

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 498**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/185	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
A23L 1/30	(2006.01)	A61P 3/00	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
A61P 9/12	(2006.01)		
A61P 3/04	(2006.01)		
A61P 17/00	(2006.01)		
A61P 25/28	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09831504 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2374453**

54 Título: **Alfa derivados de ácidos grasos cis-monoinsaturados para ser usados como medicamento**

30 Prioridad:

09.12.2008 ES 200803480

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

12.05.2015

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;
BUSQUETS XAUBET, XAVIER;
BARCELÓ COBLIJN, GWENDOLYN;
LLADÓ CAÑELLAS, VICTORIA;
ÁLVAREZ MARTÍNEZ, RAFAEL;
TERES JIMÉNEZ, SILVIA;
LÓPEZ, DANIEL;
BARCELÓ ESTARELLAS, JUANA;
TAYLOR GREEN, JULIAN y
ÁVILA MARTÍN, GERARDO**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 535 498 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**Alfa Derivados de ácidos grasos cis-monoin saturados para ser usados como medicamento****5 CAMPO**

La presente descripción se refiere a α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoin saturados de Fórmula I sus sales o sus derivados, farmacéuticamente aceptables, (ver la descripción) para ser usados como medicamento, preferentemente en la prevención y/o 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. Asimismo, se refiere a su uso para patologías en las que la regulación de la composición y estructura lipídica de membrana induzca la reversión del estado patológico. Además, en la presente descripción, se exceptúa el uso de los compuestos de Fórmula I donde (X) se sustituye por OH, NH₂ o CH₃ y (R) se sustituye por H, para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y obesidad, y para el tratamiento del cáncer de pulmón, cerebro o próstata en humanos.

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

20 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 y sus lípidos no sólo tienen un papel estructural, sino que regulan la actividad de importantes procesos. Es más, la regulación de la composición lipídica de la membrana también influye en la localización o la función de importantes proteínas implicadas en el control de la fisiología celular, como las proteínas G o la PKC (Escribá et al., 1995; 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: el cáncer, patologías 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 descripción y que regulan la composición y estructura de los lípidos de membrana, pudiendo ser empleados para revertir dichas enfermedades (Escribá, 2006; Llado Victoria et al, 2007).

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, 2006). Los cambios en la composición lipídica de las membranas influyen sobre la señalización celular, pudiendo dar lugar al desarrollo de enfermedades o bien a revertirlas (Escribá, 2006). Las grasas saturadas ingeridas en la comida tienen unos efectos negativos sobre la composición y estructura de membrana que pueden dar lugar a diferentes patologías como el cáncer, las metabolopatías (diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, etc.), obesidad, enfermedades cardíacas y vasculares, inflamación, procesos neurodegenerativos, etc. Esta teoría también explicaría las alteraciones producidas por otras grasas, como el aceite de colza desnaturalizado, que en su día originó un síndrome tóxico con consecuencias devastadoras, llegando a causar invalidez permanente y muerte en numerosos casos. Por el contrario, aquellos lípidos que tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo tienen para todas las células y, por ello, pueden actuar sobre múltiples procesos patológicos, lo que justifica que los ácidos grasos de la presente descripción tengan un amplio espectro terapéutico.

De forma adicional, las terapias que implican la regulación de la estructura y/o función de los lípidos de membrana se pueden aplicar a patologías en las que dichos lípidos no presenten alteraciones significativas, pero que como resultado de la intervención sobre los mismos (a través de aproximaciones farmacéuticas o nutracéuticas) se module una función celular que revierta el proceso patológico.

Diferentes estudios realizados durante los últimos años indican que los lípidos de membrana desempeñan un papel mucho más importante del que se les había asignado hasta ahora (Escribá et al., 2008). Un ejemplo de dicha importancia lo constituyen los peces que viven en ríos con temperatura variable, cuyos lípidos experimentan importantes cambios (cambios en composición y tipos de lípidos de membrana) cuando la temperatura baja desde 20°C (verano) hasta 4°C (invierno) (Buda et al. 1994). Estos estudios demuestran que los cambios en los lípidos de membrana dan lugar a una serie de modificaciones en las funciones celulares de forma coordinada para mantener la fisiología celular correcta. En el caso de los peces que viven en aguas de temperatura variable, la regulación de los lípidos de membrana permite 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, intervenciones terapéuticas, nutracéuticas o

