

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 303**

51 Int. Cl.:
A61K 31/557 (2006.01)
A61K 31/121 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03704739 .6**
96 Fecha de presentación: **29.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1469859**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54 Título: **Uso de cetonas poliinsaturadas para el tratamiento de la psoriasis**

30 Prioridad:
29.01.2002 GB 0202002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2012

73 Titular/es:
**AVEXXIN AS
NORDAHL BRUNS VEI 2A
7052 TRONDHEIM, NO**

72 Inventor/es:
**JOHANSEN, Berit;
ANTHONSEN, Marit;
SJURSEN, Wenche;
HOLMEIDE, Anne Kristen y
SKATTEBOL, Lars**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 378 303 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de cetonas poliinsaturadas para el tratamiento de la psoriasis

5 Esta invención se refiere al uso de determinadas cetonas poliinsaturadas de cadena larga para el tratamiento de la psoriasis y, en particular, a cetonas portadoras de grupos sustituyentes aceptores de electrones en la posición alfa con respecto a la funcionalidad carbonilo en dicho tratamiento.

10 La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica frecuente. El tejido psoriásico se caracteriza por inflamación crónica tanto en la epidermis como en la dermis, caracterizándose la enfermedad además por hiperplasia de los queratinocitos epidérmicos, activación de fibroblastos, alteración del metabolismo de eicosanoides e infiltración de leucocitos.

15 Los tratamientos eficaces para la psoriasis, como la ciclosporina A, esteroides, metotrexato y fotoquimioterapia, tienen todos ellos actividad inmunodepresora y, por tanto, no son tratamientos ideales debido a sus efectos adversos. En consecuencia, los científicos han buscado otros posibles tratamientos para esta enfermedad.

20 Se ha observado que el tejido psoriásico muestra niveles elevados de ácido araquidónico y eicosanoides. Esto sugiere que la fosfolipasa A₂ (PLA₂) puede estar implicada en la patogénesis de la psoriasis.

25 Las fosfolipasas son un grupo de enzimas que liberan ácidos grasos insaturados de la posición sn2 de los fosfolípidos de membrana. Una vez liberados, los ácidos grasos se convierten por la acción de varias enzimas en moléculas de señalización biológicamente muy importantes. La liberación de araquidonato inicia la cascada del araquidonato que lleva a la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas. Los eicosanoides son importantes en diversos procesos fisiológicos y tienen una función principal en la inflamación. En el Vol. 18, N° 1 1994 de Inflammation, Andersen y col. identifican la presencia de determinadas fosfolipasas en la piel humana psoriásica.

30 Por tanto, se considera que la inhibición de las enzimas fosfolipasas debe tener potencial para curar algunos de los síntomas inflamatorios, incluida la hiperproliferación epidérmica debida al aumento de la producción de leucotrienos, relacionada con la producción de eicosanoides y la activación celular tanto en la epidermis como en la dermis en el caso de la psoriasis.

35 En el documento WO00/02561, los inventores describen un procedimiento para modificar la vasoactividad regulando una ruta de A β -proinflamatoria soluble. El regulador es oleiloxietilfosforilcolina.

En Sagami Chem Res Centre del 14 de octubre de 1997, los autores describen inhibidores selectivos de la fosfolipasa A₂ citosólica o secretora como bloqueantes de la activación inducida por TNF de NF- κ B y la expresión de ICAM-1. En particular, los autores apuntan que AACOCF₃ y EPACOCF₃ pueden inhibir la cPLA₂.

40 En J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2000, 2271-2276 se publicaron varios compuestos estructuralmente diferentes como inhibidores de la cPLA₂ *in vitro*. Los compuestos probados se basaban en los ácidos (todo-Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentanoico (EPA) y (todo-Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA). En el artículo se sugiere que los estudios preliminares muestran que *in vitro* los compuestos son activos como inhibidores de enzimas.

45 Sin embargo, los compuestos de J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2000, 2271-2276, no se han probado *in vivo* y, por tanto, no existe forma de predecir sus efectos *in vivo*. Además, cuando se idea un tratamiento para una enfermedad es necesario asegurar su selectividad. Se conoce una gran cantidad de enzimas fosfolipasas y se están descubriendo más enzimas de este tipo como consecuencia del desarrollo de las ciencias médicas. Puesto que las fosfolipasas controlan una amplia variedad de funciones intracelulares diferentes es necesario desarrollar inhibidores de estas enzimas que sean selectivos para la fosfolipasa en particular, cuya actividad se desea alterar. Los compuestos que inhiben un gran número de enzimas fosfolipasas son de escaso interés comercial, ya que a los beneficios de una inhibición enzimática deseada se opondrá la presencia de muchos efectos adversos no deseados y potencialmente peligrosos causados por inhibiciones enzimáticas no deseadas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar inhibidores altamente selectivos de las enzimas fosfolipasas.

55 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que compuestos de estructura similar hasta cierto punto o con la misma estructura de los identificados en el artículo de Perkin Transactions son selectivos de las enzimas PLA del grupo IVa y, por tanto, candidatos ideales para el tratamiento de la psoriasis en ausencia de efectos adversos. Dado que existen un total de 23 enzimas en el grupo de la fosfolipasa y que cada enzima cumple con una función fisiología y patología diferente, esto es sorprendente. Además, se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de la invención son especialmente potentes para reducir la producción de eicosanoides mediante, por ejemplo, la inhibición de las PLA₂ del grupo IVa.

