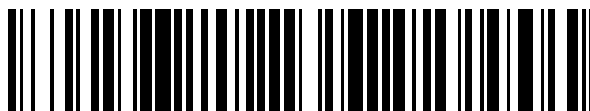


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 675**

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

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2012 PCT/ES2012/070697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 12838506 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2774910**

54 Título: **Enantiómeros de 2-hidroxiderivados de ácidos grasos**

30 Prioridad:

07.10.2011 ES 201131622

14.03.2012 US 201261610762 P

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

08.02.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (100.0%)

Campus Universitario,

Ctra. de Valldemossa Km 7,5

07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES

72 Inventor/es:

ESCRIBÁ RUIZ, PABLO VICENTE;

MARTÍN, MARÍA LAURA;

NOGUERA SALVÀ, MARÍA ANTÒNIA;

BUSQUETS XAUBET, XAVIER;

LÓPEZ JIMÉNEZ, DAVID;

IBARGUREN AIZPITARTE, MAITANE;

SOTO SALVADOR, JOSÉ JAVIER y

YUS ASTIZ, MIGUEL

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 653 675 T3

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

DESCRIPCIÓN

Enantiómeros de 2-hidroxiderivados de ácidos grasos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un método de síntesis de productos racémicos y la separación de sus isómeros ópticos [-] (que se corresponde con el enantiómero S) y [+] (que se corresponde con el enantiómero R) 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) en 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 la membrana puede inducir la reversión del estado patológico. El efecto terapéutico se consigue, preferentemente, a través de la regulación (activación o inhibición) de la actividad de la ceramida: fosfolina colinfosfotransferasa (EC 2.7.8.27, *IUBMB Enzyme Nomenclature*), o del nivel de su producto, la esfingomielina (SM). Como resultado de la actividad de esta enzima y de la producción de SM y su acumulación en la membrana, en la célula tumoral, se produce un aumento (hasta un 600% de incremento) de la proteína fibrilar ácida de la glía (PFAG) y una reducción (de hasta más del 90%) en los niveles de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Tanto PFAG como DHFR pueden, por lo tanto, ser utilizadas para la detección de la eficacia terapéutica de fármacos para el tratamiento de enfermedades mediadas por la actividad de la esfingomielina sintasa o de la propia SM. La presente invención también hace referencia a la elaboración de un kit que se base en la detección de dichas enfermedades.

Adicionalmente, tanto la enzima EC 2.7.8.27, como la esfingomielina (SM), pueden ser usadas como marcadores moleculares del efecto de los compuestos de la presente invención sobre 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 actividad de dicha enzima EC 2.7.8.27, y/o del nivel de SM, PFAG o DHFR; así como un kit que comprenda medios especialmente diseñados para llevar a cabo dichos diagnósticos/pronósticos. Estos métodos y kits estarían basados en la determinación de los cambios inducidos por tratamientos con las moléculas citadas en el presente documento o en la posibilidad de cambiar las entidades moleculares arriba indicadas con dichos tratamientos.

Además, la enzima EC 2.7.8.27 y/o el nivel de la SM pueden ser utilizados 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 de procedimientos de selección (*screening*, en inglés) de compuestos candidatos con el objetivo de conseguir moléculas que, como por ejemplo los enantiómeros [-] (también denominado S) y [+] (correspondiente a la forma R) de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos descritos en el presente documento, 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, debido a su espectro de aplicación, esta invención es susceptible de ser englobada en el campo de la medicina y la farmacia de forma general. Cabe destacar que, dado que las agencias reguladoras en materia farmacéutica exigen la existencia de métodos o kits de seguimiento de la eficacia de un compuesto con una determinada actividad terapéutica, tanto la descripción de los compuestos, como su síntesis, su ámbito terapéutico y su detección deben considerarse partes de esta invención.

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 también 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 pueden influir sobre la señalización celular, dando 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: sus 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, activan proteínas de membrana, que propagan la señal recibida 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 quinasa C, la proteína Ras) 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, sugiere 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). EP 1435235 A1 describe el uso del ácido 2-hidroxioléico en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables, incluidas sales, que pueden ser utilizadas en el tratamiento del cáncer, hipertensión, obesidad y reducción del peso corporal, y en enfermedades mediadas por la alteración de la estructura de la membrana y la consecuente regulación de la proteína G o de los receptores acoplados a ésta. WO 2010/066931 A1 describe el ácido α -hidroxi-cis- Δ 9-octadecenoico y su sal sódica para uso en la prevención y tratamiento de varias patologías, incluidas el cáncer de pulmón, glioma, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, obesidad e hipertensión. Los enantiómeros S de los ácidos 2-hidroxi-cis-oleico y 2-hidroxi-trans-oleico han sido documentados (Adam et al., 1998).

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., 1985). 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 o sobrepeso se producen 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 el presente

documento puede normalizar los niveles de SM en células patológicas y, por ello, revertir las alteraciones patofisiológicas aquí descritas. En el contexto de las patologías metabólicas, además de la obesidad, la ingesta lipídica también determina la aparición de otros procesos patológicos, como la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, la diabetes o el síndrome metabólico (Sloan et al., 2008)

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 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 que resultan en ceguera, problemas de audición, desorientación, alteraciones en el estado de ánimo.

Un ejemplo de desorden neurodegenerativo bien caracterizado lo constituye la enfermedad de Alzheimer, en la que se ha observado la formación de placas seniles, compuestas 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 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 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, resultando en alteraciones en el proceso de propagación de señales eléctricas. La mielina es una capa lipídica que rodea los 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).

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 las membranas celulares) se asocia 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 patologías metabólicas más importantes se encuentran la hipercolesterolemia (elevados niveles de colesterol) y la hipertrigliceridemia (elevados niveles de triglicéridos). Estas enfermedades tienen tasas de incidencia, de morbilidad y mortalidad elevadas, por lo que su tratamiento es una necesidad de primer orden. Asimismo, los lípidos ingeridos pueden determinar la aparición de diabetes (Sloan et al., 2008).

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 desarrollo de enfermedades cardiovasculares, patologías neurodegenerativas, metabolismo, obesidad, inflamación (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, es necesario el desarrollo de ácidos grasos insaturados con 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 entre proteínas periféricas para la señalización celular. Las moléculas descritas en el presente documento reúnen las características estructurales que determinan un efecto positivo sobre la salud de ciertos ácidos grasos naturales, junto a modificaciones moleculares que potencian el efecto de las moléculas originales y además impiden su rápida hidrólisis (metabolización), ambas características imprescindibles para determinar su actividad farmacológica.

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 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 esfingolípidos muy abundante en las membranas celulares de todos los organismos (Huitema et al., 2004). Se localiza principalmente en la monocapa externa de la 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 responsable de la síntesis de SM mediante la transferencia de una fosfolipina 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 glicerosfolípidos. 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 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 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 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; es 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 anormal de la enzima y/o a un nivel alterado de SM. Dado que actualmente las agencias reguladoras de comercialización de medicamentos, como la Agencia Española del Medicamento, la Agencia Europea de Medicinas (EMA), la Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration), solicitan la existencia de metodologías de seguimiento de la eficacia de los medicamentos, es aconsejable la identificación de moléculas cuyos cambios en expresión o actividad (entre otros) puedan predecir la eficacia de un compuesto, para garantizar que un paciente recibe la medicación adecuada. Por ello, se pueden considerar como divulgaciones relacionadas aquellas que permiten la correcta aplicación de los tratamientos. La presente descripción hace referencia a la síntesis de una serie de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos, a la separación de sus formas racémicas y sus aplicaciones terapéuticas. Además, la presente descripción también comprende la descripción de las dianas celulares de su actividad y, además, de biomarcadores que permiten determinar la eficacia de los referidos compuestos, así como los procesos que se emplean para ello.

Adicionalmente, es importante también 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

De forma preferida, la presente descripción se focaliza en resolver las alteraciones en los niveles celulares de SM, para encontrar 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, se llevó a cabo un procedimiento de 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 comprenden dichos enantiómeros, 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 EC 2.7.8.27, y/o del nivel de su producto, la SM, o incluso del nivel de PFAG y/o de DHFR.

Además de la regulación efectuada sobre la enzima EC 2.7.8.27, la presente descripción muestra que el compuesto 2OHOA regula la actividad de otras enzimas implicados en el metabolismo lipídico, por ejemplo, en células U118. Por tanto, se investigó la enzima EC 2.3.1.50. En la presente descripción, se muestra que el 2OHOA estimula la actividad de la EC 2.3.1.50 (Ejemplo de ref. 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

1.14.19.1, enzima responsable de la síntesis del ácido oleico a partir del ácido esteárico (**Ejemplo de ref. 9 y Figura 10**). En este sentido, cabe indicar que tanto EC 2.7.8.27 como EC 2.3.1.50 son enzimas correspondientes al metabolismo de los esfingolípidos, que están relacionados por pertenecer a la vía metabólica de un mismo tipo de moléculas. Por otro lado, el enzima EC 1.14.19.1 es un modificador de ácidos grasos. Su relación con los otros dos enzimas es que los esfingolípidos siempre llevan cadenas de ácidos grasos en su estructura. Como cada ácido graso dota de propiedades distintas a los esfingolípidos, el hecho de que éstos puedan modificarse repercute en su actividad biológica. Por ello, se puede afirmar que los tres enzimas citados en la presente descripción están íntimamente relacionados y por ello es normal que una misma molécula pueda regular la actividad de los 3 enzimas.

Los enantiómeros [-] (también isómero S) y [+] (también isómero R) de esta descripción 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 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 descripción evidencia que el enantiómero [-] de compuestos 2-hidroxiderivados de ácidos grasos actúa como activador de dicha enzima, regulando 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 para el 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, diabetes, debidas a una actividad anormalmente baja de referido enzima EC 2.7.8.27. Asimismo, la forma racémica es activadora de este enzima, puesto que predomina la actividad del isómero [-] (que es el activo) sobre el isómero [+] (que no induce la actividad del enzima). En este sentido, la actividad positiva de la forma racémica se considera que se debe al hecho que la activación que induce la síntesis de nuevas moléculas de SM es más importante que la inhibición que puede silenciar moléculas de enzima que anteriormente no estaban activas. En todo caso, el poder activador de la forma racémica es inferior a la del enantiómero [-], lo que explica su menor actividad terapéutica.

Tal y como se muestra en los ejemplos descritos, 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 descripción también muestra 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). Por otro lado, los niveles altos de colesterol se han asociado a alteraciones cardiovasculares importantes. En este sentido, el colesterol se suele asociar con la SM para formar unos dominios de membrana muy ordenados, denominados en la literatura científica *lipid rafts* o *Lo* (*liquid ordered* es decir, líquido ordenado). El aumento de colesterol favorece el aumento de estas regiones lipídicas, lo que supone cambios en la señalización celular que pueden dar lugar a diferentes enfermedades o alteraciones cardiovasculares y metabólicas. Por ello, la reducción de los niveles de SM en casos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia puede ayudar a disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma y membranas. De esta forma, el enantiómero [+] tendría un papel protector en ciertos tipos de desórdenes, como la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, ya que induce reducciones en los niveles séricos de estos lípidos y reducciones en los niveles de SM que concurrirían en una reducción de la densidad de *lipid rafts* en las células.

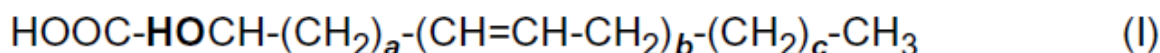
Adicionalmente, dado que la enzima EC 2.7.8.27 es responsable de la síntesis de SM y, por ende, de la correcta estructura y función de la membrana celular, tanto la enzima como la propia SM podrían considerarse como marcadores moleculares, utilizables para llevar a cabo un método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades basadas en alteraciones en la membrana celular. Dichos cambios no ocurren de forma natural, sino que vienen originados por la actividad de los compuestos reseñados en la presente descripción. Además, se ha podido comprobar que los compuestos de la presente descripción también regulan los niveles de las proteínas DHFR y PFAG. Consecuentemente, la presente descripción también hace referencia a un método / kit para llevar a cabo el diagnóstico o pronóstico de dichas patologías que comprende reactivos o medios capaces de evaluar la actividad de la enzima EC2.7.8.27, y/o el nivel de SM, DHFR o PFAG y, consecuentemente, implementar dicho diagnóstico/pronóstico como método para seguir la eficacia del tratamiento de los pacientes.

Por el mismo motivo, dicha enzima EC2.7.8.27 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, DHFR o PFAG. Así,

a modo de ejemplo, el enantiómero [-] descrito en el presente documento 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, y/o los niveles de PFAG, y/o los niveles de DHFR, 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, y/o el nivel de PFAG, y/o el nivel de DHFR, siendo capaces de revertir procesos patológicos.

Consecuentemente, la presente descripción 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 carbono sustituido, particularmente con un radical hidroxilo (OH), en el carbono 2 (o carbono α).

Concretamente, los compuestos a los que hace referencia la presente descripción son los enantiómeros [-] y [+] de Fórmula I:



donde *a*, *b* y *c* toman 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 [-] (que corresponde a la configuración S) 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 [+] (que corresponde a la configuración estérica R) 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*:

Tabla 1

Fórmula	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
HOOC-HOCH-(CH ₂) ₆ -(CH=CH-CH ₂) ₁ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	6	1	4
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

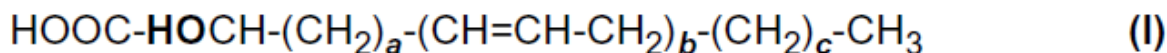
En un aspecto preferido, la presente descripción hace referencia al enantiómero [-] de Fórmula I [-]HOOC-HOCH-(CH₂)₆-(CH=CH-CH₂)₁-(CH₂)₆-CH₃, nombrado, a efectos de la presente descripción, [-]2OHOA.

En otro aspecto particularmente preferido la presente descripción 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 o prevenidas con el enantiómero [-] descrito en el presente documento son:

- 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**).
- Patologías vasculares: hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca.
- Patologías metabólicas: diabetes, síndrome metabólico u obesidad.
- Otras patologías: lesión medular, enfermedad de Alzheimer, esclerosis, celulitis.