tópicas/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 y Dyerberg, 2004). El deterioro de un organismo se manifiesta en la aparición de éstos y otros tipos de enfermedades. En este sentido, es claro el efecto positivo o negativo que tiene el consumo de determinados tipos de lípidos. Por una parte, y tal como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos saturados o *trans*-insaturados tiene efectos negativos sobre multitud de parámetros fisiológicos, estando implicados en alteraciones lipídicas que dan lugar a numerosas patologías, como por ejemplo patologías metabólicas (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico, etc.), cáncer, patologías cardiovasculares, inflamación, etc. Por el contrario, los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados y poliinsaturados se han relacionado con la prevención o reversión de estas enfermedades. Todos estos datos indican claramente que las alteraciones lipídicas pueden originar cambios deletéreos en la fisiología celular y que la regulación de la composición y estructura lipídica de las membranas puede revertir dichos cambios negativos mediante la regulación coordinada de ciertas funciones celulares.

Así, las alteraciones en la composición y estructura de membranas están relacionadas con la etiología de numerosas patologías y, en muchos casos, la manifestación de una determinada enfermedad se debe a la combinación de estas alteraciones con otras que afectan a determinadas proteínas que interactúan con la membrana o se encuentran en la secuencia de señales de otras proteínas que interactúan con ellas. Por lo tanto, las intervenciones sobre la estructura y función de las membranas biológicas, a través de las moléculas englobadas en la presente descripción, pueden modificar de forma eficaz ciertas funciones celulares con el resultado neto de la reversión de un determinado proceso patológico. Dada 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 de diversa tipología, pero unitariamente relacionadas por dicha etiología, la presente descripción se focaliza en α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, sus sales y derivados farmacéuticamente aceptables, los cuales son usados en el tratamiento y/o prevención de dichas enfermedades. Sorprendentemente, en la presente descripción se evidencia cómo los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden ser usados con éxito para regular la señalización celular, previniendo la aparición o dando lugar a la reversión de importantes enfermedades.

Los documentos de patente WO2005041691 y WO2003030891 se refieren fundamentalmente a la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (como la hipertensión) y obesidad, y al tratamiento del cáncer de pulmón, cerebro o próstata mediante el uso de compuestos de fórmula $\text{COOH-CHR}-(\text{CH}_2)_m\text{-CH=CH}-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$, con configuraciones *cis* o *trans*, donde el grupo R puede sustituirse por H, OH, NH_2 y CH_3 u otros grupos con un peso menor a 200 Da y donde el grupo carboxílico tiene un átomo de hidrógeno (H). Sin embargo dichos documentos de patente WO2005041691 y WO2003030891 no hacen referencia al uso de esos mismos compuestos en la prevención del cáncer y/o en la prevención y/o el tratamiento de patologías cutáneas, patologías neurodegenerativas, lesión medular, dolor, procesos inflamatorios, patologías infecciosas o patologías metabólicas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes o síndrome metabólico. Además, dichos documentos de patente tampoco hacen referencia al uso de compuestos con dicha fórmula pero donde la posición R (X en la presente descripción) puede ser sustituido por diferentes radicales como F, F_3C , HS y O- CH_3 en la prevención y/o tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas. Por otro lado, dichos documentos de patente tampoco divulgan el uso de compuestos con dicha fórmula pero donde la posición R (X en la presente descripción) puede sustituirse por diferentes grupos como, por ejemplo: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O- CH_3 , $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ y CH_3COO y la posición H del grupo carboxilo (R en la presente descripción) pueden sustituirse por diferentes grupos como, por ejemplo: sodio (Na), éster metílico (OMe), éster etílico (EE) o amonio (NH_3) en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas. Además dichos documentos de patente tampoco divulgan el uso de compuestos con dicha fórmula pero donde la posición R (X en la presente descripción) puede sustituirse por diferentes grupos como, por ejemplo: $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ y CH_3COO y la posición H del grupo carboxilo (R en la presente descripción) se mantiene como H, en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas. Finalmente, ninguno de los documentos localizados en el estado de la técnica divulga el uso de compuestos con dicha fórmula pero donde la posición R (X en la presente descripción) puede sustituirse por diferentes grupos como, por ejemplo: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O- CH_3 , $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ y CH_3COO y la posición H del grupo carboxilo (R en la presente descripción) pueden sustituirse por diferentes grupos como, por ejemplo: H, sodio (Na), éster metílico (OMe), éster etílico (EE) o amonio (NH_3) en la inducción de neuroregeneración, la prevención y/o el tratamiento de lesiones medulares y/o la prevención y/o el tratamiento del dolor.