60 Por tanto, visto desde un aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I)

65

R-CO-X (I)

5 donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C₁₆₋₂₄ interrumpido en β en relación con el grupo carbonilo por un heteroátomo o grupo de heteroátomos seleccionados entre S, O, N, SO, SO₂, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 5 enlaces dobles no conjugados y X es un grupo aceptor de electrones seleccionado entre CHal₃, CHHal₂ o CHalH₂ en el que

Hal representa un halógeno para el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis.

10 Visto aún desde otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I)

R-CO-X (I)

15 donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C₁₆₋₂₄ interrumpido en β en relación con el grupo carbonilo por un heteroátomo o grupo de heteroátomos seleccionados entre S, O, N, SO, SO₂, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 5 enlaces dobles no conjugados y X es un grupo aceptor de electrones seleccionado entre CHal₃, CHHal₂ o CHalH₂ en el que Hal representa un halógeno y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

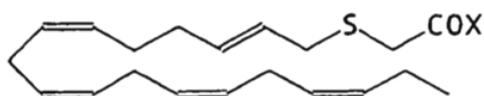
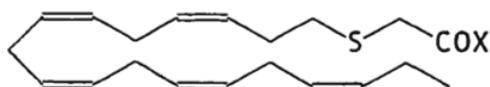
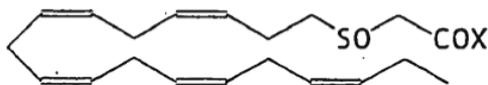
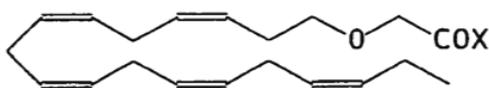
20 El grupo R comprende preferiblemente de 5 a 7 enlaces dobles, preferiblemente 5 ó 6 enlaces dobles, por ejemplo, 5 enlaces dobles que no deben estar conjugados. También se prefiere que los enlaces dobles no estén conjugados con la funcionalidad carbonilo.

25 Los enlaces dobles presentes en el grupo R pueden estar en configuración cis o trans, sin embargo, se prefiere que la mayoría de los enlaces dobles presentes (es decir, al menos el 50 %) estén en configuración cis. En realizaciones ventajosas adicionales todos los enlaces dobles en el grupo R están en configuración cis o todos los enlaces dobles están en configuración cis excepto el doble enlace más próximo al grupo carbonilo que puede estar en la configuración trans.

30 El grupo R puede tener entre 16 y 24 átomos de carbono.

El grupo R lleva un heteroátomo o grupo de heteroátomos colocados en posición β en relación con el grupo carbonilo. Preferiblemente, el heteroátomo es O o S, o un derivado de azufre como SO.

35 Los grupos RCOX específicamente preferidos son los de las fórmulas



seleccionados a partir de halo o alquilo C₁₋₆. Si están presentes, los sustituyentes son preferiblemente no polares y pequeños, por ejemplo, un grupo metilo. Sin embargo, es preferible si el grupo R permanece sin sustituir.

5 El grupo X es un grupo aceptor de electrones, CHal₃, CHal₂H, CHalH₂, donde Hal representa un halógeno, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor.

En una realización preferida, el grupo aceptor de electrones es CHal₃, específicamente CF₃.

10 Los compuestos altamente preferidos para el uso en la invención son EPASCOF₃ y AKH 217, que se muestran a continuación.

15 Los compuestos de fórmula (I) pueden producirse usando rutas de síntesis química conocidas. Es conveniente iniciar la síntesis a partir de los compuestos de ácido araquidónico, EPA o DHA disponibles en el mercado. La conversión de la funcionalidad del ácido de estos compuestos en, por ejemplo, un grupo -COF₃ puede lograrse fácilmente, por ejemplo, convirtiendo el ácido carboxílico en su correspondiente cloruro de ácido y haciendo reaccionar al mismo con anhídrido de trifluoroacético en presencia de piridina.

20 También se consigue fácilmente la introducción de un heteroátomo dentro de la cadena de carbono. De forma conveniente, por ejemplo, el ácido inicial se reduce a un alcohol y, si es necesario, se convierte en el tiol correspondiente. El tiol nucleofílico puede reaccionar a continuación con un grupo como BrCH₂COF₃ introduciendo, de este modo, el carbonilo y las especiesceptoras de electrones. Pueden encontrarse protocolos de síntesis completos en J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 2000, 2271-2276 o J. Immunol., 1998, 161, 3421.

25 Los compuestos de fórmula (I) pueden estar formulados en medicamentos usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en química farmacéutica. Por tanto, los compuestos pueden formularse con excipientes o vehículos farmacéuticos bien conocidos.

30 Los medicamentos de la invención también pueden comprender otros aditivos convencionales como antioxidantes, conservantes, colorantes, aromatizantes, etc.