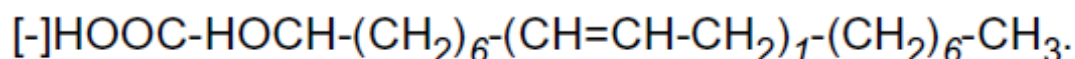
Por lo tanto, más específicamente, el primer aspecto de la presente descripción hace referencia a un enantiómero [-] o [+] de un compuesto de Fórmula I



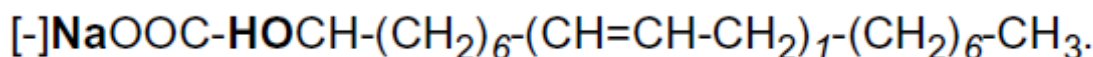
caracterizado porque a , b y c toman valores independientes entre 0 y 6, con la condición de que el número total de carbonos sea ≤ 20 . Preferentemente, el compuesto resulta de la selección de al menos una de las siguientes combinaciones de valores a , b y c : $a=6$, $b=1$ y $c=6$; $a=6$, $b=1$ y $c=4$; $a=6$, $b=2$ y $c=3$; $a=6$, $b=3$ y $c=0$; y $a=3$, $b=3$ y $c=3$.

Otro aspecto preferido descrito en el presente documento hace referencia a los compuestos de fórmula: $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH-CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$. A modo de ejemplo, las enfermedades caracterizadas por un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, y, consecuentemente, por un nivel de SM anormalmente alto en las membranas celulares, y que podrían ser tratadas o prevenidas con el enantiómero $[+]$ descrito en el presente documento, son la fibrosis quística, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia.

Otro aspecto particularmente preferido de la presente invención hace referencia a los compuestos de fórmula:



Sin embargo, la presente invención se refiere a un enantiómero $[-]$ de fórmula:

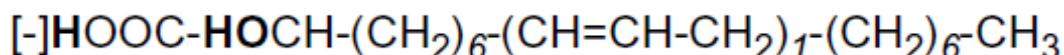


Un segundo aspecto descrito en el presente documento, hace referencia al uso de al menos un compuesto de los anteriormente mencionados para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de patologías cuya etiología común sea alteraciones estructurales y/o funcionales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

Además de la presente invención cubre al menos un compuesto de los anteriormente mencionados para ser usados en el 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, del nivel o concentración de SM, del nivel de PFAG o del nivel de DHFR, en células en general y en membranas, en particular.

Incluso la presente descripción hace referencia a la propia composición farmacéutica que comprenda al menos uno de dichos compuestos y, opcionalmente, vehículos farmacéuticamente aceptables. Así, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse de forma independiente o formulados en composiciones farmacéuticas donde se combinan con excipientes como por ejemplo: ligantes, ingredientes de relleno, desintegrantes, lubricantes, recubridores, edulcorantes, saborizantes, colorantes, transportadores, y combinaciones de los mismos. Asimismo, los compuestos descritos en el presente documento pueden formar parte de composiciones farmacéuticas en combinación con otros principios activos.

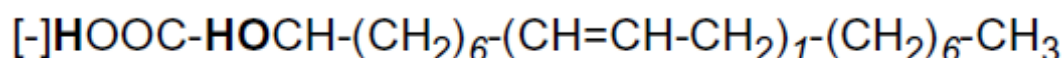
Así, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un enantiómero caracterizado por la fórmula:



y/o al menos una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente, cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para el uso de los compuestos de la invención como medicamentos, su administración puede llevarse a cabo por cualquier vía como, por ejemplo: vía oral (mediante píldoras, comprimidos o jarabes), mediante el aparato digestivo, vía rectal (mediante supositorios o enemas), vía tópica (mediante cremas o parches), vía inhalatoria, vía inyección parenteral, 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, fosfatos, u otros radicales de tipo éster, éter, alquilo.

Además, la presente invención también se refiere a un enantiómero caracterizado por la fórmula:



o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o la prevención de patologías seleccionadas entre:

- i) cáncer; o
- ii) patologías vasculares; o

iii) patologías metabólicas.

En un aspecto preferido, la descripción hace referencia al uso del compuesto $[-]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ 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 un déficit en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, un nivel anormalmente bajo de PFAG o un nivel anormalmente alto de DHFR; seleccionándose las patologías preferiblemente entre: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, melanoma maligno y cáncer hepático; patologías vasculares: hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

Además, la presente descripción hace referencia al uso de un compuesto $[-]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ en 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 EC 2.7.8.27, un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, un nivel anormalmente bajo de PFAG o un nivel anormalmente alto de DHFR; 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, melanoma maligno y cáncer hepático; patologías vasculares preferentemente hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; o patologías metabólicas preferentemente: diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

En otro aspecto preferido, la descripción hace referencia al uso del compuesto de fórmula $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ 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 un exceso en la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, un nivel anormalmente elevado de SM en la membrana celular, un nivel anormalmente alto de PFAG o un nivel anormalmente bajo de DHFR; siendo la patología, por ejemplo, la fibrosis quística, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia.

Igualmente, la descripción hace referencia al uso del compuesto de fórmula $[+]\text{HOOC-HOCH}-(\text{CH}_2)_6-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_1-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ para la elaboración de una composición farmacéutica para el 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, un nivel anormalmente elevado de SM en la membrana celular, un nivel anormalmente alto de PFAG o un nivel anormalmente bajo de DHFR; por ejemplo, la fibrosis quística la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia.

Un tercer aspecto descrito en el presente documento 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, del nivel de SM, del nivel de PFAG o del nivel de DHFR; que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de los citados anteriormente o composiciones que los comprendan.

En un aspecto preferido, la descripción 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 EC 2.7.8.27 y/o a un nivel anormalmente bajo de SM en la membrana celular, y 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, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de útero, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón; patologías vasculares: hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; o patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

Otro aspecto preferido descrito en el presente documento 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 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 una realización preferida la patología es, por ejemplo, la fibrosis quística, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia.

A efectos de la presente descripción una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad que revierte la enfermedad o la previene sin mostrar efectos secundarios adversos. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" también es aquella que, produce un efecto terapéutico significativo con un nivel de toxicidad aceptable cuando la enfermedad tratada fuera muy grave o mortal.

Un cuarto aspecto descrito 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, y que comprende una evaluación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27, del nivel de SM, del nivel de PFAG o del nivel de DHFR en presencia de un posible compuesto candidato. Es decir, la presente descripción comprende el uso de la enzima EC 2.7.8.27, o de SM, PFAG o DHFR como dianas terapéuticas a las cuales dirigir compuestos para tratar y/o prevenir las patologías anteriormente descritas, con la finalidad de diseñar herramientas terapéuticas capaces de alterar su actividad (p.ej., Figura 5) o niveles y a las que dirigir compuestos con el objetivo de prevenir y/o tratar las patologías anteriormente descritas.

El quinto aspecto descrito 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 determinar la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o de la presencia de un nivel anormal de SM, del PFAG o de DHFR en la membrana celular u otros compartimentos celulares. Esta descripción, por tanto, comprende el uso de la enzima EC 2.7.8.27, o de SM, PFAG o DHFR, como marcadores moleculares a través de los cuales 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 determinar la desregulación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 para la producción de este fosfolípido, hacen de la detección de la concentración/actividad celular de ambas en tejidos, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina y/o otros fluidos corporales, una herramienta para la preparación de kits de detección, diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías comprendidas en la presente invención, tales como: cáncer, hipertensión, obesidad y enfermedades metabólicas. Por este motivo, 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.

Un aspecto preferido descrito en el presente documento 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, de la presencia de un nivel anormalmente bajo de SM, de un nivel anormalmente bajo de PFAG o de un nivel anormalmente alto de DHFR en la membrana celular, preferentemente en patologías seleccionadas 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, melanoma maligno y cáncer hepático; patologías vasculares preferentemente hipertensión, arterioesclerosis, cardiomiopatías, ictus, angiogénesis, hiperplasia cardíaca; patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

Otro aspecto preferido descrito en el presente documento 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, de la presencia de un nivel anormalmente alto de SM en la membrana celular donde, de forma preferida, la patología es fibrosis quística, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia.

El sexto aspecto descrito hace referencia a kits para ser usados como método de pronóstico/diagnóstico definido más arriba, que comprenden medios útiles para la determinación de la actividad de la enzima EC 2.7.8.27 y/o del nivel de SM, y/o del nivel de PFAG, y/o del nivel de DHFR en la membrana celular. Dichos medios útiles comprenden las técnicas TLC y HPTLC, cromatografía de gases, análisis de imagen, espectroscopia de absorción o fluorescencia, microscopía óptica, de fluorescencia, microscopía confocal, inmunoblotting, inmunocitoquímica, ELISA o técnicas similares (RIA, dot/slot blot, EIA, etc.).

En un aspecto preferido el kit se caracteriza porque el pronóstico/diagnóstico se lleva a cabo a través de la cuantificación directa de los niveles de esfingomielina, y/o de la cuantificación indirecta de la misma a través de sus precursores (por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, ceramida, etc.) o de sus derivados (por ejemplo esfingolípidos). De forma preferida el precursor es la ceramida, el derivado es NBD-Cer o NBD-SM y la medición indirecta se hace a través de la lisenina.

Otro aspecto descrito hace referencia a un método aislamiento y purificación de los enantiómeros 20HOA que comprende los siguientes pasos:

1. Hidroxilación en medio ácido del ácido graso insaturado para producir el producto racémico.
2. Purificación por recristalización y precipitación del 2-hidroxiácido graso racémico en su forma de sal de sodio.
3. Esterificación de la mezcla racémica de la sal sódica del 2-hidroxiácido graso con una disolución de ácido sulfúrico en etanol, preferentemente al 10%.
4. Hidrólisis enantio-selectiva del éster, catalizada por la lipasa de *pseudomonas fluorescens* (Amane Lipase, cas #9001-62-1) a 25 °C.
5. Control del progreso de la reacción mediante cromatografía líquida.
6. Hidrólisis de la mezcla con HCl diluido hasta pH menor de 2.
7. Extracción de los productos en metil-tertbutil-éter (MTBE) y lavado de la fase orgánica.
8. Eliminación del disolvente al vacío para obtener un crudo con la mezcla de ácido y éster.
9. Separación de ácido y éster mediante cristalización del primero.

10. 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).

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

La presente descripción también hace referencia a un método *in vitro* de seguimiento de las alteraciones celulares producidas sobre las células enfermas por el efecto de los compuestos descritos en el presente documento, u otros compuestos que actúen sobre el mismo proceso celular o sobre procesos celulares relacionados, produciendo la curación o la mejoría de las células afectadas en el paciente. Es decir, la presente descripción comprende el uso de la enzima EC 2.7.8.27, o de SM, DHFR o PFAG como marcadores moleculares cuyos cambios inducidos por el tratamiento con las moléculas descritas en el presente documento permitan saber si el paciente responde al tratamiento y, por lo tanto, determinar la eficacia del mismo y el tiempo que se debe de mantener. Estos métodos también pueden permitir predecir si un paciente tiene posibilidades de responder al tratamiento con las moléculas descritas en el presente documento, por lo que se pueden utilizar para realizar el diagnóstico y/o pronóstico de las patologías anteriormente descritas. Dado que la alteración de la composición de la membrana, y en concreto de los niveles de SM, da lugar a cambios en los niveles de las proteínas DHFR y PFAG, un aspecto preferido de la presente descripción hace referencia a un método que permite seguir los cambios inducidos por las moléculas descritas en el presente documento u otras moléculas que realicen un efecto similar sobre las células patológicas. Por lo tanto, el uso de la SM, el enzima EC 2.7.8.27, la DHFR y/o la PFAG ofrece la posibilidad de que la terapia aplicada pueda cambiar sus niveles o actividad. La finalidad de esta determinación es (1) la predicción de la eficacia del tratamiento para evitar que los pacientes potencialmente no respondedores sigan una terapia ineficaz y (2) conocer la evolución del paciente para confirmar que responde a la terapia y saber las dosis a suministrar en función de la fase del tratamiento, así como la duración de dichas fases y del propio tratamiento en su totalidad. Como estos aspectos son críticos para evitar gasto farmacéutico innecesario y para poder aplicar la terapia de la forma más racional posible, las grandes agencias reguladoras en materia farmacéutica solicitan la existencia de biomarcadores y sistemas de diagnóstico como los aquí descritos.

De igual forma la presente descripción hace referencia a un método para el tratamiento de pacientes que padecen las patologías anteriormente descritas, que comprende la determinación de la presencia de dicha desregulación de la enzima EC 2.7.8.27, del nivel de SM, del nivel de PFAG o del nivel de DHFR, y del tratamiento del paciente que presenta dicha desregulación con los compuestos descritos en el presente documento.

Además, la presente descripción hace referencia a un método para seleccionar la terapia para un paciente con una patología descrita en la presente invención que comprende la determinación de la presencia de dicha desregulación en la enzima EC 2.7.8.27, del nivel de SM, del nivel de PFAG o del nivel de DHFR y la selección, en base a dicha determinación, de una terapia basada en los compuestos de la presente descripción.

Con el propósito de ilustrar la presente descripción se incluyen las siguientes definiciones:

- Alta/baja actividad de la enzima EC 2.7.8.27: actividad enzimática que resulta en la aparición de niveles altos o bajos, respectivamente, de SM en membranas.
- Nivel alto/bajo de esfingomielina: se consideran niveles bajos de esfingomielina aquellos por debajo de un 15% de los fosfolípidos totales de la membrana. Se consideran niveles altos de esfingomielina aquellos por encima de un 15% o más de este fosfolípido, con respecto a los fosfolípidos totales.
- Nivel alto/bajo de PFAG: se considera un nivel alto de PFAG el que supone el doble o más ($\geq 200\%$) de los niveles normales presentes en células de la glía, en referencia al total de miligramos de proteína. Se considera un nivel bajo de PFAG el que implica la presencia de niveles de la mitad o menos ($\leq 50\%$) respecto a los niveles normales presentes en células de la glía, en referencia al total de miligramos de proteína.
- Nivel alto/bajo de DHFR: se considera un nivel alto de DHFR el que supone el doble o más ($\geq 200\%$) de los niveles normales presentes en células quiescentes del tipo que sean, en referencia al total de miligramos de proteína. Se considera un nivel bajo de DHFR el que implica la presencia de niveles de la mitad o menos ($\leq 50\%$) respecto a los niveles normales presentes en células quiescentes del tipo que sean, en referencia al total de miligramos de proteína.

Breve descripción de las figuras

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). Asimismo, se ha estudiado también el efecto antitumoral sobre éstas y otras líneas tumorales (ver **Tabla 2**). Las células fueron tratadas con vehículo (agua con 5% de etanol, Control) o con el compuesto 2OHOA, durante 24 horas a una concentración de 200 μM . 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 (seguido por espectroscopía y análisis de imagen), como porcentaje respecto de los lípidos totales comparados con las 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 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 diferentes fases, 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. Además de las técnicas descritas arriba para medir la actividad del enzima y los niveles de SM, se han probado otras técnicas que han dado resultados muy similares, como la cromatografía de gases, la microscopía confocal, la espectroscopia de fluorescencia.