Así, en la presente descripción, se ha demostrado la eficacia superior de los isómeros con configuración *cis* y se ha llevado a cabo una selección de nuevos grupos que dieron lugar a compuestos que fueron usados con éxito en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología común se basa en alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular como: cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, lesión medular, dolor, procesos inflamatorios, VIH o malaria. Además, como se ha citado anteriormente, en la presente descripción se han evidenciado nuevos usos para los compuestos divulgados en los documentos de patente WO2005041691 y WO2003030891 como son: la prevención y tratamiento de varios tipos de cáncer, de patologías cutáneas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios, patologías

infecciosas, lesiones medulares y dolor. Asimismo, se han descubierto nuevos derivados y combinaciones de las moléculas de la presente descripción con otros principios activos o excipientes, en ambos casos con mayor eficacia farmacológica para el tratamiento de algunas patologías.

5 Ninguno de los documentos localizados en el estado de la técnica se refiere al uso concreto de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, sus sales y tratamientos combinatorios con éstos para los propósitos reivindicados en la presente descripción. Además, en la presente descripción se evidencia la particular importancia de seleccionar compuestos con las exclusivas características estructurales compartidas por los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (doble enlace en posición *cis* y sustituciones concretas en el carbono α y del protón del grupo carboxilo y estructuras relacionadas farmacéuticamente aceptables) para que éstos puedan aplicarse eficazmente en el tratamiento de enfermedades cuya etiología se relacione con alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos de membrana. Así en la presente descripción se exponen ejemplos comparativos donde se demuestra cómo otros compuestos similares a los utilizados en la presente descripción, pero sin compartir dichas características estructurales, no son tan eficaces como los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados de la descripción.

DESCRIPCIÓN

La presente invención hace referencia a un compuesto *cis*-COONa-OHCH-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃ para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4.

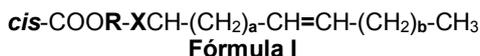
La presente invención adicionalmente se refiere a una composición farmacéutica y/o nutracéutica que comprende *cis*-COONa-OHCH-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃ y al menos un segundo compuesto con actividad terapéutica o excipiente, de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6.

25 También se refiere en la descripción a α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, y sus sales o formas farmacéuticamente aceptables, los cuales son usados como medicamento, preferentemente en el tratamiento y/o prevención de enfermedades aunadas por su etiología, relativa a alteraciones estructurales o funcionales de los lípidos de membrana. Se exceptúa el uso de los compuestos de Fórmula I donde (X) se sustituye por OH, NH₂ o CH₃ y (R) se sustituye por H para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y obesidad, y para el tratamiento del cáncer de pulmón, cerebro o próstata en humanos.

Dichas enfermedades o patologías, aunadas por dicha etiología común, y prevenidas o tratadas mediante el uso de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados de la descripción son, por ejemplo:

- 35 • El cáncer (ver la **Tabla 2**): cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de cérvix, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón.
- Patologías vasculares: arterioesclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis, hiperplasia cardiaca o hipertensión.
- Patologías cutáneas: celulitis, vitiligo o soriasis.
- 40 • Patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes, síndrome metabólico u obesidad.
- Patologías neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o esclerosis.
- Procesos inflamatorios que desencadenan dolor, enfermedades cardiovasculares, enfermedades sistémicas, envejecimiento, enfermedades respiratorias o artritis reumatoide.
- Patologías infecciosas: SIDA y malaria.
- 45 • Lesiones medulares: patologías relacionadas con daño neuronal, anomalías de la función motora voluntaria acompañadas o no de una disfunción del tracto corticoespinal o extrapiramidal, parálisis motora, espasticidad derivada de una lesión medular acompañada o no de un componente de sensibilización central, etc. Los compuestos de la descripción son, por lo tanto, eficaces en la inducción de la neuroregeneración.
- Dolor del origen del daño del sistema nerviosa central: procesos que requieran analgesia, dolor neuropático, cambios en la nocicepción, etc.