35 Los medicamentos de la invención pueden formularse como comprimidos, pastillas, polvo, cápsulas, emulsiones, etc., aunque están preferiblemente en forma de cremas o pomadas. El modo de administración puede ser cualquier modo conocido, como oral, nasal, transmucoso, parenteral, tópico, intradérmico, etc. Sin embargo, resulta ventajoso si el medicamento se aplica por vía tópica, es decir, directamente sobre la parte infectada de la piel humana.

La cantidad de medicamento necesaria para que tenga efecto como tratamiento eficaz dependerá, por supuesto, del paciente y de la gravedad de la psoriasis. Un experto en química determinará fácilmente la dosis.

40 Los compuestos de la invención pueden usarse para tratar la psoriasis en combinación con otros compuestos farmacéuticos conocidos para dicho objetivo y esto constituye un aspecto adicional de la invención.

A continuación, la invención se describe adicionalmente en referencia a los ejemplos y figuras siguientes no limitantes.

45 En la figura 1 se muestra la inhibición relativa de la actividad de la enzima PLA₂ IVa por diversos compuestos de la invención en comparación con compuestos comerciales. La enzima PLA₂ IVa recombinante se incubó previamente con el inhibidor (5 μM) durante 10 minutos y, a continuación, se analizó en el ensayo de actividad enzimática en micelas mixtas. El control consistía en la ausencia de tratamiento previo con el inhibidor. Los resultados se dan como % del control y representan la media de determinaciones duplicadas de 1 de 4 experimentos representativos.

50 En la figura 2 se muestra la inhibición dependiente de la concentración de PLA₂ IVa en el ensayo de actividad enzimática de micelas mixtas. En la figura B se muestra un aumento de la inhibición de PLA₂ IVa con EPACOF₃, EPASCOF₃ y AACOF₃ y en la figura A se muestra un aumento de la inhibición de PLA₂ IVa con EPACH (OH) COF₃, DHACOF₃ y MAFP. Los resultados se dan como % del control y representan la media de determinaciones duplicadas de uno de 2 a 4 experimentos representativos.

60 En la figura 3A se muestra cómo el ionóforo de calcio A₂₃₁₈₇ estimula la liberación extracelular de lípidos marcados con [³H] de forma dependiente de la concentración. Se trataron células HaCaT con A₂₃₁₈₇ durante 1 hora; el ácido araquidónico y los eicosanoides se extrajeron de los medios de cultivo usando columnas Bond Elut C18 y el contenido en lípidos marcados con [³H] en los medios se determinó mediante recuento del centelleo. Cada columna de la figura representa el promedio de determinaciones por triplicado de uno de cada 3 experimentos representativos.

65 En la figura 3B se muestra que el ionóforo de calcio A₂₃₁₈₇ dependientemente de la dosis también estimula la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), producto de modificación del ácido araquidónico (AA) por la

ciclooxigenasa. La acumulación de PGE₂ en el medio se determinó mediante inmunoensayo enzimático (EIA) de la PGE₂.

5 En la figura 4 se muestra que la activación de NF-κB estimulada por TNFα o IL-1β es inhibida de forma dependiente de la dosis por AKH217 (91 % y 81 %, respectivamente).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Materiales

10 El ionóforo de calcio A₂₃₁₈₇, Sigmacoat, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) y la albúmina de suero bovino se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). La fosfatidilcolina, el 1-estearoil-2-araquidonilo y el [³H] araquidónico son de Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido). Los cromatofolios de aluminio de gel de sílice 60, el acetato de etilo, el iso-octano y el ácido acético se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El TNFα fue cedido generosamente por el Profesor Terje Espevik de la University of Science and Technology de Noruega, NTNU y la IL-1β se obtuvo de Roche Molecular Biochemicals.

15 AACOCF₃ es de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, EE. UU.) y MAFP es de Cayman (Ann Arbor, MI, EE. UU.). Todos los compuestos de ácidos grasos se conservaron en N₂ a -80 °C.

Cultivo celular

20 La línea celular de queratinocitos de piel humana inmortalizada de forma espontánea HaCaT fue proporcionada amablemente por el Prof. N. E. Fusenig (Heidelberg, Alemania). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 1 g de glucosa/l (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Escocia), suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 5 % (HyClone Laboratories, Inc., Utah, EE. UU.), glutamina a 0,3 mg/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, EE. UU.), gentamicina a 0,1 mg/ml (Sigma) y fungizona a 1 μg/ml (Gibco). Las células en confluencia se estimularon con A₂₃₁₈₇, IL-1β (10 mg/ml) y TNFα (10 mg/ml) en SFT al 0,5 % (v/v) durante 1 hora antes de su recogida. Se usaron los pasos 40-80 de las células. La generación de transfectantes de HaCaT que expresan la luciferasa bajo el control estricto del factor de transcripción NF-κB se describe en otro documento (Anthonsen y col., J. Biol. Chem. 2001, 276, 30527). El plásmido indicador pBIIIX contiene dos copias de la secuencia para NF-κB del VIH clonada secuencia arriba del promotor fos de ratón que dirige la expresión del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*.