B. Imágenes de microscopía confocal mostrando el marcaje de la SM celular mediante unión de lisenina en células de glioma humano U118 tratadas con vehículo (Control) o con 2OHOA (200 μM). 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 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.

C. Paneles superiores: Marcaje específico, mediante técnicas inmunocitoquímicas, de la SM (izquierda: lisenina seguida de anticuerpo marcado con el fluoróforo Alexa 488), del ADN nuclear con Hoechst 33258 (centro: Hoechst), o ambos (derecha, merge). Las figuras corresponden a secciones de tumores de cáncer de pulmón humano (células A549) formados en ratones inmunodeprimidos tratados con vehículo (Control) o con [-]2OHOA a 600 mg/kg · día o a 900 mg/kg · día (oral, 50 días). Estos resultados muestran claramente cómo los niveles de SM aumentan de forma significativa tras la inducción del tratamiento con [-]2OHOA, pero no aumentan de forma natural en dichos tumores.

Paneles centrales: Detalle del marcaje de la SM (izquierda), ADN nuclear (centro), o ambos (derecha) en una célula presente en un corte de tumor desarrollado en un ratón infectado con cáncer de pulmón humano (A549) y tratado con [-]2OHOA (600 mg/kg · día, p.o., 50 días). La imagen muestra la pérdida de ADN nuclear, claro indicador del inicio de la muerte celular, en paralelo al incremento de SM.

Panel inferior: El eje de ordenadas representa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) por microscopía confocal en secciones de los tumores mostrados en el panel superior (media $\pm$ error estándar de la media), procedentes de animales tratados con vehículo (Control), o 2OHOA a 600 mg/kg · día (T600) o 900 mg/kg · día (T900) durante 50 días. *** $P < 0.001$.

D. Determinación de los niveles de SM por espectroscopía de fluorescencia. Membranas modelo (liposomas) con diferente contenido de SM se incubaron en presencia de lisenina, primero, y de un anticuerpo anti-lisenina marcado con el fluoróforo Alexa 488, después. La fluorescencia unida a las membranas (niveles de SM) se separó de la no unida mediante centrifugación a 80,000 x g durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió en un medio con detergente (1% de dodecil sulfato sódico) y se cuantificó la fluorescencia (unidades arbitrarias en el precipitado) en cada pellet (ordenadas) en función de la concentración de SM (abcisas). Cualquier fluoróforo que se una al anticuerpo o a la lisenina puede ser empleado para la detección de este lípido.

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 de SM fueron determinados mediante cromatografía en capa fina (HP-TLC, high performance thin layer chromatography), y por análisis de imagen o cromatografía de gases:

A: Células cancerosas U118 de glioma humano tratadas a una concentración de 200 μM de 2OHOA 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 de 2OHOA (25-400 μM).

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 μM . 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 esta 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 (High performance Liquid Chromatography). Los valores se presentan en el eje de ordenadas como la media $\pm$ ESM ($n = 3-5$):

A: Experimento *in vitro* 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.

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.

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 toda la célula o en la superficie celular, respectivamente.

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). Control, vehículo; 18:1n-9 (ácido octadecenoico); 2Me-18:1n-9 (ácido 2-metiloctadecenoico); 2OH16:1 (ácido 2-hidroxihexadecenoico); 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 araquidónico); 2OH-20:5n-3 (ácido 2-hidroxi eicosapentaenoico); 2OH-22:6n-3 (ácido 2-hidroxidocosahexaenoico). 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 microscopía óptica de contraste de fases (Ph.C) de células de glioma humano (SF767), y microscopía 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 μ M de 2OHOA.

C: Finalmente, hay 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 μ M 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.

E: Panel superior: Niveles de expresión de DHFR en tumores derivados de células de glioma humano (SF767) implantadas en ratones sin pelo que fueron tratados con 2OHOA durante 50 días (600 mg/kg día). La gráfica de la izquierda muestra los valores medios (n = 4) de fluorescencia determinada por inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico marcado con fluorescencia y las fotografías de la derecha corresponden a una imagen representativa. **Panel inferior:** Expresión de DHFR en células de cáncer de pulmón humano (A549). Todas las condiciones experimentales y detalles de esta gráfica son similares al panel superior. Estos resultados demuestran que los niveles de DHFR varían en respuesta al tratamiento con las moléculas de la descripción, por lo que la actividad o niveles de esta proteína pueden ser empleados como biomarcadores para seguir la eficacia terapéutica de los compuestos descritos aquí o compuestos que actúen de forma similar. Asimismo, se deduce que los tumores en los que los niveles de DHFR sean altos pueden responder bien al tratamiento con los compuestos de la presente descripción, por lo que esta proteína es un buen biomarcador para pronosticar la posible eficacia de enantiómeros de derivados de ácidos grasos y posteriormente evidenciar la eficacia del tratamiento con estos compuestos.

F: Panel izquierdo: Niveles de PAFG en suero de animales con tumores humanos (glioma) determinados por inmunoblotting. Los ratones sin pelo se infectaron con células SF767 y se trataron con vehículo (Glioma) o con 2OHOA (T, 600 mg/kg día, 28 días). La inmunoreactividad contra el péptido fragmentado de la PFAG (ver fotografía) en el suero de estos animales, expresada en porcentaje, se comparó con la encontrada en animales sin tumor y no tratados (Control). **Panel derecho:** Idem, pero determinado por ELISA en suero de animales tratados durante 7 días (7d600) o 28 días (28d600) con 600 mg/kg de 2OHOA.

Para todos los experimentos se empleó un anticuerpo específico contra la PFAG. Estos resultados demuestran que los niveles de PFAG varían en respuesta al tratamiento con las moléculas de la descripción, por lo que los niveles de esta proteína pueden ser empleados como biomarcadores para seguir la eficacia terapéutica de los compuestos descritos aquí o compuestos que actúen de forma similar. Asimismo, se deduce que los tumores en los que los niveles de PFAG sean bajos pueden responder bien al tratamiento con los compuestos de la presente descripción, por lo que esta proteína es un buen biomarcador para pronosticar la posible eficacia de enantiómeros de derivados de ácidos grasos y posteriormente evidenciar la eficacia del tratamiento con estos compuestos. Para la medición de DHFR y PFAG se han utilizado varias técnicas, que incluyen electroforesis, inmunoblot, ELISA y similares, RT-PCR. Todas estas técnicas y otras similares pueden ser empleadas para la determinación de los niveles o actividad de DHFR y PFAG.

Figura 7. A) Especificidad 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. En este contexto, y sin que afecte a otros niveles, hemos podido comprobar que las mezclas que contengan este enantiómero inducen la activación del enzima EC 2.7.8.27, siendo un caso especial de mezcla molecular el racémico, aunque también se ha comprobado un efecto positivo en mezclas entre el enantiómero [-] y diferentes vehículos o diferentes compuestos terapéuticos. **B)** Efecto de las formas [+] (también enantiómero R: **columnas negras**), [-] (también enantiómero S: **columnas blancas**) y racémico (**columnas gris**) sobre los niveles de SM en membranas de células U118 (valores medios tras 24 h de incubación con 100 μ M). Los tratamientos empleados fueron: vehículo (Control), ácido 2-hidroxipalmitoleico (2OH16:1), ácido 2-hidroxioléico (2OH18:1); ácido 2-hidroxilinooleico (2OH18:2); ácido 2-hidroxilinooleico (2OH18:3a); ácido 2-hidroxilinooleico (2OH18:3g).

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 (2OHOA), y los isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg $\cdot$ día, 15 días, oral). Las barras corresponden a valores de media $\pm$ EEM (n=3-5) 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 vehículo (Control), 2OHOA racémico (2OHOA) 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 vehículo (Control), 2OHOA racémico (2OHOA) 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 abcisas, n = 6).

D. Efecto sobre los niveles de colesterol y triglicéridos: se trataron ratas SHR con 2OHOA racémico (2OHOA) y sus isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg, cada 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 lípidos. Se muestran valores de media $\pm$ EEM de los niveles séricos de lípidos expresados en mg/dl (eje de ordenadas; n = 6).

E. Efecto sobre la glicemia (niveles plasmáticos de glucosa): se trataron ratas SHR con vehículo (Control), 2OHOA racémico (2OHOA) y sus isómeros ópticos [-]2OHOA y [+]2OHOA (600 mg/kg, 12h, 15 días, oral). El compuesto racémico y el isómero [-]2OHOA produjeron reducciones significativas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) en los niveles de glucosa en plasma (mg/dL, eje de ordenadas).

Figura 9. Regulación de la actividad de la enzima 2.3.1.50. El eje de ordenadas (y) muestra los niveles de incorporación de [^3H]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 significativo de radiactividad en las fracciones de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer), lo que claramente indica la activación selectiva de las enzimas EC 2.7.8.27 y 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 [^3H]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 tritado en los lípidos de membranas de células incubadas en presencia de 2OHOA demuestra la inhibición de la enzima 1.14.19.1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.

A continuación se exponen los ejemplos que ilustran las realizaciones detalladas y preferidas.

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

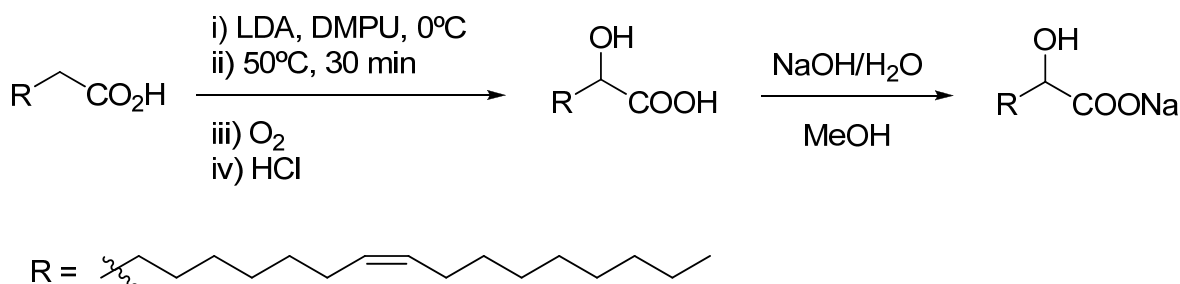
Síntesis del compuesto racémico.

La metodología descrita a continuación detalla la síntesis de sales de sodio de 2-hidroxi-ácidos grasos con una pureza del 99%, mediante generación del dianión del ácido oleico por reacción con LDA y posterior hidroxilación con oxígeno molecular; el crudo obtenido se trata con NaOH para formar la sal de sodio y se purifica mediante dos recristalizaciones en MeOH/agua (evitándose el uso de columnas cromatográficas).

Con esta metodología se pueden obtener desde gramos del producto final hasta toneladas del mismo. La pureza del producto puede tener calidad farmacéutica y realizarse en condiciones "GMP" (Good Manufacturing Practice), que es la indicada para consumo humano.

Esquema

A continuación, se muestra el esquema de la reacción en dos pasos, hidroxilación y purificación.



Donde R es: $-(\text{CH}_2)_a-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_b-(\text{CH}_2)_c-\text{CH}_3$, siempre que la suma de carbonos totales de R sea igual o superior a 12 o igual o inferior a 18 (para longitudes totales de las moléculas de entre 14 y 20 C).

Descripción del proceso

Paso 1: Hidroxilación

En un reactor esmaltado de 100 L inertizado se enfría por debajo de 5°C una disolución de diisopropilamina (1.7 Kg) en THF (11 L). Sobre la disolución se añade *n*-BuLi (23% en hexanos) (4.6 Kg) en porciones sin que la temperatura exceda de 17°C . Al finalizar la adición se añade un equivalente de DMPU (1.0 Kg) y una disolución de ácido oleico (2.0 Kg) en THF (2.6 L), sin que la temperatura sobrepase los $20\text{--}25^\circ\text{C}$. La mezcla de reacción se calienta a 50°C durante 30 min y luego se vuelve a enfriar a 20°C . En este punto se conecta una bala de O_2 y se burbujea durante unos 45 min con un caudal de 25 L/min. Finalizado el burbujeo, se enfría la disolución a 10°C y se hidroliza con HCl 3 M (20 L) hasta pH 1, controlando que la temperatura no suba de 40°C . El producto crudo se extrae en acetato de etilo (6 L), se lava con una mezcla de HCl 3 M/salmuera (1:1) y bisulfito de sodio (9 L) y salmuera (hasta dejar el pH a un valor igual o inferior a 3) y la disolución se concentra hasta sequedad en rotavapor. Se obtiene 2 Kg aproximadamente de crudo con una pureza $\geq 70\%$.

Paso 2: Purificación

El crudo de producto se disuelve en 7.2 L de metanol a 40°C en un reactor de 10 L y se trata con una disolución acuosa de hidróxido de sodio (134 g en 1.4 L de agua), aumentando la T hasta 50°C para obtener una disolución homogénea. Se enfría a 5°C durante al menos 6 h para precipitar la sal de sodio, que se filtra y lava con acetona. El sólido se recristaliza dos veces en (10%) $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (0.5 L $\text{H}_2\text{O}/5.0$ L MeOH) a 50°C hasta disolución total y enfriando durante un mínimo de 6 h a $0\text{--}5^\circ\text{C}$. El producto final se filtra, lava con acetona y se seca a vacío. Se suspende en metanol y se completa la formación de la sal adicionando metóxido de sodio. El producto se precipita completamente con acetona (5 L) enfriando a $0\text{--}5^\circ\text{C}$ durante al menos 10 h. El sólido se filtra, lava con acetona y se seca a vacío.

Producción de enantiómeros [+] (R) y [-] (S).

En un reactor de 1 L se introducen 100 g de la sal de sodio de 2OHOA y se adicionan 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.

5 Sobre la emulsión acuosa se añaden 250 mL de AcOEt (acetato de etilo) para extraer el 2-hidroxiolateo de etilo, se seca sobre sulfato y se concentra a sequedad.

En un reactor de 1 L con agitación mecánica se disuelven 100 g de 2-hidroxiolateo 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 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).

15 Cada fracción requiere de dos reprocesados, repitiendo el procedimiento de esterificación/hidrólisis por separado, hasta alcanzar un ee ≥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

20 Las condiciones descritas para la resolución cinética son las mejores obtenidas en el 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 enantiómeros de derivados hidroxilados de ácidos grasos 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

30 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 membranas, que aumentan tras el tratamiento con las moléculas de la invención.