50 Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados utilizados en la presente descripción con dicho propósito (en adelante ácidos grasos de la descripción) pertenecen al grupo estructural 1 mostrado en la **Tabla 1** y a los compuestos de la **Tabla 5** y se caracterizan por la siguiente Fórmula general (I):



donde (a) y (b) pueden tener cualquier valor entre 0 y 14, (X) unido al carbono α puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 4 y 200 Da y (R) puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 1 y 200 Da, tanto (X) como (R) seleccionados, a modo de ejemplo, entre: alcoholes, ácidos orgánicos, grupos alquilo, grupos amino, halógenos, halógenos de alquilo, grupos alquilo y grupos mercapto.

En la descripción el radical (X) puede sustituirse por un grupo seleccionado entre: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ y CH₃COO.

En la descripción el radical (**R**) puede sustituirse por: H, sodio (Na), un éster metílico (OMe), un éster etílico (EE), amonio (NH₃) o cualquier otro radical que constituya una sal o forma farmacéuticamente aceptable de los compuestos de Fórmula I.

5 Para el funcionamiento eficaz de esta estructura, es esencial el doble enlace (=) situado en posición *cis* y dichas sustituciones en el carbono α . Ensayos realizados con moléculas análogas a las descritas en la Fórmula I que carecen de sustituciones en el carbono α (X es un átomo de hidrógeno), que tienen el doble enlace en configuración *trans*, o que carecen de doble enlace (ácidos grasos saturados), demostraron una actividad preventiva o curativa menor respecto a la mostrada por los ácidos grasos de la presente descripción.

10 Por otro lado, se han estudiado diferentes sales de las moléculas relativas a esta descripción (**Tabla 5**). Su eficacia es, en algunos casos, significativamente superior a la que tienen los ácidos grasos libres. Este efecto puede deberse a mejoras en la absorción de los compuestos o en la distribución de los mismos. Así, en la presente descripción se demuestra que la sustitución del hidrógeno del grupo carboxilo (R) da lugar a ciertas sales o derivados que mostraron actividades farmacológicas superiores a las propias del ácido graso libre. Por ejemplo, la sal de sodio, en la que R se sustituye por Na, induce reducciones en el volumen de los tumores mayores que la forma sustituida por H, por lo que sería una de las elecciones preferidas para la elaboración de una composición farmacéutica o nutracéutica destinada a la prevención o al tratamiento del cáncer.

20 Ciertas proteínas periféricas de señalización implicadas en la propagación de mensajes al interior celular pueden anclarse en regiones donde el empaquetamiento de superficie sea laxo (**Ref. Figura 1**). Los ácidos grasos con insaturaciones en configuración *cis* y sustituciones en el carbono α diferentes al H se localizan en la membrana (bien en su forma libre o formando parte de estructuras mayores como los fosfolípidos), introduciendo discontinuidades en el empaquetamiento de las cabezas polares de los fosfolípidos, que se encuentran en la superficie de la barrera celular, donde se pueden anclar proteínas G, PKC, proteínas del tipo Ras, etc. Por el contrario, los ácidos grasos saturados o *trans*-monoinsaturados evitan el acoplamiento de estas proteínas a las membranas, interfiriendo con la señalización celular. Esto no implica que se hayan de eliminar los ácidos grasos saturados de la dieta, sino que los niveles de ingesta de estos lípidos, que se producen en dietas de tipo estándar en países con un nivel de desarrollo medio o alto, son superiores a los requeridos por las células para efectuar sus funciones de forma adecuada. De hecho, los diferentes microdominios lipídicos (p. ej. los "lipid rafts") que aparecen en las membranas son plataformas espacio-temporales donde coinciden proteínas con afinidad por dichos dominios (en base a interacciones proteína-lípido) y pueden tener interacciones productivas que permitan la propagación de señales celulares. Cualquier cambio en la densidad o la estructura de dichos dominios tiene consecuencias sobre la señalización celular, por lo que las intervenciones farmacéuticas y nutracéuticas encaminadas a regular los lípidos de membrana pueden resultar tan o más eficaces que las dirigidas a proteínas o ácidos nucleicos de forma directa.