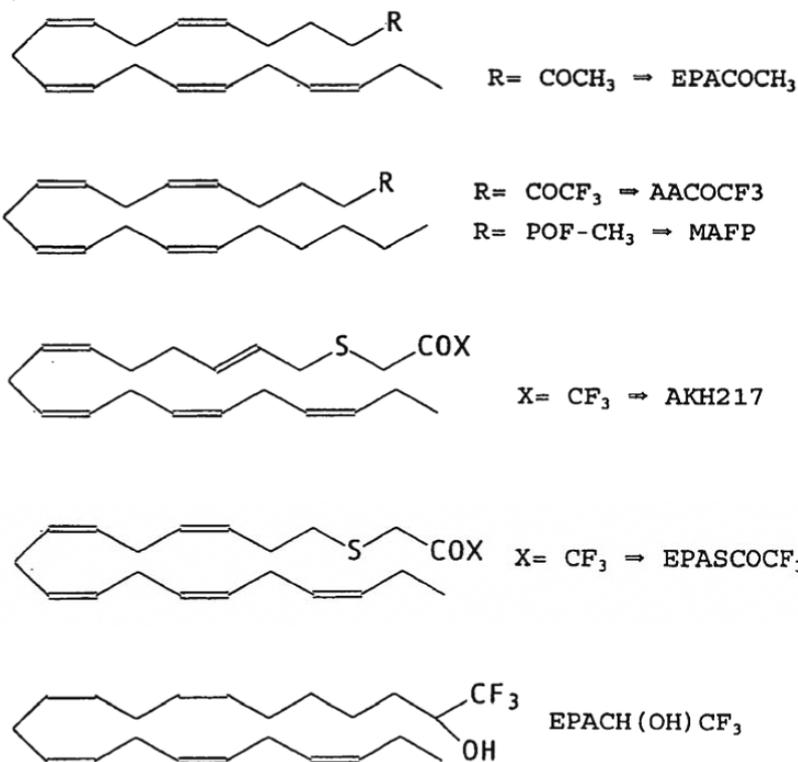
35 La detección por EIA se realizó según la descripción del fabricante, Cayman Chemical, MI, EE. UU. Se usó una dilución 1:10 para determinar la PGE₂. Los datos de la muestra se calcularon con el Microplate Manage Software (Bio-Rad Laboratory).

Ensayo de la actividad luciferasa

40 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos de fondo redondo (2,8 x 10⁵ células/pocillo). Las células tratadas se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se lisaron; las actividades luciferasa se determinaron usando el sistema Luciferase Reporter Assay (Promega) y el luminómetro de Turner modelo TD-20/20 (Turner Designs) como describe el fabricante.

Síntesis de derivados de los ácidos (todo-Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico (EPA) y (todo-Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA)

50 A continuación se muestran los derivados de los ensayos enzimáticos. AACOCF₃ y MAFP se obtuvieron de los proveedores mencionados anteriormente. El resto de los derivados se prepararon como se describe en J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2000, 2271-2276.



Ensayo de micelas mixtas de la actividad cPLA₂

- 5 Las fuentes de la actividad enzimática de la PLA₂ IV fueron células de insecto que sobreexpresan la PLA₂ IV recombinante humana (10 µg de proteína PLA₂ IV/1 0⁶ células; sistema de expresión de *Baculovirus* Bac PAK; CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, EE. UU.). Las fracciones citosólicas de las células de insecto se prepararon como se describe en Schalkwijk y col. (1992) Eur. J. Biochem. 210, 169-176. El contenido proteico de las fracciones citosólicas se determinó con un ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) usando albúmina sérica bovina como patrón. Los derivados inhibidores se añadieron 10 minutos antes de la adición del sustrato. La incubación previa de los inhibidores se realizó a temperatura ambiente. La actividad enzimática PLA₂ IV se analizó usando [¹⁴C]-L-3 fosfatidilcolina, 1-estearoil-2-araquidonoilo como sustrato según Wijkander y col., (Eur. J. Biochem. 202, 873-880, 1991). Después de 30 minutos, se paró la reacción y se centrifugó, la fase CHCl₃ se evaporó con gas N₂ hasta sequedad y, a continuación, se resuspendió en CHCl₃:MeOH (9:1, v/v). La cromatografía en capa fina (TLC) separó el ácido araquidónico libre de los fosfolípidos en cromatofolios de aluminio de gel de sílice 60 desarrollados con acetato de etilo:iso-octano:ácido acético:agua (55: 75: 8:100, v/v/v/v) (Gronich y col, J. Clin. Invest., 93, 1224-1233, 1994). El ácido araquidónico libre y los fosfolípidos se cuantificaron en un Phosphor-Imager y la actividad PLA₂ IV se expresó como liberación de ácido araquidónico reducida por la enzima incubada con el inhibidor en comparación con la ausencia de inhibidor.