35 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 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. Por otro lado, los tratamientos con las moléculas de la presente descripción inducen un incremento de SM en las células tumorales que no se produce de forma natural. De esta manera, la detección de SM mediante lisenina y posterior acoplamiento de un anticuerpo fluorescente y detección por microscopía de fluorescencia confocal, muestra un mayor marcaje (es decir, una mayor cantidad de SM) en los tumores de animales tratados con las moléculas de la presente descripción (**Figura 1c**). De forma análoga, otros métodos de detección basados en la unión de lisenina a la SM de membrana y detección mediante ensayos espectroscópicos en solución o mediante ELISA muestran cómo las membranas de células tumorales presentan un mayor nivel de SM sólo cuando son incubadas en presencia de las moléculas de la presente descripción (**Figura 1**). Por ejemplo, la determinación por espectrofotometría de fluorescencia en solución de los niveles de SM resulta un tipo de análisis muy sencillo, rápido y eficaz (**Figura 1D**). 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 terapia aplicada empleando las moléculas de la presente descripción y otras de similar actividad. 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	Efecto ¹	Téc ⁿ 2
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
A375	Melanoma maligno (humano)	6	24	+	1,3
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 de referencia 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 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 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 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. Los cambios inducidos por las moléculas de la presente descripción tienen como efectos intermedios (anteriores a la muerte de células cancerosas o la regulación de la actividad en otras células) la inducción de reducciones dramáticas en los niveles de DHFR y el aumento dramático de los niveles de PFAG (**Figura 6**).

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 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 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 descripción 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 esta 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 inhibición del crecimiento de tumores (**Figura 8A y Tabla 2**). Los compuestos de la presente invención han demostrado poder regular de forma positiva (incrementos) o negativa (reducciones) los niveles de SM en las células. Dado que la composición de la membrana es crítica para el correcto funcionamiento de la misma, tanto los activadores (enantiómeros S ó -) de la enzima EC 2.7.8.27, como sus inhibidores (enantiómeros R ó +) tienen actividad terapéutica, tal y como aquí se ha demostrado. Esta activación está basada en principios estructurales y sigue los parámetros de estructura-función de cualquier otra molécula con actividad terapéutica.

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 [-] (que corresponde a la conformación estructural S) y [+] (que corresponde a la conformación estructural R). Mediante el proceso descrito en la presente invención (**Ejemplo 1**), se han sintetizado y aislado el compuesto racémico, cuya actividad para regular tanto positiva como negativamente la enzima EC 2.7.8.27 ha quedado patente, y los enantiómeros o isómeros ópticos han mostrado y se ha medido su capacidad para activar la enzima EC 2.7.8.27. La **Figura 7A** muestra la activación de dicha 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 7A** muestra cómo el 2OHOA racémico produce incrementos significativos en los niveles de SM en membranas de células U118. Asimismo, el isómero óptico [-]2OHOA (correspondiente al enantiómero S) es capaz de producir incrementos aún mayores en los niveles de SM. Por eso, y en el caso concreto de este enzima, la presencia de mezclas con un cierto porcentaje de [-]2OHOA (siendo el compuesto racémico un caso especial) se comporta como activador específico de EC 2.7.8.27. 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 esta enzima. Por ello, se describe en el presente documento el uso para aplicaciones terapéuticas del isómero óptico [-]2OHOA (S) como activador de la enzima EC 2.7.8.27 y del isómero óptico [+]2OHOA (R) como inhibidor específico de esta enzima. Estos resultados se pueden extender a todos los ácidos grasos insaturados comprendidos entre 14 átomos y 20 átomos de carbono, que presenten uno o más dobles enlaces y un radical hidroxilo en el carbono C2 (carbono alfa: **Figura 7B**).

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

El enantiómero [-]2OHOA y derivados mostrados en este documento tienen aplicaciones terapéuticas en diferentes ámbitos, como el tratamiento del cáncer, la obesidad, las patologías cardiovasculares, la diabetes, el síndrome metabólico, la lesión medular, la enfermedad de Alzheimer y otros procesos (**Figuras 6 y 8; Tablas 2-5**). Por otra parte, el enantiómero [+]2OHOA tuvo un efecto positivo sobre los niveles de colesterol y de triglicéridos, ya que indujo reducciones significativas en los niveles plasmáticos de estos lípidos, cuyos niveles elevados se consideran negativos de cara a la salud humana (**Figura 8**). Por ello, se estudiaron los efectos terapéuticos de cada 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 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 investigó la actividad antitumoral de estos compuestos en diferentes líneas de cáncer humano (ver **Tablas 2, 4 y 5**). En este sentido, todos los enantiómeros [-] descritos en el presente documento demostraron mayor potencia que el racémico y el enantiómero [+] para el tratamiento del cáncer, lo que se corresponde con valores significativamente menores en los

IC50 para inhibir el crecimiento de cáncer de pulmón humano (línea A549). Es más, la actividad de estos enantiómeros se evidenció frente a una amplia variedad de cánceres humanos de diferente índole, por lo que se puede asegurar que los enantiómeros [-] de ácidos grasos 2-hidroxilados tienen una elevada potencia para el tratamiento de cualquier tipo de cáncer. Esta potencia resultó ser algo superior para las sales (principalmente la sal de sodio de estas moléculas) que para el ácido graso libre (resultados no mostrados). En cualquier caso, los enantiómeros [-] tanto en forma ácida como en sal, siempre presentaron una mayor potencia que cualquiera de las formas moleculares alternativas para inhibir el crecimiento de tumores.

Además, se estudió el efecto de los isómeros arriba indicados sobre la presión arterial, el peso corporal, los niveles de triglicéridos y colesterol y la glicemia (glucosa en plasma) en ratas SHR (**Figura 8B, 8C y 8D y 8E**). De forma análoga a lo indicado anteriormente, se produjo un efecto terapéutico mayor cuando se utilizó el isómero [-]2OHOA en el control de la presión arterial, el peso corporal y la glicemia, mientras que el enantiómero [+]2OHOA tuvo un mayor efecto terapéutico para el tratamiento de la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Así, los animales tratados con el isómero [-]2OHOA mostraron reducciones en su presión sistólica superiores a 7998 Pa (60 mm Hg), mientras que los tratados con el isómero [+]2OHOA y con el producto racémico tuvieron un notable efecto terapéutico pero de menor amplitud. 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. Por otro lado, 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. Finalmente, el tratamiento con los enantiómeros descritos en el presente documento también produjo reducciones significativas en los niveles de glucosa en plasma (**Figura 8E**). En este caso, tanto el producto racémico (2OHOA) como el enantiómero [-]2OHOA indujeron bajadas significativas de la glicemia en ratas ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente: **Figura 8E**). Sin embargo, el enantiómero R ([+]2OHOA) indujo una bajada modesta que no alcanzó significancia estadística.

Por todo ello, esta invención evidencia que los isómeros ópticos [-] [+] de hidroxiácidos grasos insaturados de 18 átomos de C son moléculas eficaces y con actividad terapéutica para el tratamiento de las patologías arriba indicadas. En todos los casos estudiados, uno y sólo uno de los enantiómeros mostró tener una actividad superior a la de las otras formas moleculares (significancia estadística siempre $P < 0.05$). De esta forma, el enantiómero [-] mostró ser más eficaz para curar el cáncer, la obesidad, la diabetes, la hipertensión, mientras que el enantiómero [+] mostró ser más eficaz para controlar la hipercolesterolemia o la hipertrigliceridemia. En estos casos, el compuesto racémico se mostró como una situación intermedia, capaz de emular los efectos positivos de cualquiera de los isómeros ópticos, pero con una menor potencia, debida a la menor concentración del enantiómero activo en cada caso. Además, el uso del enantiómero no adecuado indujo unos efectos secundarios no deseados que se evitaron a dosis terapéuticas con el enantiómero más activo (**Tabla 3**).

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 enantiómero ([-]2OHOA) es mucho más eficaz que la del compuesto racémico, revirtiendo parte del efecto terapéutico que tiene el último.

5

Tabla 3

Dosis mg/kg	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 16%	-2%	Diarrea 16% Comportamiento 32%
600	-37%	Diarrea 50% Comportamiento 50%	-86%	Diarrea 32% Comportamiento 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). En este caso, se asignó el valor de 100% al volumen del tumor de los animales control (tratados con vehículo) al finalizar el tratamiento de 15 días.
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.

Los estudios realizados con los compuestos racémicos y con los enantiómeros de la presente invención demuestran que en todos los casos el enantiómero [-] tiene una mayor potencia antitumoral que las otras formas moleculares para inhibir el crecimiento de células de cáncer humano (A549, **Tabla 4**). En este sentido, las concentraciones que inhiben el crecimiento de células tumorales (IC₅₀) son inferiores para el enantiómero S ([-]) en todas las líneas tumorales estudiadas (**Tabla 5**). Por el contrario, estos compuestos no indujeron la muerte de células normales (MRC-5, IMR90). En todos los casos, las moléculas empleadas fueron la sal de sodio.

10

Tabla 4. Efecto de los compuestos de la invención sobre el crecimiento de células de cáncer de pulmón humano, A549

15

	IC ₅₀ (μM)		
	Racémico	[-]	[+]
2OH16:1	192.7±9.3	110.2±14.0*\$\$\$	299.0±34.2*
2OH18:1	94.1±8.8	52.6±9.5*\$\$\$	133.3±9.8*
2OH18:2	105.0±4.1	69.9±11.2*\$\$\$	186.3±21.9*
2OH18:3a	219.2±15.4	146.1±10.9*\$\$\$	351.4±22.7**
2OH18:3g	206.5±21.7	155±7.5*\$\$\$	341.8±31.5**

*P<0.05; **P<0.01: significativamente diferente respecto al racémico; \$\$\$P<0.001 respecto al enantiómero [+].

Ejemplo de referencia. 8. Regulación de los compuestos descritos en el presente documento sobre la actividad de la enzima EC 2.3.1.50.

20

Se incubaron células de glioma humano U118 en presencia o ausencia (control) de 2OHOA (200 μM, 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**).

25

30

Tabla 5. Efecto del 2OHOA racémico y sus enantiómeros sobre el crecimiento de varias líneas de diferentes tipos de cáncer humano. Valores de IC₅₀ (μM).

Línea Celular	Tipo de Cáncer	2OHOA Racémico	[-]2OHOA	[+]2OHOA
U118	Glioma (humano)	142.3	97.8	211.6
SF767	Glioma (humano)	214.8	102.1	304.1
U87	Glioma (humano)	81.6	53.5	148.3
SH-SY5Y	Neuroblastoma (humano)	119.1	64.4	193.4
A549	Cáncer pulmón (humano)	94.1	52.6	133.3
Jurkat	Leucemia (humano)	62.9	35.7	97.2
U937	Linfoma (humano)	183.2	136.3	213.5
HepG2	Cáncer hígado (humano)	41.4	32.9	76.7
MDA-MB-231	Cáncer de mama (humano)	243.7	145.2	328.0
PC3	Cáncer próstata (humano)	137.5	87.0	232.8
BXPC3	Cáncer de páncreas (humano)	98.3	61.8	154.1
HeLa	Cáncer de útero (humano)	126.8	74.5	205.7
HT29	Cáncer de colon (humano)	224.6	159.4	341.6
A375	Melanoma maligno (humano)	272.9	163.1	407.3
IMR90	Fibroblasto no tumoral (humano)	>5,000	>5,000	>5,000
MRC-5	Fibroblasto no tumoral (humano)	>5,000	>5,000	>5,000

5 Ejemplo de referencia. 9. Regulación de los compuestos descritos en el presente documento 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 μM, 24 h) y, posteriormente, en presencia de [³H]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

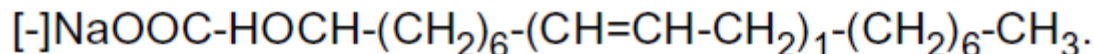
- Adam W, Lazarus M, Schmerder A, Humpf H.-U., Saha-Möller C. R., Schreier P (1998) Synthesis of Optically Active α-Hydroxy Acids by Kinetic Resolution Through Lipase-Catalyzed Enantioselective Acetylation, *Eur. J. Org. Chem.* 9:2013-2018-
- Albi, E. y M. V. Magni (1999). Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS Lett* **460**: 369-72.
- Alemany R, Terés S, Baamonde C, Benet M, Vögler O, Escribá PV. (2004) 2-hydroxyoleic acid: a new hypotensive molecule. *Hypertension*. **43**: 249-54.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Escribá PV (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **12**:34-43
- 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.
- Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fífre 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.

11. Huitema, K., et al. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J* **23**:33-44.
12. Jackson CL, Schwartz SM (1992) Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension* **20**: 713-716.
13. 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.
- 5 14. Jung UJ, Torrejon C, Tighe AP, Deckelbaum RJ. (2008). N-3 Fatty acids and cardiovascular disease mechanisms underlying beneficial effects. *Am J Clin Nutr*. **87**:2003S-2009S.
15. 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.
- 10 16. 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.
17. 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.
18. 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.
- 15 19. Sagin FG, Sozmen EY (2008) Lipids as key players in Alzheimer disease: alterations in metabolism and genetics. *Curr Alzheimer Res* 5:4-14.
- 20 20. Simons, K. y D. Toomre (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-9.
21. Sloan, F. A., Bethel, M. A, Ruiz, D. Jr., Shea, A. M & Feinglos, M. N. The growing burden of diabetes mellitus in the US elderly population. *Arch. Intern. Med.* **168**,192-199 (2008).
22. 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.
23. Stender S, Dyerberg J (2004) Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.* **48**:61-66.
- 25 24. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. (1985). Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* **58**:427-444.
25. Tafesse, F. G., P. Ternes, et al. (2006). The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* **281**(: 29421-5.
26. 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.* **165**:239-50.
- 30 27. 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.
- 35 28. 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.
29. 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 acids in the reduction of body weight in rats. *Int J Obes*. **32**: 464-473.
- 40 30. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Lichtman AH (2007) Combination of Rimonabant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology* 32: 1805-1812.
31. Yang, Q, Alemany, R, Casas, J, Kitajka, K, Lanier, SM, Escribá PV (2005) Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 68:210-7.

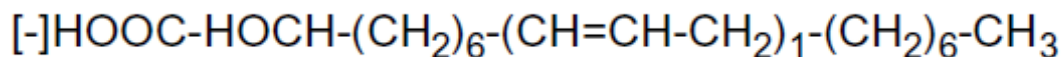
45

REIVINDICACIONES

1. Enantiómero [-] de fórmula:



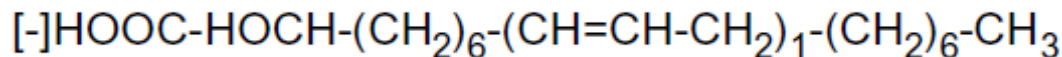
2. Composición farmacéutica que comprende un enantiómero caracterizado por la fórmula:



y/o al menos una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente, cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde la sal farmacéuticamente aceptable es [-]**NaOOC-HOCH**-(CH₂)₆-(CH=CH-CH₂)₁-(CH₂)₆-CH₃.