El amplio espectro de aplicación terapéutica que ofrecen los ácidos grasos de la presente descripción se justifica por varios fenómenos. En primer lugar, la ingesta de lípidos con efectos negativos (grasas saturadas y *trans*-monoinsaturadas) o positivos (grasas *cis*-monoinsaturadas) afecta de forma similar a todas las células del organismo, de manera que los efectos que producen, tanto negativos como positivos, se manifiestan de múltiples maneras: inducción o reducción de obesidad, hipertensión, cáncer, etc. Cuando se ingiere un determinado tipo de lípido, éste se distribuye por todo el organismo y da lugar a la regulación de las especies lipídicas de las membranas celulares de todos los órganos. Por otro lado, los cambios en los niveles de lípidos que se producen como consecuencia de determinados procesos fisiológicos o patológicos (como la aclimatación a aguas frías en peces poiquilotermos) afectan a la práctica totalidad de células del organismo (Buda et al., 1994). Finalmente, los ácidos grasos pueden ser almacenados o degradados para producir energía. De hecho, estas moléculas constituyen combustibles celulares excepcionales, por lo que el uso directo de ácidos grasos no modificados tiene un impacto modesto en la salud. Sin embargo, el bloqueo de su degradación, a través de la adición de modificaciones en el carbono α , permite la permanencia de estas moléculas de forma prolongada, tanto en suero como en membranas, permitiendo así su acción terapéutica. En este sentido, se ha comprobado que los niveles plasmáticos de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados se mantienen elevados tras una hora después de ser inyectados (50-60% de los niveles iniciales), mientras que los ácidos grasos naturales prácticamente han desaparecido tras este período (niveles de 2-4%). Por ello, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados utilizados en la presente descripción producen una amplia gama de efectos positivos sin efectos secundarios observables. Para evidenciar que sólo los ácidos grasos con una instauración en conformación *cis* y con una sustitución en el carbono α diferente a un átomo de H, y no otras estructuras parecidas, tienen propiedades terapéuticas a varios niveles, en la presente descripción se ensayaron diferentes tipos de ácidos grasos (ver la **Tabla 1**) pertenecientes a grupos estructurales diferentes (1-4): α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (ácidos grasos de la descripción) (1), ácidos grasos con doble enlace en configuración *cis*, pero sin modificaciones en el carbono α distintos al H(2), ácidos grasos con el carbono α sustituido por radicales distintos al H, pero sin doble enlace en configuración *cis* (3), ácidos grasos sin doble enlace en configuración *cis* y sin sustituciones en el carbono α distintos al H (4).

El mecanismo de acción de estas moléculas (basado en la regulación de la composición y estructura de las membranas biológicas) es diferente al de la mayoría de fármacos empleados para tratar patologías humanas (basados en la interacción con proteínas, en la mayoría de casos, o ácidos nucleicos). Por ello, pueden ser usados en terapias

combinatorias en las que se emplea alguno de los compuestos de la presente descripción más, al menos, otra molécula (principio activo y/o excipiente) pudiendo resultar mucho más eficaz que la monoterapia con sólo uno de los compuestos. En la presente descripción se muestra, por ejemplo, cómo el OHOD, combinado con cualquiera de los fármacos antitumorales estudiados (temozolomida, erlotinib, gemcitabina, cisplatino) produce un efecto terapéutico superior al de cualquiera de los compuestos por separado.

El amplio espectro de aplicación terapéutica que ofrecen los ácidos grasos de la presente descripción permite asumir de forma generalizada que los lípidos con estructura *cis*-monoinsaturada confieren a las membranas unas propiedades estructurales específicas que permiten la correcta actividad de los procesos llevados a cabo en y por dichas membranas. Dicho de otro modo, los ácidos grasos de la descripción pueden ser eficazmente utilizados para la prevención y/o el tratamiento de cualquier enfermedad cuya etiología esté relacionada bien con alteraciones de los niveles, de la composición, de la estructura, o de cualquier otro tipo de alteración, de los lípidos de las membranas biológicas o bien con una regulación alterada de la señalización celular consecuencia de dichas alteraciones en dichos lípidos presentes en las membranas biológicas.

Por lo tanto la presente descripción hace referencia a un compuesto de Fórmula I: $\text{cis-COOR-XCH}-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_3$, sus sales o sus derivados, farmacéuticamente aceptables, donde **(a)** y **(b)** pueden tener cualquier valor entre 0 y 14, **(X)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 4 y 200 Da y **(R)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 1 y 200 Da, tanto **(X)** como **(R)** seleccionados entre: alcoholes, ácidos orgánicos, grupos alquilo, grupos amino, halógenos, halógenos de alquilo, grupos alquilo y grupos mercapto, para ser usados, de forma independiente o en combinación con otros compuestos, como medicamentos en humanos y animales; exceptuando los compuestos de Fórmula I donde **(R)** es H y **(X)** se sustituye por OH, NH₂ o CH₃ para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y obesidad, y para el tratamiento del cáncer de pulmón, cerebro y próstata.