Detección de ácido araquidónico y eicosanoides

- 25 Las células en confluencia se marcaron con [³H] ácido araquidónico a 1 µCi/ml en medios suplementados con SFT al 0,5 % (v/v) 24 horas antes de la inducción e inhibición celular. Aproximadamente el 90 % del ácido araquidónico radiactivo se incorporó a las membranas celulares. El [³H] ácido araquidónico extracelular se eliminó lavando las células 3 veces con el medio. A continuación, las células HaCaT se preincubaron con inhibidor durante 1 hora y se estimularon con ionóforo de calcio durante 1 hora. Los medios celulares se recogieron y aclararon mediante centrifugación. El ácido araquidónico y los eicosanoides se extrajeron de los medios usando columnas Bond Elut C18 de octadecilo (500 mg) (Varian SSP, Harbor City, CA) como se describe en Powell, Anal. Biochem. 164, 117-131, 1987, con modificaciones previamente descrita por Brekke, Cytokine, 4, 269-280, 1992. Las muestras se recogieron en tubos de vidrio previamente recubiertos con Sigmacoat. La solución de acetato de etilo de las muestras se secó por completo con N₂, se redisolvió en 0,5 ml de acetato de etilo nuevo y las muestras en alícuotas de 50 µl (por triplicado) se procesaron en un contador de líquido de centelleo β (Beckman LS 1701) en 5 ml de líquido Ready Protein (Beckman).

35

La cantidad de PGE₂ en los medios de cultivo celular de las células HaCaT estimulada con el ionóforo de calcio se determinó usando un inmunoensayo enzimático (EIA; Cayman). El ensayo se basa en la competición entre PGE₂ libre y una PGE₂-acetilcolinesterasa por una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal frente a PGE₂. Los medios se diluyeron 1:10 antes de analizar el contenido de PGE₂. Los datos de la muestra se calcularon con el Microplate Manage Software (Bio-Rad Laboratory).

Ensayo de MTT

Las células en confluencia se trataron previamente con inhibidores en medio sin suero durante 1 hora y, a continuación, se trataron con el agente estimulante durante 1 hora. La conversión del sustrato [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] se determinó como la densidad óptica a 580 nm después de 4 horas según Mosmann [Mosmann T, J. Immunol. Methods 65, 55-63, 1983]. Para cada concentración del inhibidor se midieron nueve replicados.

RESULTADOS

Actividad enzimática PLA₂ IV

Para estudiar la acción de los derivados de ácidos grasos como inhibidores de PLA₂ IV se determinó la actividad PLA₂ IV en el ensayo de micelas mixtas con PLA₂ IV recombinante como fuente de la enzima, como se describió en materiales y procedimientos. Los derivados sintéticos de ácidos grasos que se fabricaron se enumeran a continuación, junto con los inhibidores disponibles en el mercado, que se usaron como comparación.

Parece que EPASCOF₃ y AKH-217 tienen la misma potencia que los inhibidores de PLA₂ IV, como AACOF₃ (es decir, inhibición del 75-80 %) (figura 1). MAFP y DHACOF₃ eran peores inhibidores de PLA₂ IV (inhibiciones del 50 % y el 30 %, respectivamente). También se probó el compuesto EPACH(OH)CF₃ que daba lugar a una atenuación intensa del efecto inhibidor (inhibición del 10 %). Se preparó EPACOH₃ como compuesto control con metilo en lugar del grupo trifluorometilo (CF₃). EPACOH₃ no mostraba inhibición (figura 1).

Se determinó que los valores de IC₅₀ de EPASCOF₃ y AACOF₃ eran de 3,5 ± 0 μM y 5,8 ± 1,9 μM, respectivamente (figura 2B). Mientras que se determinó que los valores de IC₅₀ de MAFP y EPACH(OH)CF₃ era de 24 ± 1,4 μM y 43 ± 7,1 μM respectivamente.

Los estudios cinéticos con los inhibidores en el ensayo de micelas mixtas se realizaron para ver si el transcurso del ensayo era lineal. Se alcanzaba un pico en dos minutos (resultados no mostrados), lo que indicaba que los inhibidores actúan de forma muy rápida.

En resumen, parece que EPASCOF₃ y AKH217 tiene una potencia similar, o quizás ligeramente superior, que el compuesto AACOF₃ disponible en el mercado para inhibir PLA₂ IVa.

Detección de ácido araquidónico y eicosanoides.

Para evaluar el efecto de los derivados de EPA y DHA en un sistema más biológico, se utilizaron las células HaCaT como sistema modelo [Sjursen y col., Cytokine, 12, 8, 1189-1194, 2000]. Se ha mostrado que el ionóforo de calcio A₂₃₁₈₇ inducía la liberación de ácido araquidónico en muchos tipos de células, probablemente aumentando la concentración intracelular de Ca²⁺ e induciendo, por tanto, la asociación de cPLA₂ con las membranas celulares [Kramer y Sharp, FEBS Lett, 410, 49-53, 1997]. En las células HaCaT, el ionóforo inducía una liberación de ácido araquidónico marcado con [³H] en respuesta a las dosis (figura 3A).

Concentraciones superiores a 10 μM de A₂₃₁₈₇ eran tóxicas como se determinó mediante el ensayo de MTT.

El paso siguiente en la evaluación de los inhibidores sintéticos de ácidos grasos fue examinar su capacidad para reducir la liberación extracelular de PGE₂ en respuesta a A₂₃₁₈₇ en células HaCaT. Antes de que se realizaran los experimentos celulares, se evaluó la toxicidad de los inhibidores. El ensayo de MTT mostró que concentraciones de 25 μM y superiores de los compuestos de ácido graso son tóxicas para las células HaCaT (resultados no mostrados).