4. Enantiómero caracterizado por la fórmula:



o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento y/o prevención de patologías seleccionadas entre:

- i) cáncer; o
- ii) patologías vasculares; o
- iii) patologías metabólicas.

5. Enantiómero para uso, de acuerdo con la reivindicación 4, donde la sal farmacéuticamente aceptable es [-]**NaOOC-HOCH**-(CH₂)₆-(CH=CH-CH₂)₁-(CH₂)₆-CH₃.

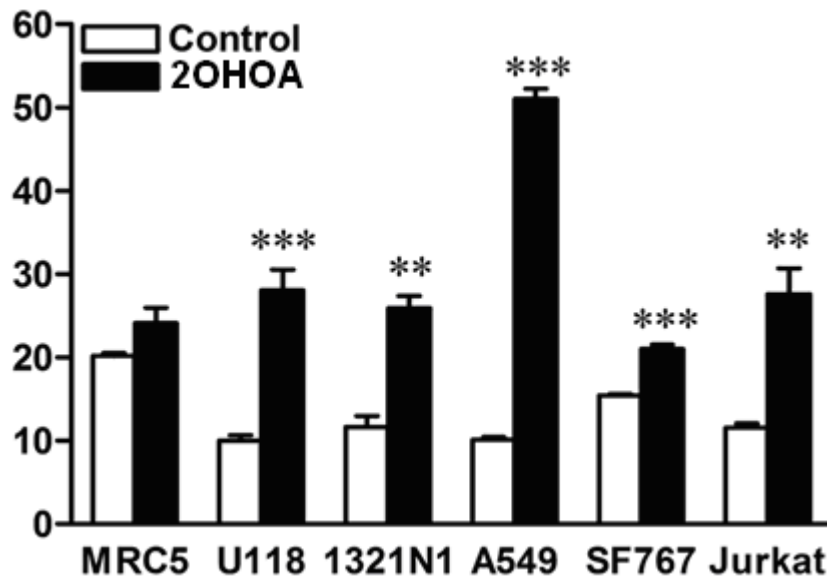
6. Enantiómero para uso, de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, donde el cáncer se selecciona entre: cáncer de hígado, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de cérvix, cáncer de colon, cáncer de cerebro o cáncer de pulmón.

7. Enantiómero para uso, de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, donde la patología vascular se selecciona entre: hipertensión, aterosclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardíaca.

8. Enantiómero para uso, de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, donde la patología metabólica se selecciona entre: diabetes, síndrome metabólico u obesidad.

FIGURA 1

A)



B)

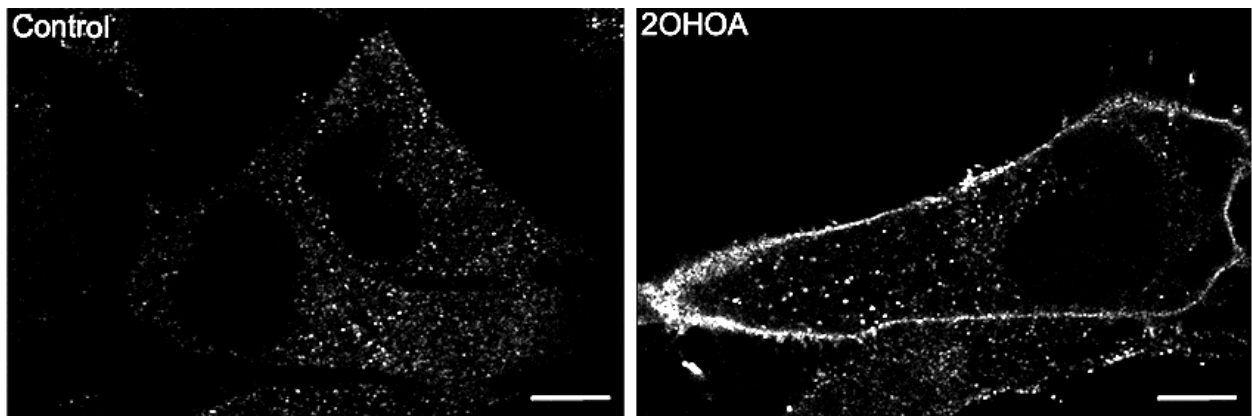
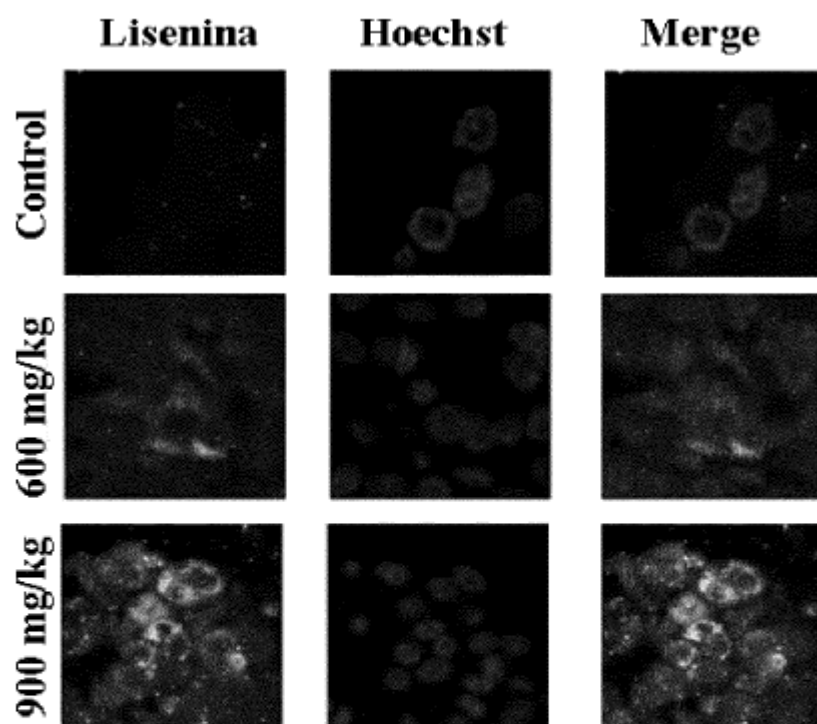


FIGURA 1 (cont.)

c)

Paneles superiores



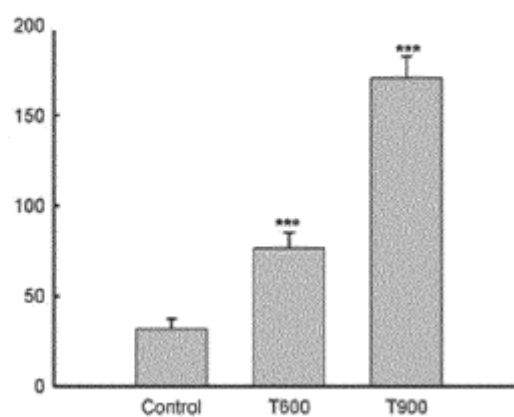
Paneles centrales



FIGURA 1 (cont.)

C)

Paneles inferiores



D)

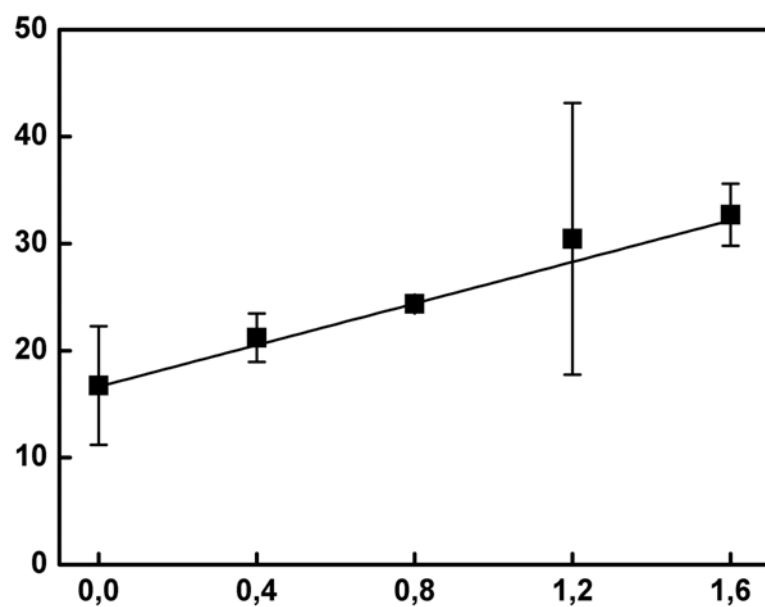
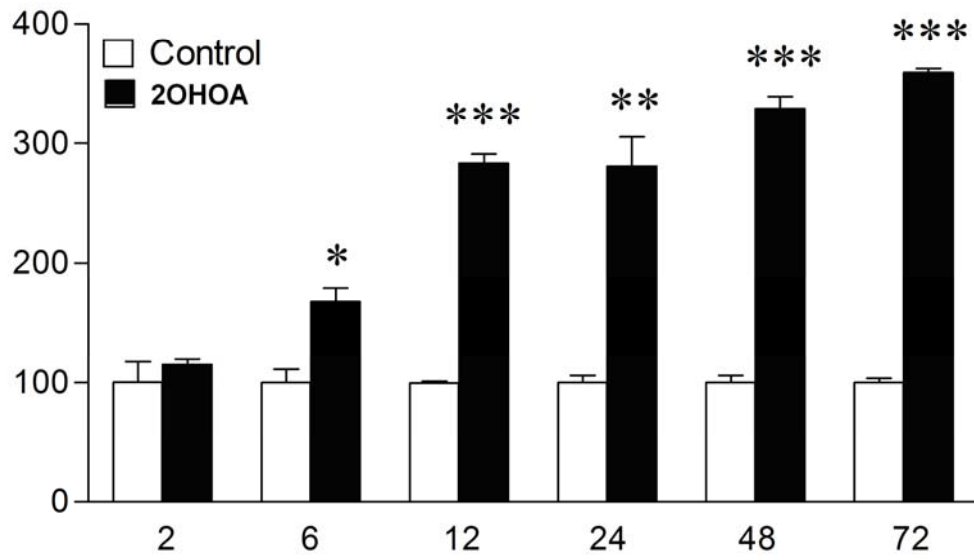


FIGURA 2

A)



B)

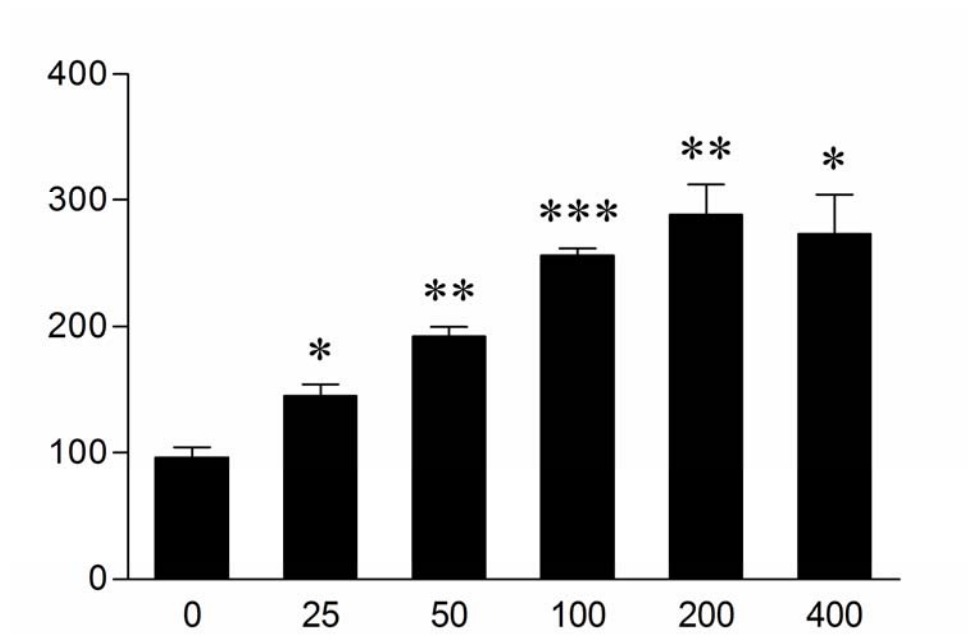


FIGURA 3

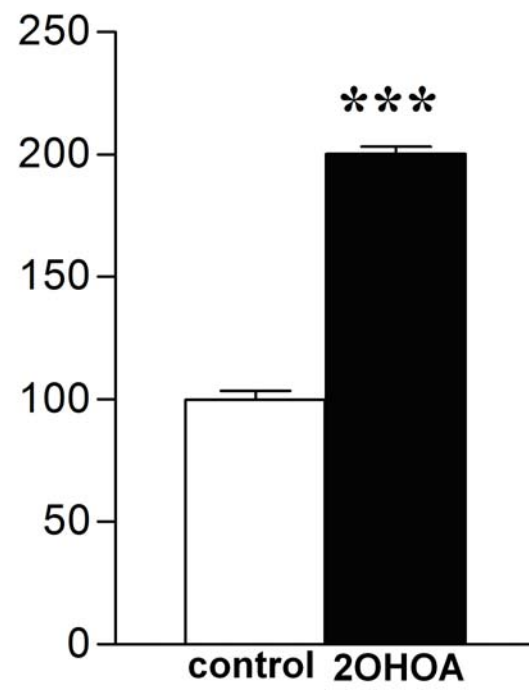
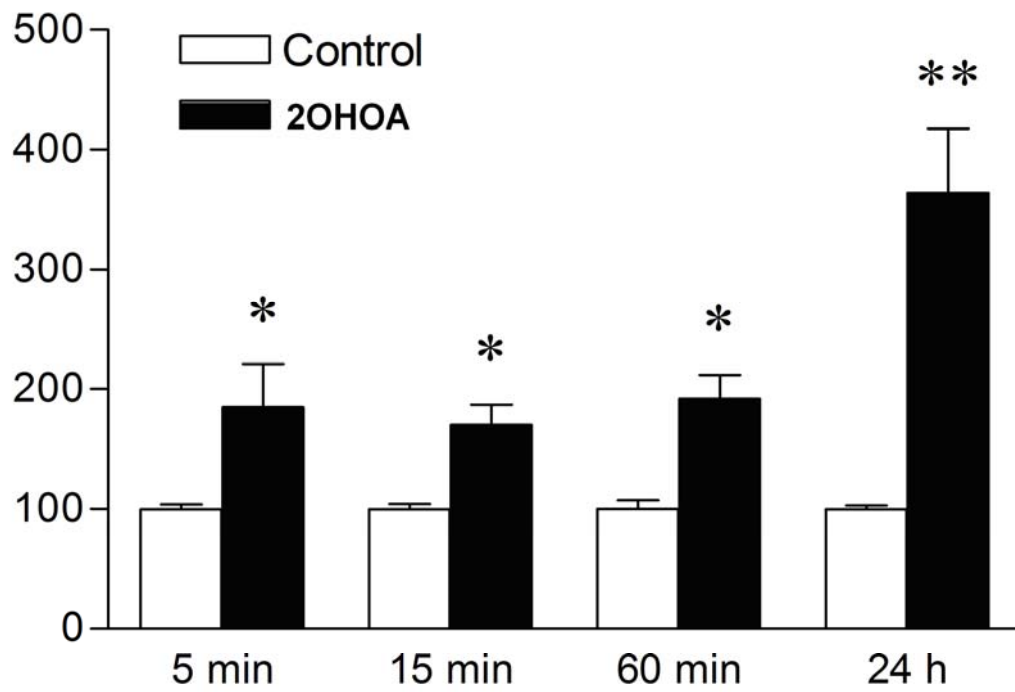