En una realización preferida, **(X)** se sustituye por un grupo seleccionado entre: OH, NH₂ y CH₃, y **(R)** se sustituye por H, en la Fórmula I, dando lugar a compuestos para ser usados en la prevención del cáncer y/o en la prevención y/o el tratamiento de patologías cutáneas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios, patologías infecciosas o patologías metabólicas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes o síndrome metabólico.

En otra realización preferida, **(X)** es sustituido por un grupo seleccionado entre: F, F₃C, HS y O-CH₃ y **(R)** se sustituye por H, en la Fórmula I, dando lugar a compuestos para ser usados en la prevención y/o tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas.

En otra realización preferida, **(X)** es sustituido por un grupo seleccionado entre: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ y CH₃COO y **(R)** puede ser sustituido por sodio (Na), un éster metílico (OMe), un éster etílico (EE) o amonio (NH₃) en la Fórmula I, dando lugar a compuestos para ser usados en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas.

En otra realización preferida, **(X)** es sustituido por un grupo seleccionado entre: PO₄(CH₂-CH₃)₂ y CH₃COO y **(R)** se sustituye por H, en la Fórmula I, dando lugar a compuestos para ser usados en la prevención y/o el tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas.

En otra realización preferida, **(X)** es sustituido por un grupo seleccionado entre: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ y CH₃COO y **(R)** es sustituido por un grupo seleccionado entre: H, sodio (Na), éster metílico (OMe), éster etílico (EE) o amonio (NH₃), en la Fórmula I, para ser usado en la inducción de neuroregeneración, la prevención y/o el tratamiento de lesiones medulares y/o la prevención y/o el tratamiento del dolor.

En otra realización preferida los compuestos de Fórmula I son: OHHD, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHEE, OHDE, Na-OHOD, OMe-OHOD, EE-OHOD, NH₃-OHOD, ACOD, Na-ACOD, OMe-ACOD, EE-ACOD, Na-MOOD, OMe-MOOD, EE-MOOD, DEPOD, Na-DEPOD, OMe-DEPOD y EE-DEPOD.

Como se ha citado anteriormente, los compuestos pueden ser usados en combinación con otros principios activos o excipientes para dar lugar a composiciones farmacéuticas y/o nutracéuticas útiles para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, patologías vasculares, patologías cutáneas, patologías metabólicas, patologías neurodegenerativas, procesos inflamatorios o patologías infecciosas y/o para la inducción de neuroregeneración, la prevención y/o el tratamiento de lesiones medulares y/o la prevención y/o el tratamiento del dolor.

Así, los ácidos grasos de la descripción pueden administrarse de forma independiente o formulados en composiciones farmacéuticas o nutracéuticas donde se combinan con excipientes como por ejemplo: ligantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, edulcorantes, saborizantes, colorantes, transportadores, etc. y combinaciones de los mismos. Asimismo, los ácidos grasos de la descripción pueden formar parte de composiciones farmacéuticas o nutracéuticas, en combinación con otros principios activos. A efectos de la presente descripción se

define el término nutracéutico como un compuesto que se ingiere de forma periódica durante la alimentación o como complemento de la misma y que sirve para prevenir o revertir enfermedades, en este caso, cuya etiología está unida a alteraciones de los lípidos de la membrana celular.

5 La administración de los ácidos grasos de la descripción puede llevarse a cabo por cualquier vía como, por ejemplo, vía enteral (mediante el aparato digestivo), vía oral (mediante píldoras, cápsulas, granulados, emulsiones, comprimidos o jarabes), vía rectal (mediante supositorios o enemas), vía tópica (mediante cremas o parches), vía inhalatoria, vía parenteral inyectada, vía inyección intravenosa, vía inyección intramuscular o vía inyección subcutánea, en la forma arriba indicada o en cualquier tipo de forma farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo: metilos, etilos, fosfatos, otros radicales de tipo éster, éter, alquilo, etc.

