación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 o del nivel de esfingomielina en la membrana celular.
- 5
21. Kit, según la reivindicación 20, caracterizado porque el pronóstico/diagnóstico se lleva a cabo a través de la cuantificación directa de esfingomielina, de sus precursores, de sus derivados o a través de la medición indirecta del lípido.
- 10
22. Kit, según la reivindicación 21, donde el precursor es la ceramida, el derivado es NBD-CCer o NBD-SM y la medición indirecta se hace a través de la lisenina.
- 15
23. Kit, según la reivindicación 20, donde los medios útiles comprenden: técnica TLC y HPTLC, cromatografía de gases, análisis de imagen, espectroscopia de absorción o de fluorescencia, microscopia óptica de fluorescencia o de contraste de fases, microscopia confocal e inmunoblot o reacción en cadena de la polimerasa.
- 20
24. Método de aislamiento y purificación los enantiómeros de la reivindicación 1 que comprende:
- 25
- a) Esterificación de la mezcla racémica de 2-hidroxiolateo de sodio con una disolución de ácido sulfúrico en etanol, preferentemente al 10%.
 - b) Hidrólisis enantioselectiva del éster, catalizada por la lipasa de *pseudomonas*, preferentemente a 25°C.
 - c) Control del progreso de la reacción preferentemente mediante cromatografía líquida.
 - d) Hidrólisis de la mezcla con HCl diluido hasta pH menor de 2.
 - e) Extracción de los productos y lavado de la fase orgánica.
 - f) Eliminación del disolvente a vacío para obtener un crudo con la mezcla de ácido y éster.
 - 30
 - g) Separación de ácido y éster preferentemente mediante cristalización del primero.

- h) Volver al paso a) en el caso del ácido y paso b) en el caso del éster para iniciar el reprocesado de cada una de las fracciones aisladas (ácido y éster) hasta obtener la pureza enantiomérica deseada.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131622

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos REGISTRY, CAS (Chemical Abstracts Service) en STN. Compuestos con Registry Number 214204-40-7 (fecha de entrada en CAS 12.11.1998) y 182370-45-2 (fecha de entrada en CAS 29.10.1996).	1-5
X	ES 2345241 A1 (LIPOPHARMA) 17.09.2010, todo el documento.	6-19
X	ES 2342927 A1 (UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS) 20.07.2010, todo el documento.	6-19
X	Diario El Mundo Baleares, 21.04.2009 sección Investigación & Recuperado de Internet http://www.wlmundo.es/elmundo/baleares.html ; todo el documento.	6-19
X	W ADAM et al., European Journal Organic Chemistry 1998, páginas 2013-2018. "Synthesis of optically activa alfa-hydroxy acids by kinetic resolution through lipase-catalyzed enantioselective acetylation", todo el documento.	24

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
17.10.2012

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C59/42 (2006.01)

C07C51/493 (2006.01)

A61K31/201 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, REGISTRY, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 20-23,24	SI
	Reivindicaciones 1-19	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 20-23	SI
	Reivindicaciones 1-19,24	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos REGISTRY, CAS (Chemical Abstracts Service) en STN. Compuestos con Registry Number 214204-40-7 (fecha de entrada en CAS 12.11.1998) y 182370-45-2 (fecha de entrada en CAS 29.10.1996)	
D02	ES 2345241 A1 (LIPOPHARMA)	17.09.2010
D03	ES 2342927 A1 (UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS)	20.07.2010
D04	Diario El Mundo Baleares, 21.04.2009 sección Investigación & Recuperado de Internet http://www.elmundo.es/elmundo/baleares.html ; todo el documento.	21.04.2009
D05	W ADAM et al., European Journal Organic Chemistry 1998, páginas 2013-2018. "Synthesis of optically active alpha-hydroxy acids by kinetic resolution through lipase-catalyzed enantioselective acetylation", todo el documento.	1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a los enantiómeros de los compuestos de fórmula (I) de la reivindicación 1, al procedimiento para su aislamiento y purificación que comprende la hidrólisis enantioselectiva de los ésteres correspondientes catalizada por una lipasa y posterior separación por cristalización (reivindicación 24) y al uso (reivindicaciones 6-12) de los enantiómeros de fórmula (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de patologías debidas a un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente bajo de esfingomielina (cáncer, patologías vasculares...). También se reivindica un método in vitro (reivindicaciones 13-19) para evaluar la actividad de la enzima y/o el nivel de esfingomielina en una muestra biológica y el kit para ser usado en el método anterior por cuantificación directa de la esfingomielina (reivindicaciones 20-23).

++

El documento D1 divulga el ácido (R)-2-hidroxioleico, por tanto anula la novedad de las reivindicaciones 1-5 de la solicitud ya que está incluido en la fórmula (I) de la reivindicación 1. El documento D5 divulga el uso de lipasas para la resolución de los enantiómeros de 2-hidroxiácidos por acetilación enantioselectiva catalizada por una lipasa, este es el método que se utiliza en la solicitud (reivindicación 24) para obtener los enantiómeros de los compuestos de fórmula (I) de la reivindicación 1; si bien no se ha encontrado divulgado este método para la resolución de los 2-hidroxiácidos de la reivindicación 1 de la solicitud, la reivindicación 24 no se considera inventiva, pues se trata de un procedimiento de uso común en síntesis orgánica y al alcance de un técnico en la materia.

Los documentos D2, D3 y D4 divulgan el uso de los derivados alfa-hidroxi de ácidos grasos mono y poliinsaturados como medicamentos útiles para preparar composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de patologías debidas a un déficit de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o a niveles bajos de esfingomielina, tales como patologías vasculares, cáncer..., el hecho de que esta actividad se describa para los enantiómeros no supone novedad para las reivindicaciones 6-12 puesto que se encuentra divulgada para los compuestos y por tanto es obvio que los enantiómeros, o al menos uno de ellos, presentarán esta actividad. Tampoco se considera inventivo el método in vitro de las reivindicaciones 13-19 para determinar el déficit en la actividad de la enzima citada y/o los niveles de esfingomielina pues es práctica común determinar los niveles de muestras biológicas para concluir si hay alteración de los niveles usuales de un compuesto (enzima, hormona,...) y confirmar la existencia de una patología.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica un kit como se describe en las reivindicaciones 20-23 de la solicitud, por lo que estas reivindicaciones se consideran nuevas e inventivas.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 20-23 son nuevas e inventivas, las reivindicaciones 1-19 no tienen novedad y la reivindicación 24 carece de actividad inventiva, según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.