Las células HaCaT aumentan la expresión del mensajero de la ciclooxigenasa 2 cuando se trata con LPS (200 ng/ml, suero humano al 5 %) durante 30 minutos (resultados no publicados). Tras la estimulación con el ionóforo durante una hora, la PGE₂ se acumula en el medio (figura 3B).

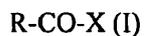
Para determinar si la inhibición de la PLA₂ IVa tiene consecuencias biológicas, las células HaCaT se estimularon con las citoquinas proinflamatorias IL-1β o TNFα. Como medida de la inflamación, se analizó la activación del factor de transcripción NF-κB. Se ha demostrado con anterioridad que TNFα o IL-1β activan NF-κB en las células HaCaT (Thommesen y col., J. Immunol., 1998, 161, 3421). La activación de NF-κB se analizó como expresión de la

5 luciferasa. El tratamiento de las células HaCaT-pBIX establemente transfectadas con TNF α o IL-1 β durante 1 hora potenciaba la expresión dependiente de NF- κ B (no mostrado). En presencia de los inhibidores AKH217, la expresión de la luciferasa estimulada por IL-1 β se inhibía de forma dependiente de dosis el 81 %. La activación de NF- κ B estimulada por TNF α era inhibida de forma dependiente de dosis por AKH217 el 91 % (figura 4) confirmando, por tanto, que estos inhibidores sintéticos de ácidos grasos pueden ser útiles para inhibir las respuestas inflamatorias.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

5



10

donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C_{16-24} interrumpido en β en relación con el grupo carbonilo por un heteroátomo o grupo de heteroátomos seleccionados entre S, O, N, SO, SO_2 , comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 5 enlaces dobles no conjugados y X es un grupo aceptor de electrones seleccionando entre $CHal_3$, $CHHal_2$ o CH_2Hal en el que Hal representa un halógeno para el uso en la producción de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis.

15

2. Compuesto para el uso según se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicho grupo hidrocarburo tiene de 5 a 7 enlaces dobles.

20

3. Compuesto para el uso según se reivindica en la reivindicación 2 en el que dicho grupo hidrocarburo comprende 5 enlaces dobles.

25

4. Compuesto para el uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 3 en el que ningún doble enlace está conjugado con el grupo carbonilo.

30

5. Compuesto para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que todos los enlaces dobles están en configuración cis.

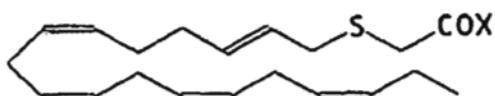
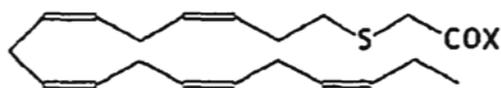
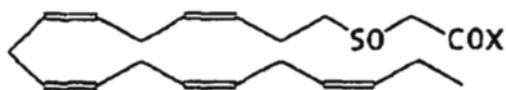
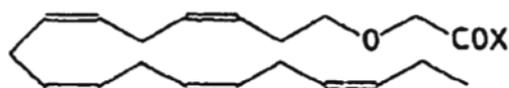
35

6. Compuesto para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que todos los enlaces dobles están en configuración cis, excepto el doble enlace próximo al carbonilo.

7. Compuesto para el uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el grupo R comprende de 19 a 21 átomos de carbono.

8. Compuesto para el uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que dicho heteroátomo o grupo de heteroátomos es O, S o SO.

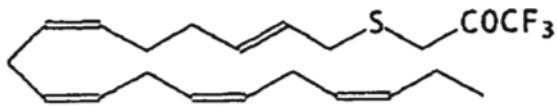
9. Compuesto para el uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el grupo RCOX es:



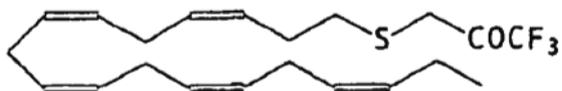
40

10. Compuesto para el uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 9 en el que X es $CHal_3$.

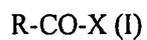
11. Compuesto para el uso según se reivindica en la reivindicación 1 en el que RCOX es



5 6



12. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I)



10 donde R es un grupo hidrocarburo insaturado C₁₆₋₂₄ interrumpido en β en relación con el grupo carbonilo por un heteroátomo o grupo de heteroátomos seleccionados entre S, O, N, SO, SO₂, comprendiendo dicho grupo hidrocarburo al menos 5 enlaces dobles no conjugados y X es un grupo aceptor de electrones seleccionando entre CHal₃, CHHal₂ o CHalH₂ en el que Hal representa un halógeno y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