15 Por lo tanto la presente descripción además hace referencia a una composición farmacéutica y/o nutracéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, donde **(a)** y **(b)** pueden tener cualquier valor entre 0 y 14, **(X)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 4 y 200 Da y **(R)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 1 y 200 Da y, al menos, un segundo compuesto con actividad terapéutica o excipiente.

20 En la descripción, este excipiente formulado en combinación con los compuestos de la descripción es la albúmina, por ejemplo: ovoalbúmina, lactoalbúmina, albúmina nativa o recombinante de origen humano, bovino, murino, o de conejo, más preferiblemente, albúmina sérica humana o albúmina sérica bovina. Así, la composición comprendida por un ácido graso de la descripción y por albúmina es eficaz en la prevención y tratamiento de las indicaciones arriba citadas, preferentemente en la inducción de neuroregeneración, la prevención y/o el tratamiento de lesiones medulares y/o la prevención y/o el tratamiento del dolor. En una realización preferida la composición comprende OHOD, o cualquiera de sus derivados como por ejemplo NaOHOD, y albúmina.

25 La composición comprendida por un ácido graso de la descripción y por otro principio activo es eficaz en la prevención y tratamiento de las indicaciones arriba citadas, preferentemente en la prevención y/o tratamiento del cáncer cuando dicho principio activo es un compuesto anticancerígeno. En una realización preferida la composición comprende OHOD y/o Na-OHOD y un compuesto anticancerígeno seleccionado, por ejemplo, entre: temozolomida, erlotinib, gemcitabina y cisplatino.

30 Otro aspecto de la presente descripción hace referencia a un método cosmético, no terapéutico, para mejorar la apariencia cutánea que comprende la administración sobre la piel de una cantidad eficaz de al menos un compuesto de Fórmula I, y/o de sus sales o derivados farmacéutica- o cosméticamente aceptables, donde **(a)** y **(b)** pueden tener cualquier valor entre 0 y 14, **(X)** pueden sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 4 y 200 Da y **(R)** pueden sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 1 y 200 Da, seleccionados entre: alcoholes, ácidos orgánicos, grupos alquilo, grupos amino, halógenos, halógenos de alquilo, grupos alquiloxi y grupos mercapto.

40 Finalmente, la presente descripción hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento terapéutico de enfermedades en humanos y animales cuya etiología común está relacionada con alteraciones estructurales y/o funcionales de los lípidos localizados en la membrana celular, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de Fórmula I, de forma independiente o en combinación con otros compuestos, de sus sales o sus derivados, farmacéuticamente aceptables, donde **(a)** y **(b)** pueden tener cualquier valor entre 0 y 14, **(X)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 4 y 200 Da y **(R)** puede sustituirse por cualquier átomo o grupo de átomos con un peso entre 1 y 200 Da, tanto **(X)** como **(R)** seleccionados entre: alcoholes, ácidos orgánicos, grupos alquilo, grupos amino, halógenos, halógenos de alquilo, grupos alquiloxi y grupos mercapto; exceptuando la administración de los compuestos de Fórmula I donde **(R)** es H y **(X)** se sustituye por OH, NH₂ o CH₃ para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y obesidad, y para el tratamiento del cáncer de pulmón, cerebro y próstata.

50 A los efectos de la presente descripción se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" aquella que revierte la enfermedad o la previene sin mostrar efectos secundarios adversos o, que si los produce, son asumibles en base a los criterios definidos por las agencias reguladoras en materia farmacéutica (básicamente, que el beneficio producido sea superior al daño causado; p. ej. los episodios de náuseas serían asumibles en un paciente con un cáncer con pronóstico grave).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 **Ref. Figura 1.** Unión de proteínas de señalización celular a membranas celulares. Las proteínas periféricas de señalización (A, B y C) se unen a membranas a través de uno o varios mecanismos, como la interacción específica con lípidos de membrana, las interacciones electrostáticas y/o la inserción de regiones hidrofóbicas en zonas de alta propensión no lamelar, mediada por lípidos *cis*-monoinsaturados. Por ello, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden regular la interacción de ciertas proteínas de membrana y la señalización celular.