FIGURA 4

A)



B)

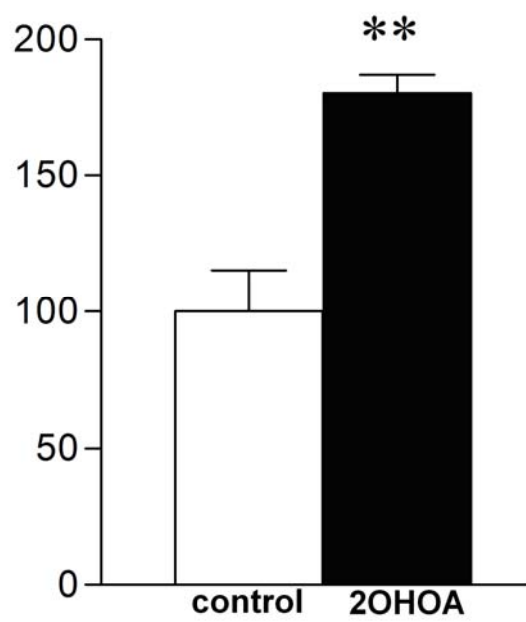


FIGURA 4 (cont.)

c)

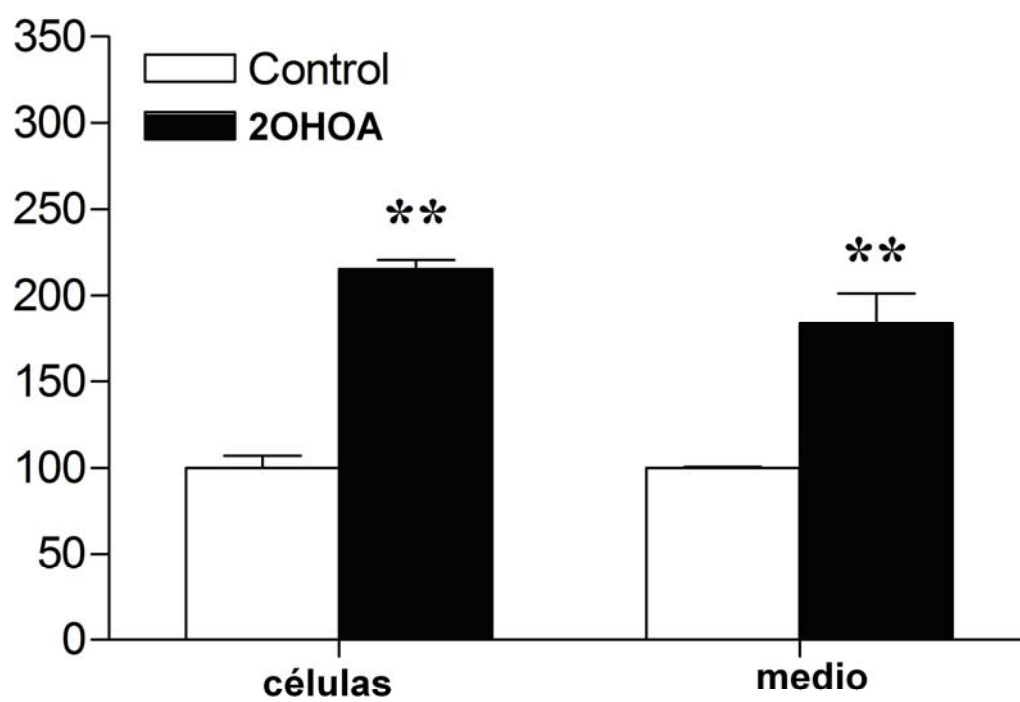


FIGURA 5

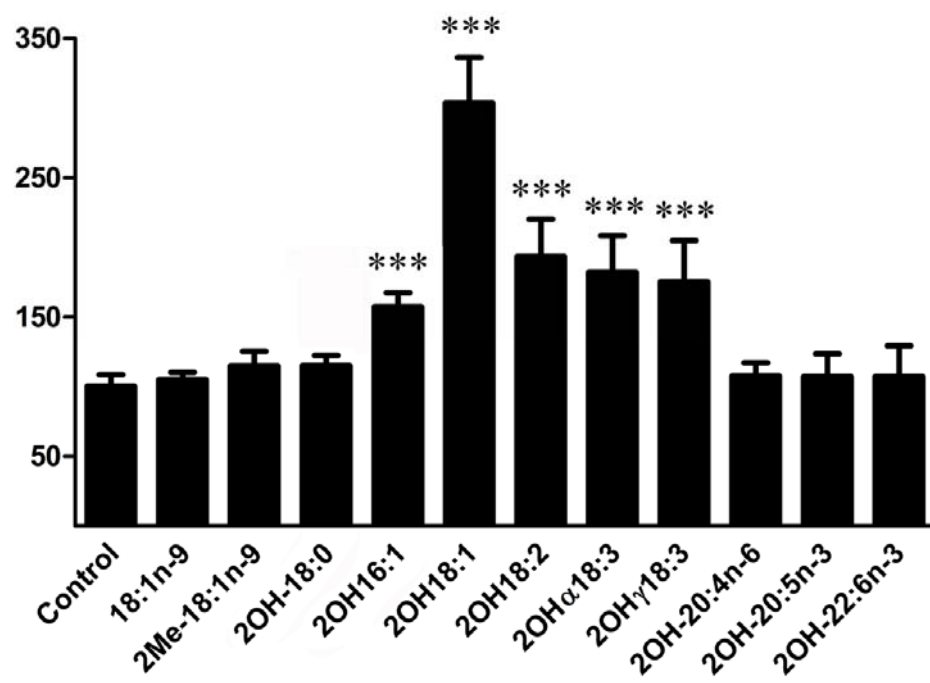
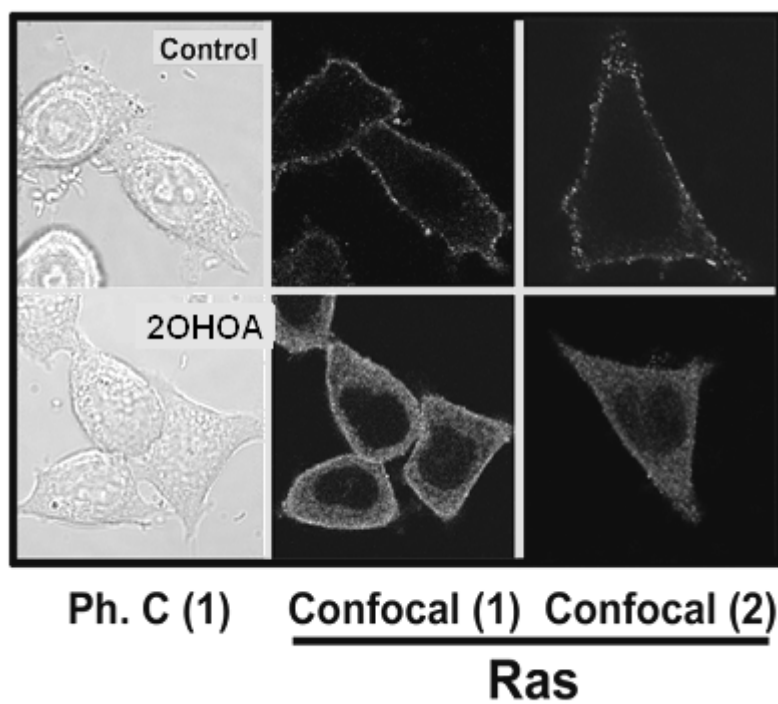


FIGURA 6

A)



B)

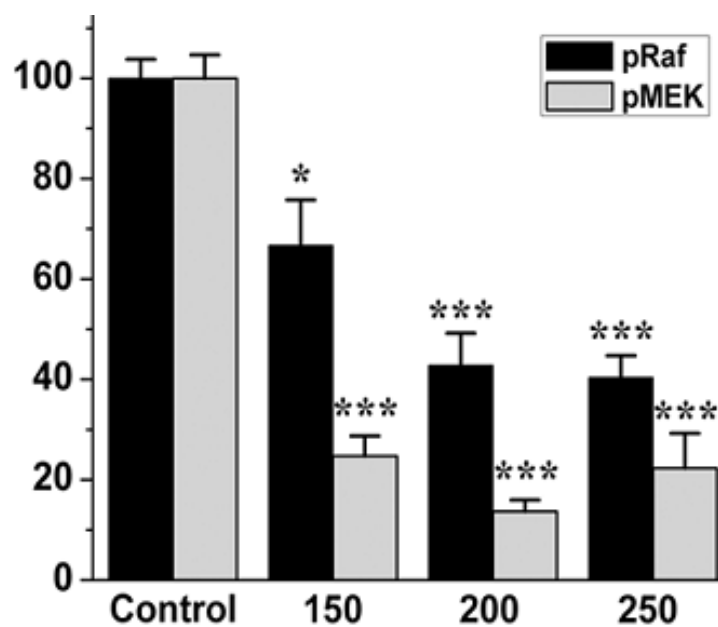
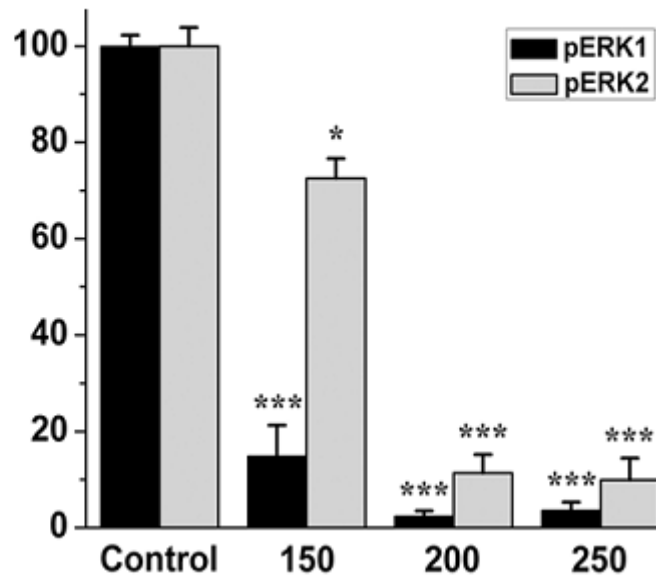


FIGURA 6 (cont.)

C)



D)

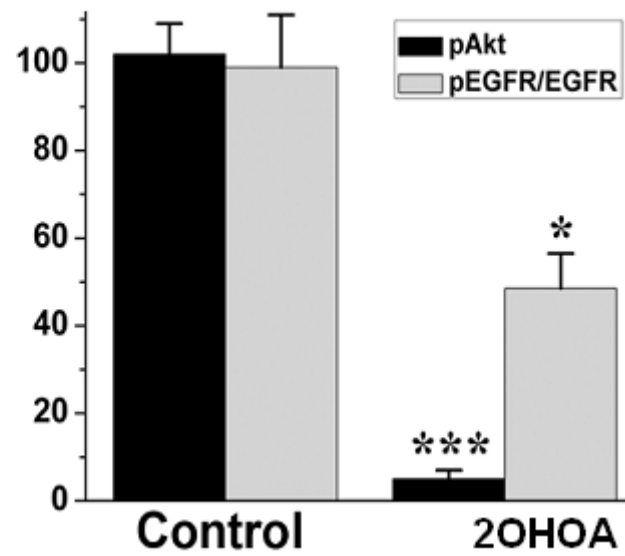
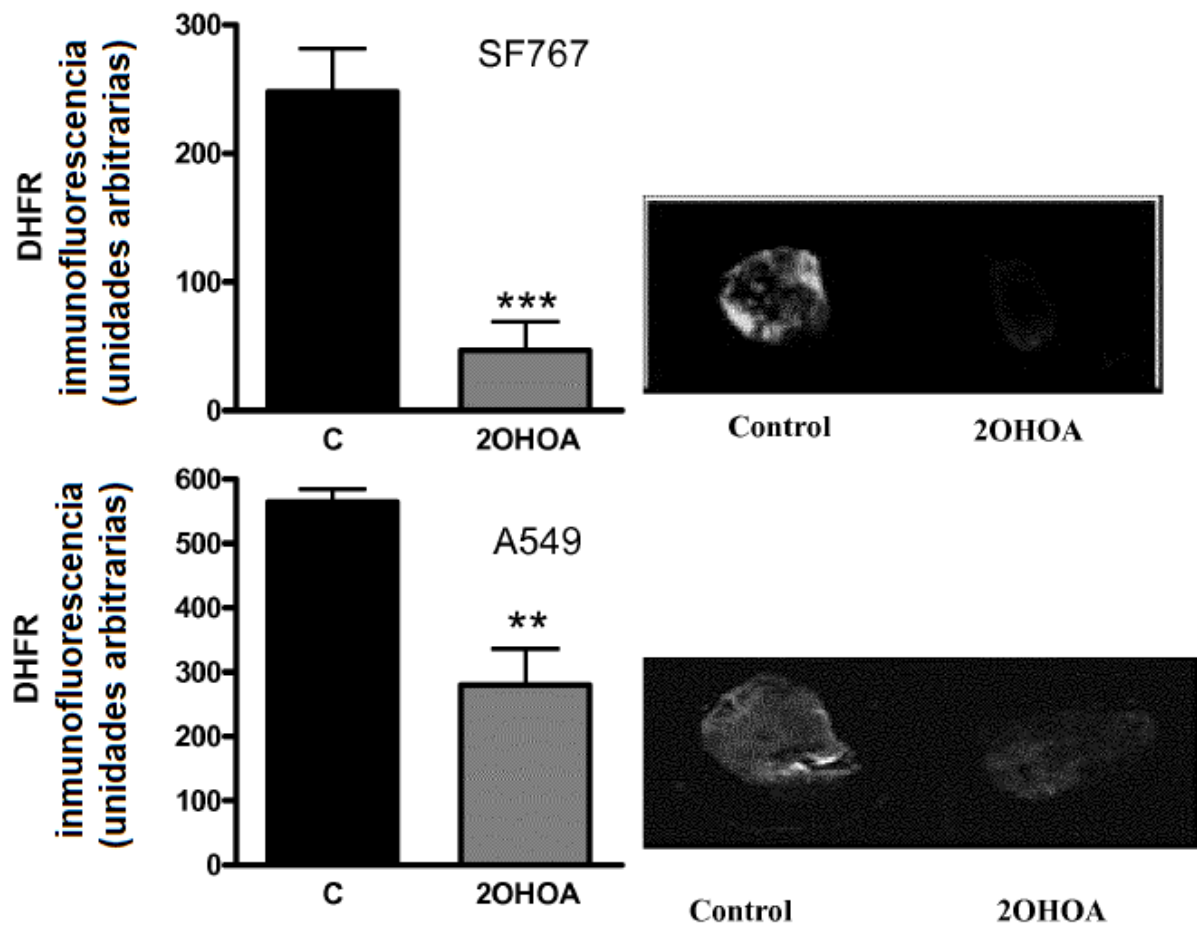


FIGURA 6 (cont.)