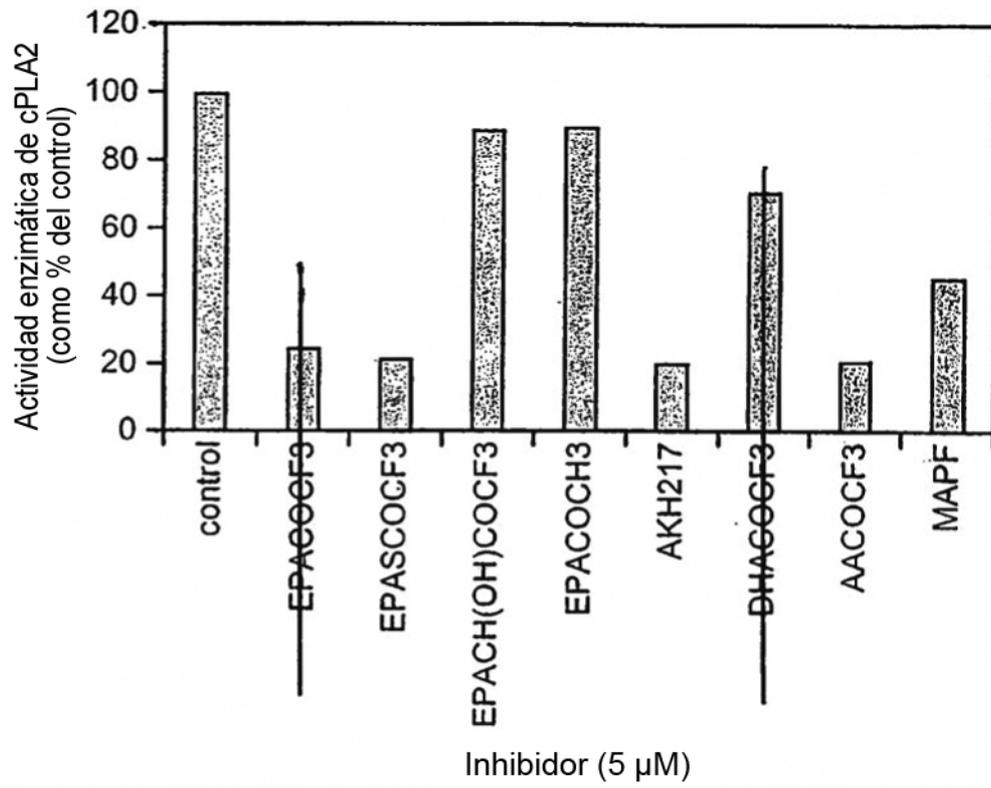


FIG. 1

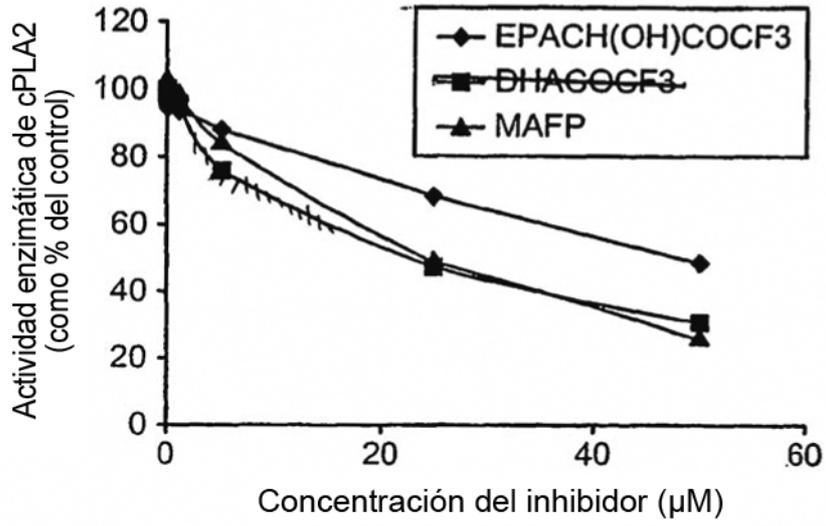


FIG. 2A

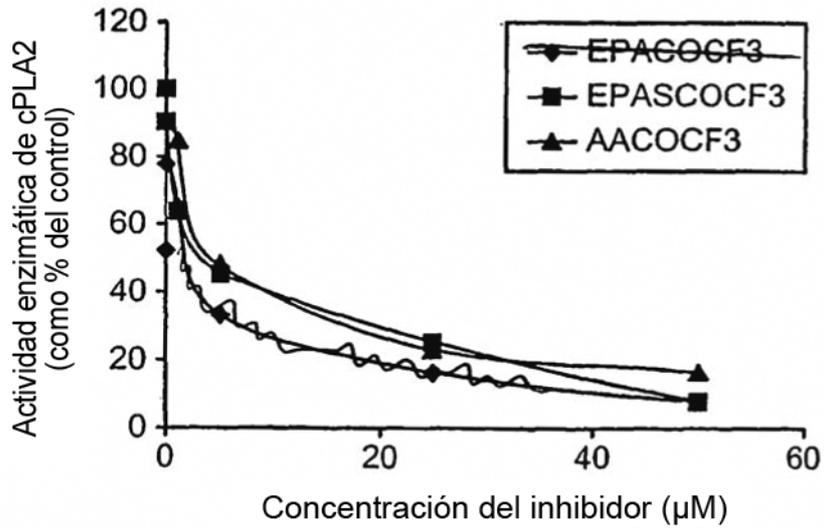


FIG. 2B

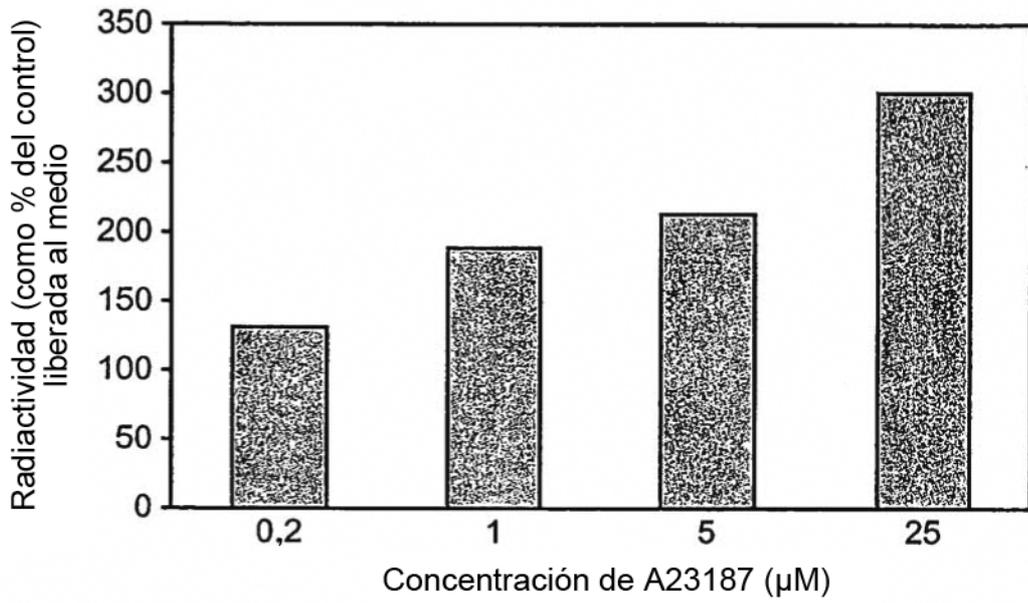


FIG. 3A

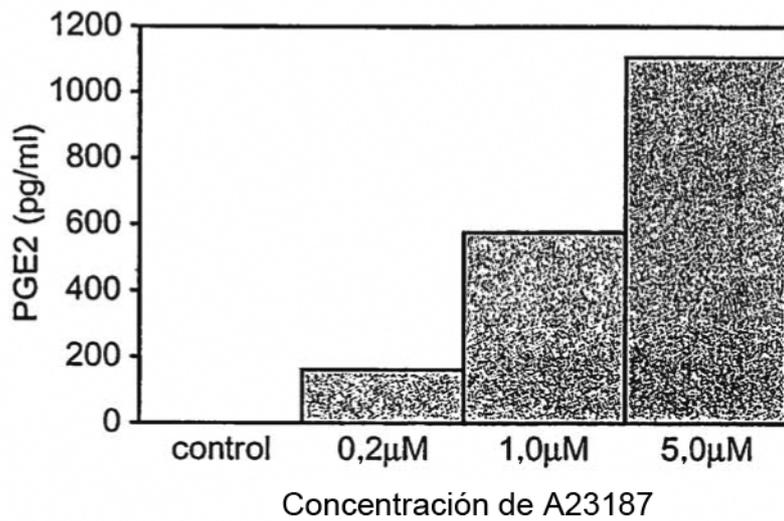


FIG. 3B

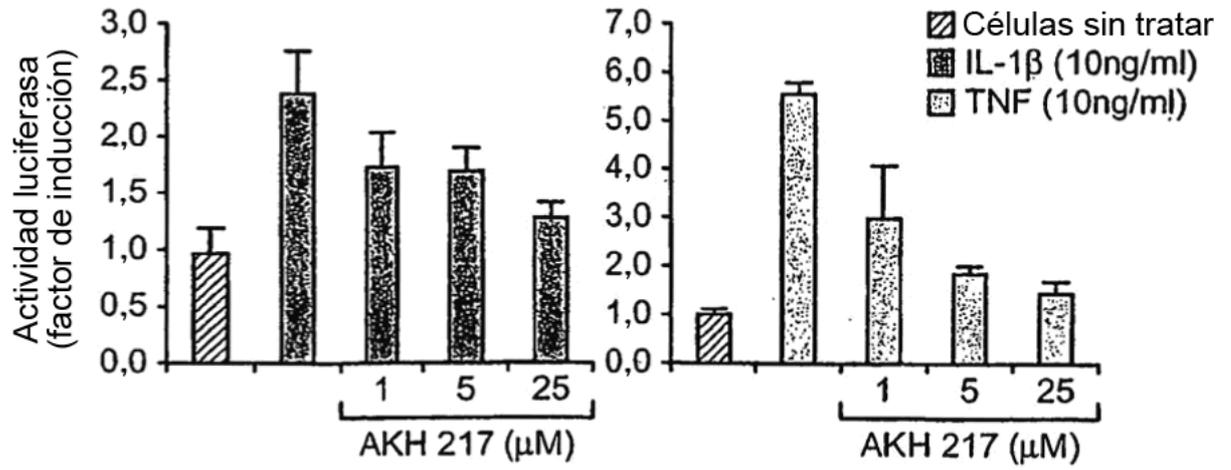


FIG. 4