E)



F)

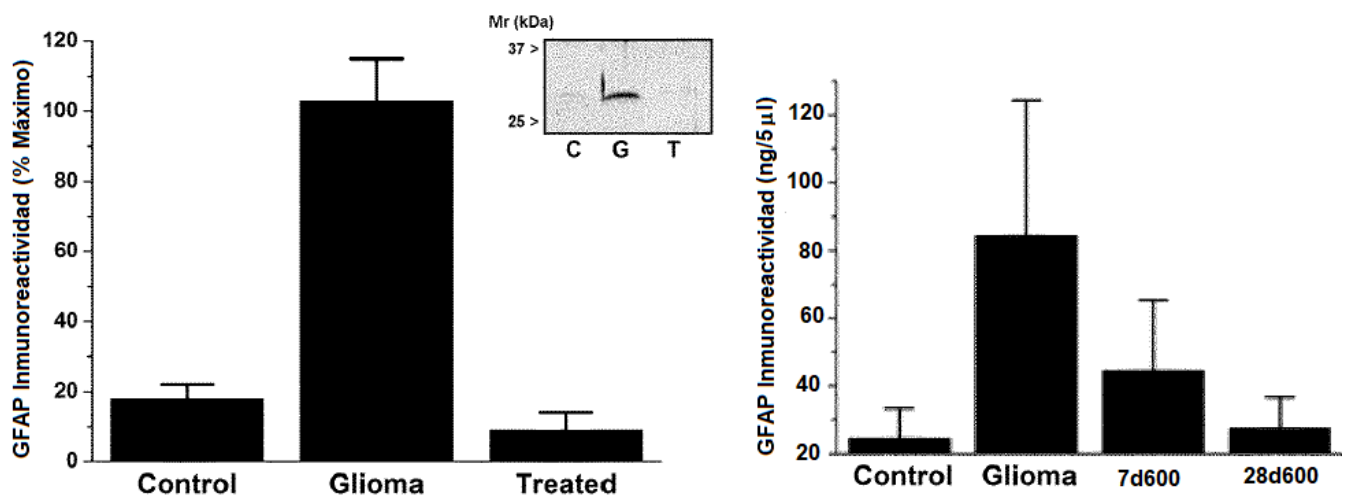
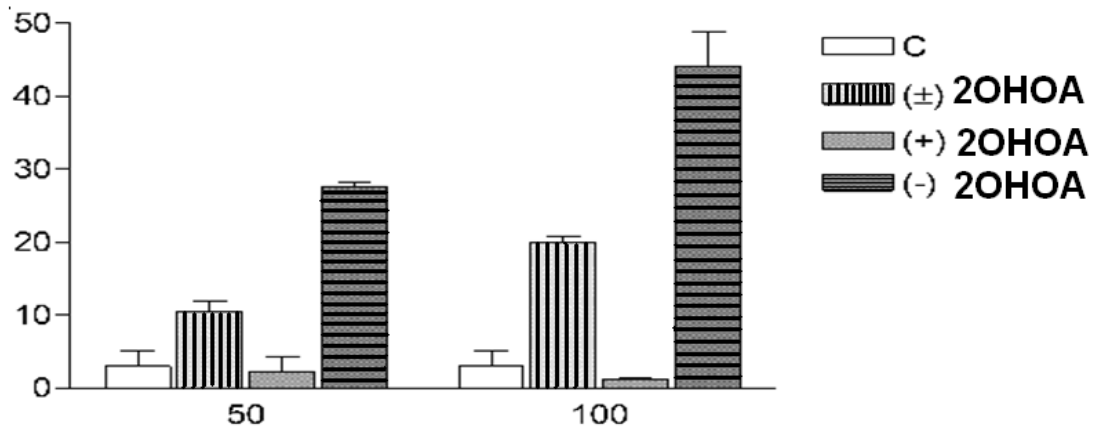


FIGURA 7

A)



B)

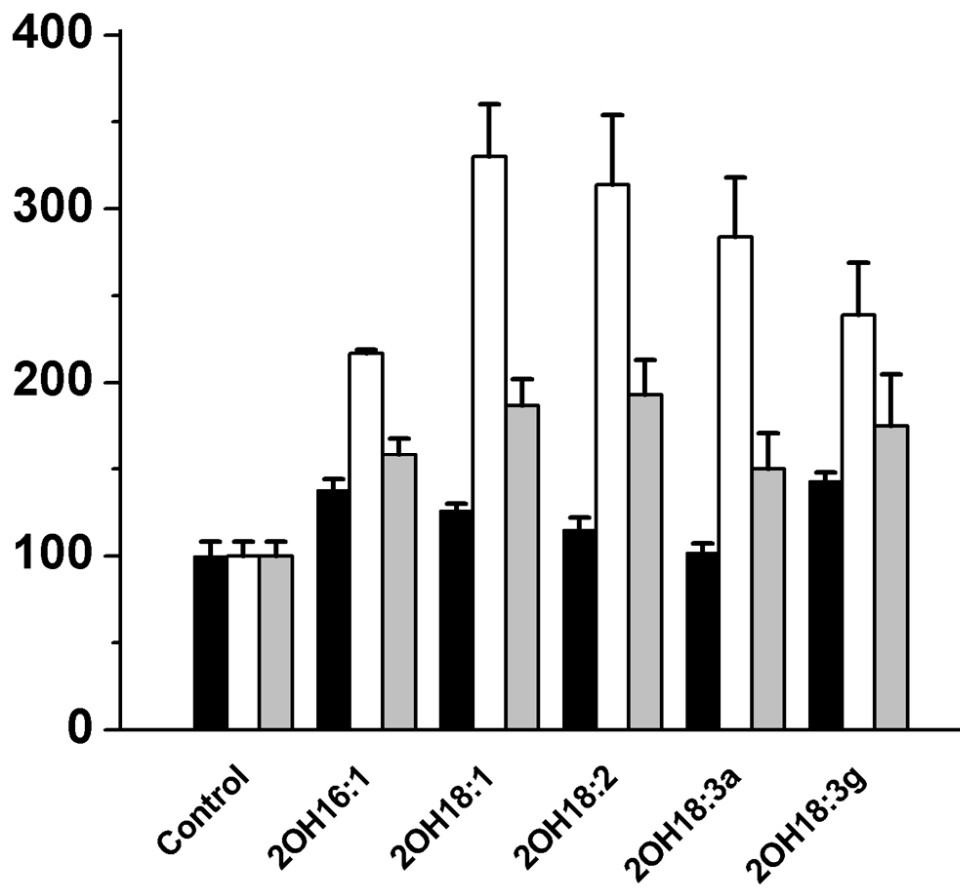
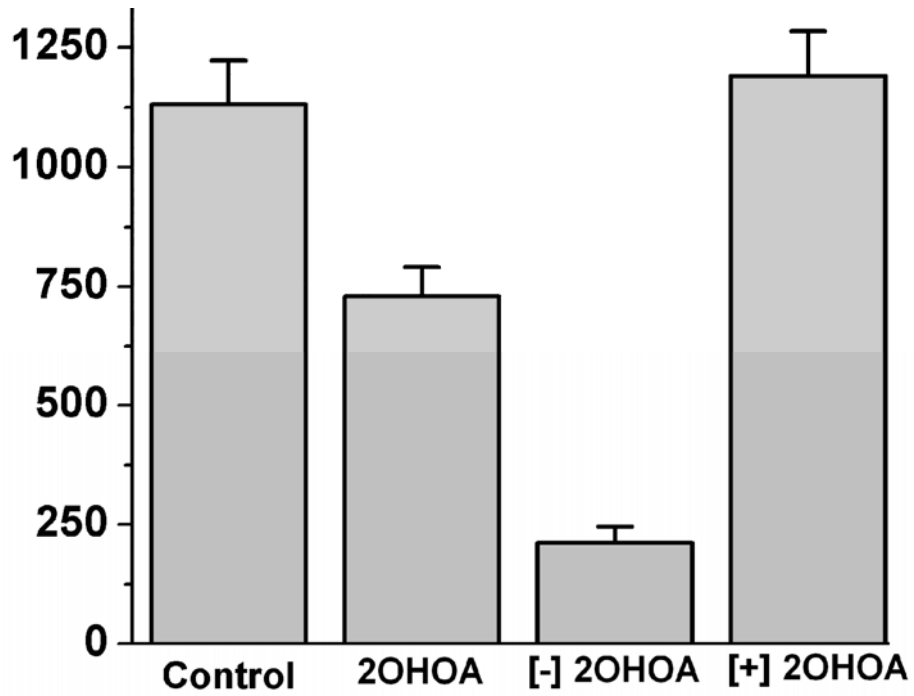


FIGURA 8

A)



B)

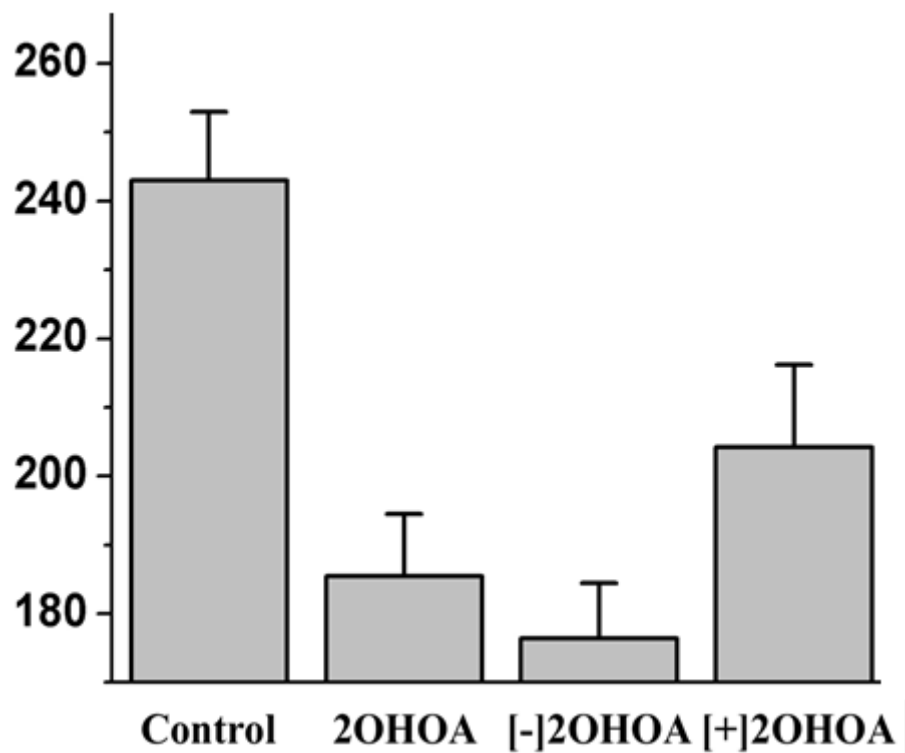


FIGURA 8 (cont.)

c)

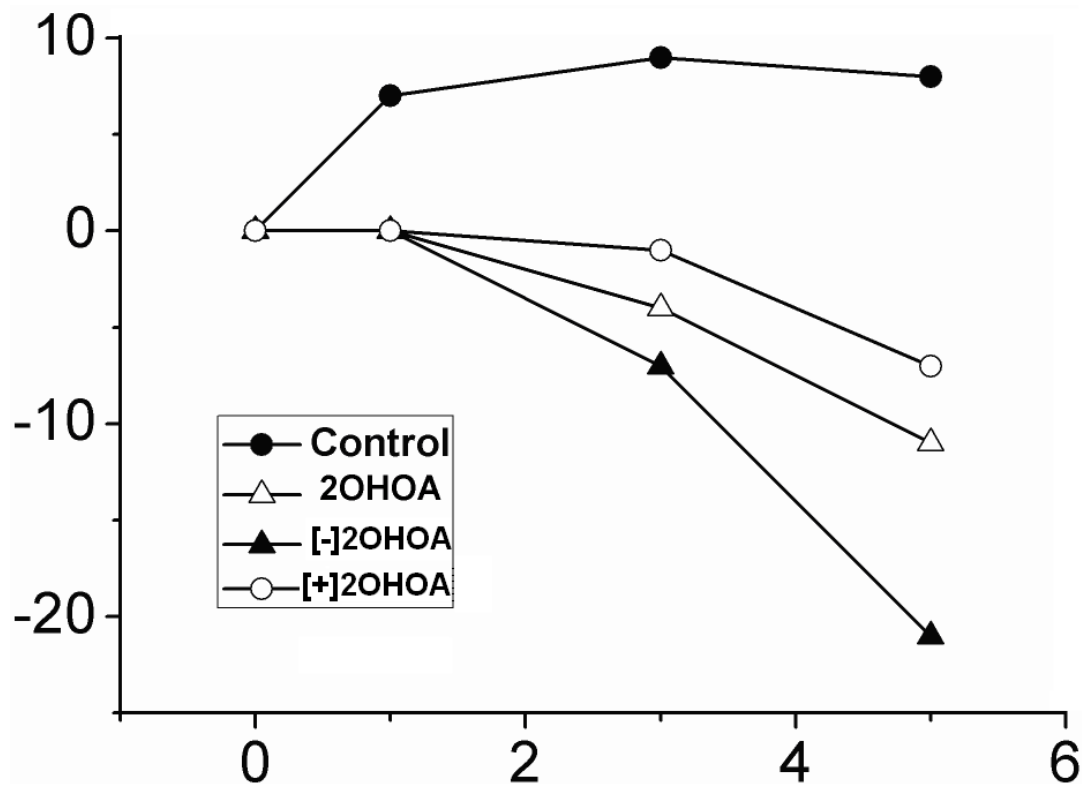


FIGURA 8 (Cont.)

D)

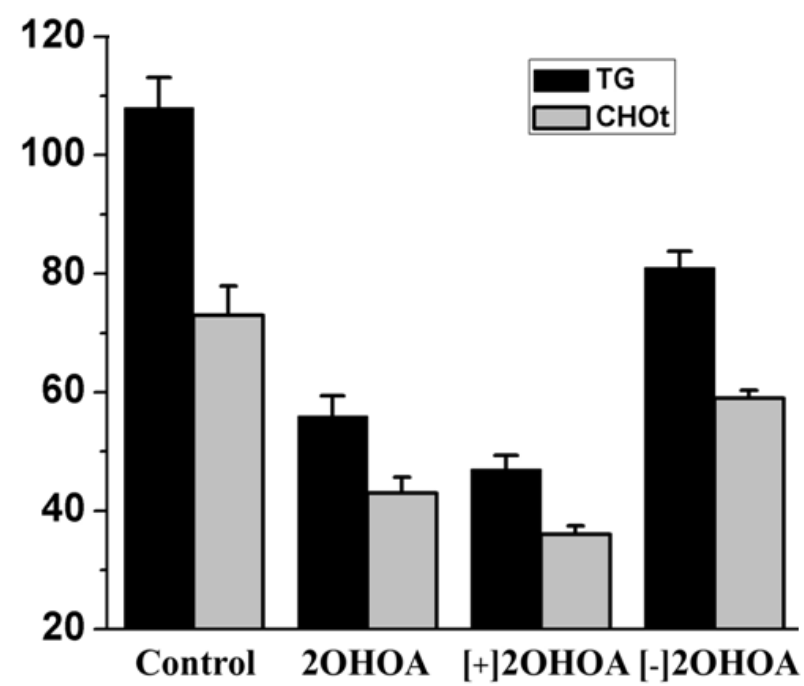


FIGURA 8 (cont.)

E)

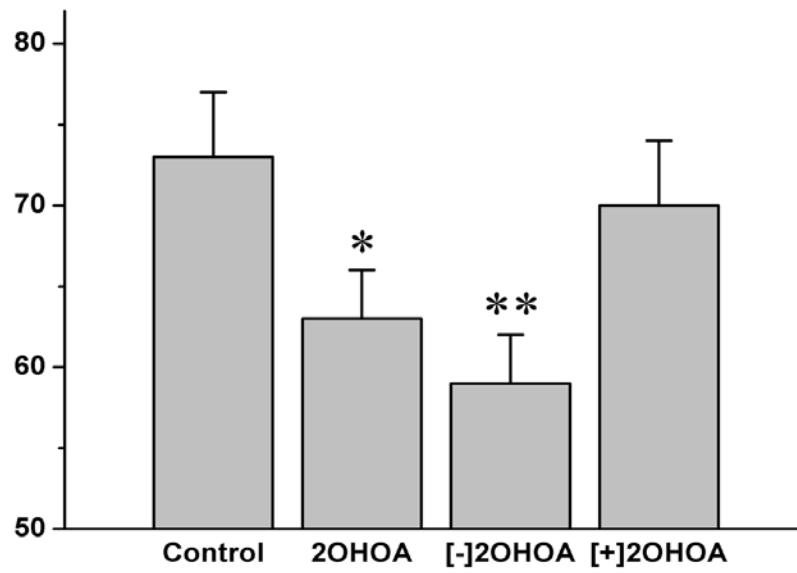


FIGURA 9

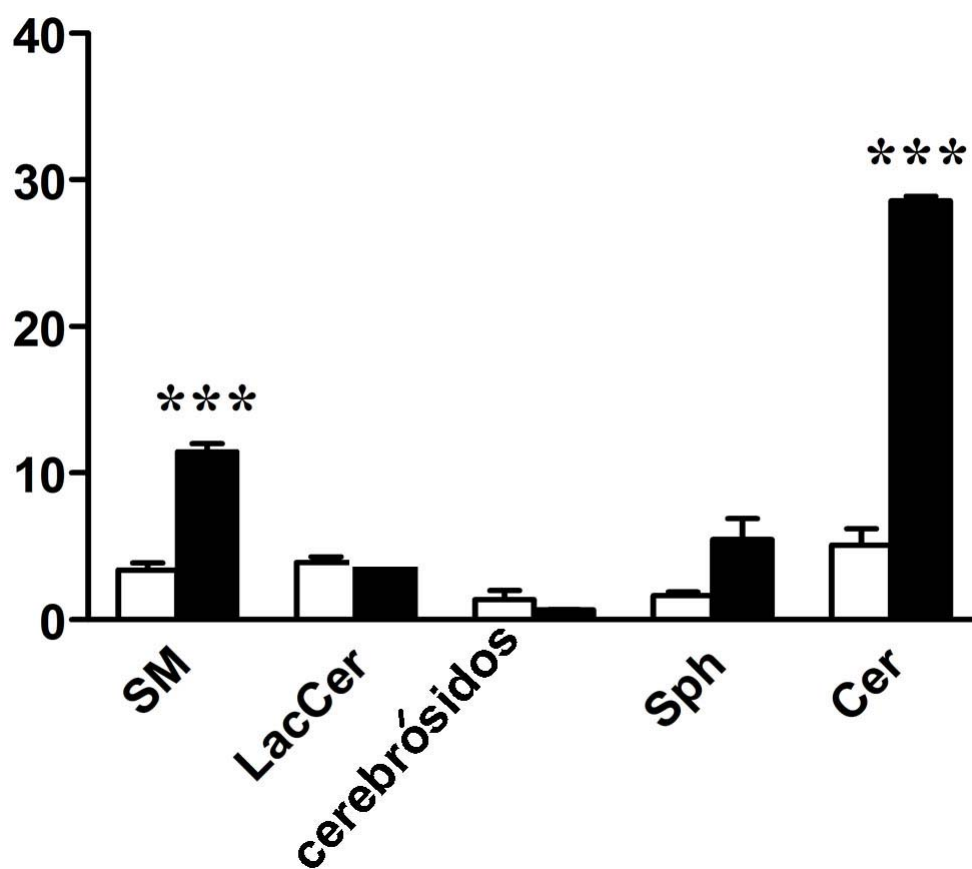
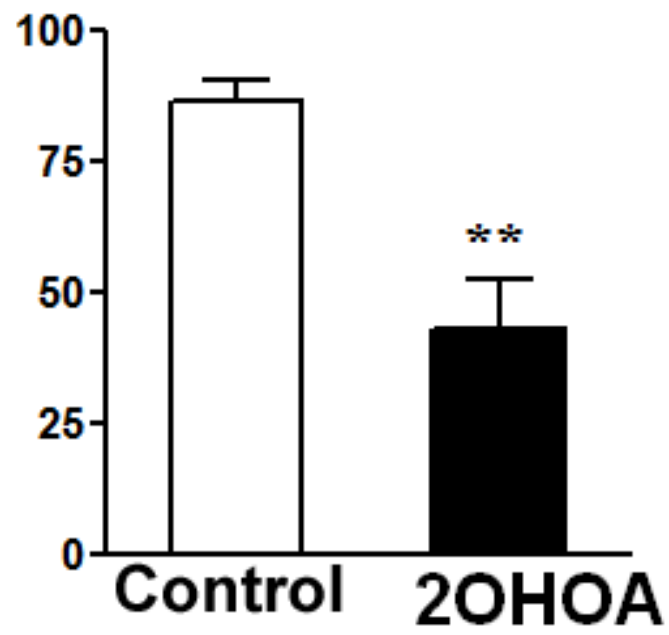


FIGURA 10



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EC 27827 [0003]
- EP 1435235 A1 [0009]
- WO 2010066931 A1 [0009]

Literatura no patente citada en la descripción

- ADAMW ; LAZARUS M ; SCHMERDERA ; HUMPF H.-U. ; SAHA-MÖLLER C. R. ; SCHREIER P. Synthesis of Optically Active α -Hydroxy Acids by Kinetic Resolution Through Lipase-Catalyzed Enantioselective Acetylation. *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, vol. 9, 2013-2018 [0097]
- ALBI, E ; M. V. MAGN. Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS Lett*, 1999, vol. 460, 369-72 [0097]
- ALEMANY R ; TERÉS S ; BAAMONDE C ; BENET M ; VÖGLER O ; ESCRIBÁ PV. 2-hydroxyoleic acid: a new hypotensive molecule. *Hypertension.*, 2004, vol. 43, 249-54 [0097]
- ALEMANY R ; PERONA JS ; SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ JM ; MONTERO E ; CAÑIZARES J ; BREZAN R ; ESCRIBÁ PV ; RUIZ-GUTIÉRREZ V. G protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. *BBA Biomembr*, 2007, vol. 1768, 964-975 [0097]
- BUDA C ; DEY I ; BALOGH N ; HORVATH LI ; MADERSPACH K ; JUHASZ M ; YEO YK ; FARKAS T. Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994, vol. 91, 8234-8238 [0097]
- ESCRIBA PV ; SASTRE M ; GARCIA-SEVILLA JA. Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1995, vol. 92, 7595-7599 [0097]
- ESCRIBA PV ; OZAITA A ; RIBAS C ; MIRALLES A ; FODOR E ; FARKAS T ; GARCIA-SEVILLA JA. Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1997, vol. 94, 11375-11380 [0097]
- ESCRIBÁ PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.*, 2006, vol. 12, 34-43 [0097]
- ESCRIBÁ PV ; GONZÁLEZ-ROS JM ; GOÑI FM ; KINNUNEN PKJ ; VIGH L ; SANCHEZ-MAGRANER L ; FERNÁNDEZ AM ; BUSQUETS X ; HORVÁTH I ; BARCELÓ-COBLIJN G. Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell. Mol. Med.*, 2008, vol. 12, 829-875 [0097]
- FLORENT S ; MALAPLATE-ARMAND C ; YOUSSEF I ; KRIEM B ; KOZIEL V ; ESCANYÉ MC ; FIFRE A ; SPONNE I ; LEININGER-MULLER B ; OLIVIER JL. Docosahexanoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem.*, 2006, vol. 96, 385-95 [0097]
- HUITEMA, K. et al. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J*, 2004, vol. 23, 33-44 [0097]
- JACKSON CL ; SCHWARTZ SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*, 1992, vol. 20, 713-716 [0097]
- JIANG Q et al. Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Int J Cancer*, 2011 [0097]
- JUNG UJ ; TORREJON C ; TIGHE AP ; DECKELBAUM RJ. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease mechanisms underlying beneficial effects. *Am J Clin Nutr.*, 2008, vol. 87, 2003S-2009S [0097]
- LANE RM ; FARLOW MR. Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res.*, 2005, vol. 46, 949-968 [0097]
- LLADÓ V ; GUTIERREZ A ; MARTINEZ J et al. Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J. Cell Mol Med.*, 2010, vol. 13, 1-12 [0097]
- MARTÍNEZ J, O ; CASAS J, F ; ALEMANY R ; PRADES J ; NAGY T ; BAAMONDE C ; KASPRZYK P ; TERÉS S ; SAUS C ; ESCRIBÁ PV. Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of minerval. *Mol Pharmacol*, 2005, vol. 67, 531-40 [0097]

- PERONA JS ; VÖGLER O ; SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ JM ; MONTERO E ; ESCRIBÁ PV ; RUIZ-GUTIERREZ EV. 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*, 2007, vol. 62, 256-263 [0097]
- SAGIN FG ; SOZMEN EY. Lipids as key players in Alzheimer disease: alterations in metabolism and genetics. *Curr Alzheimer Res*, 2008, vol. 5, 4-14 [0097]
- SIMONS, K. ; D. TOOMRE. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, vol. 1, 31-9 [0097]
- SLOAN, F.A. ; BETHEL, M.A. ; RUIZ, D. JR. ; SHEA, A. M ; FEINGLOS, M. N. The growing burden of diabetes mellitus in the US elderly population. *Arch. Intern. Med.*, 2008, vol. 168, 192-199 [0097]
- SLOMIANY A ; MURTY VL ; AONO M ; SNYDER CE ; HERP A ; SLOMIANY BL. Lipid composition of tracheobronchial secretions from normal individuals and patients with cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1982, vol. 10, 106-111 [0097]
- STENDER S ; DYERBERG J. Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.*, 2004, vol. 48, 61-66 [0097]
- SCHWARTZ SM ; CAMPBELL GR ; CAMPBELL JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*, 1985, vol. 58, 427-444 [0097]
- TAFESSE, F. G. ; P. TERNES et al. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem*, 2006, vol. 281, 29421-5 [0097]
- TROMBETTA A ; MAGGIORA M ; MARTINASSO G ; COTOGNI P ; CANUTO RA ; MUZIO G. Arachidonic and docosahexanoic acids reduce the growth of A549 human lung tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. *Chem Biol Interact.*, 2007, vol. 165, 239-50 [0097]
- VAN HELVOORT, A. ; W. VAN'T HOF et al. 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*, 1994, vol. 269, 1763-9 [0097]
- VÖGLER O ; CASAS J ; CAPÓ D ; NAGY T ; BORCHERT G ; MARTORELL G ; ESCRIBÁ PV. The G betagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures. *J Biol Chem.*, 2004, vol. 279, 36540-36545 [0097]
- VÖGLER O ; LÓPEZ-BELLAN A ; ALEMANY R ; TOFÉ S ; GONZÁLEZ M ; QUEVEDO J ; PEREG V ; BARCELÓ F ; ESCRIBÁ PV. Structure-effect relation of C18 long-chain fatty acids in the reduction of body weight in rats. *Int J Obes.*, 2008, vol. 32, 464-473 [0097]
- WISE LE ; IREDALE PA ; STOKES RJ ; LITCHMAN AH. Combination of Rimonabant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology*, 2007, vol. 32, 1805-1812 [0097]
- YANG, Q ; ALEMANY, R ; CASAS, J ; KITAJKA, K ; LANIER, SM ; ESCRIBÁ PV. Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 2005, vol. 68, 210-7 [0097]