65 **Ref. Figura 2.** Efecto preventivo de diferentes ácidos grasos frente al desarrollo de tumores. En el eje de abscisas se muestra el tipo de ácido graso utilizado para la prevención del desarrollo del cáncer y en el eje de ordenadas el volumen

del tumor. Los animales se trataron de forma previa a la inyección de células tumorales y posteriormente se mantuvo el tratamiento. Los animales del grupo control no se trataron, y el volumen de sus tumores se tomó como valor de referencia (100%). Se observa como los ácidos grasos de la descripción (OHHD, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHEE y OHDE) tienen un efecto más marcado ($p < 0,05$ en todos los casos) que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sin derivatizar en posición α (EE, DE, HOD, ODO), que los ácidos grasos saturados de idéntica longitud (HD, OD, EO), y que los α -derivados de ácidos grasos cuando no son *cis*-monoinsaturados (OHS, IOHOD) (ver **Tabla 1**).

Ref. Figura 3

- A. Células de cáncer (A549) se trataron con diferentes concentraciones de OHOD y MOD11 para determinar si el efecto era dependiente de la concentración. En el eje de abscisas se muestra la concentración μM de los ácidos grasos utilizados y en el eje de ordenadas se muestra la viabilidad de las células A549 (% control) sin tratar. Se trataron dichas células con diferentes concentraciones (0-400 μM) de OHOD y MOD11 y se determinó el número de células a través de citometría de flujo. Ambos compuestos redujeron el crecimiento de células tumorales, mostrando valores de IC_{50} (concentración que reduce al 50% el número de células viables) en el rango de 50 a 100 μM , tras 48 horas de incubación. Dosis de 200 a 400 μM produjeron en todos los casos la eliminación total de células tumorales.
- B. Células de cáncer (A549) se trataron con los compuestos indicados en el eje de abscisas durante 48 horas a 150 μM . Posteriormente, se contaron las células y se expresó en el eje de ordenadas su número como tanto por ciento de las contadas en placas sin tratamiento (control). En estos cultivos, la incubación con 150 μM de los ácidos grasos de la descripción produjo una inhibición del crecimiento de células tumorales ($p < 0,05$ en todos los casos), lo que indica que son moléculas adecuadas para el tratamiento de cáncer.

Ref. Figura 4. Células de cáncer (A549) se incubaron en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de OHOD (100 μM , 48 h). Posteriormente, se fijaron, se incubaron en presencia de un anticuerpo contra cadherina y se observaron por microscopia confocal. Los tratamientos con 50 μM de OHOD (48 h) indujeron un aumento del $73,6 \pm 5,4\%$ en los niveles de esta proteína. En tratamientos con los ácidos grasos de la descripción se observó un aumento significativo de los niveles de cadherina.

Ref. Figura 5. Capacidad invasiva de células de cáncer de pulmón (A549) en cultivo, en ausencia (control, C) o presencia de OHOD (ácido 2-hidroxi-9-*cis*-octadecenoico) a 50 (M50) y 100 μM (M100) y a diferentes tiempos. Las células de cáncer de pulmón cultivadas en presencia de OHOD tienen una capacidad invasiva inferior a la que presentan las células no tratadas (C) ($p < 0,05$). Estos resultados indican que los ácidos grasos de la descripción pueden ser empleados para prevenir o tratar el desarrollo de metástasis tumorales.

En la gráfica de la derecha se representan dichos resultados mostrando el número de células invasivas en el eje de ordenadas y, en el eje de abscisas, el tiempo en horas.

Figura 6. Efecto de diferentes sales de OHOD sobre cáncer de pulmón humano en un modelo animal de cáncer.

- A. Se muestra el volumen de tumores en ratones desnudos infectados con células de cáncer de cerebro humano SF767 (expresado en tanto por ciento respecto al control), que recibieron diferentes tratamientos. Los animales recibieron vehículo (agua: Control), 600 mg/kg de OHOD en su forma de ácido graso libre (OHOD), 600 mg/kg de sal de sodio de OHOD (NaOHOD) o 600 mg/kg de sal de amonio de OHOD (NH_3OHOD) diariamente durante 50 días. Todos los tratamientos dieron lugar a reducciones significativas en el tamaño de los tumores de los animales tratados ($*** p < 0,001$) y el tratamiento con NaOHOD fue significativamente más potente que el tratamiento con el ácido graso libre, OHOD (#, $p < 0,05$).
- B. Se muestra el efecto de diferentes dosis de sal de sodio de OHOD (NaOHOD) sobre el volumen de tumores de ratones infectados con células SF767 y tratados con vehículo (control, 0 mg/kg), 100 mg/kg (100), 200 mg/kg (200), 400 mg/kg (400) y 600 mg/kg (600) durante 50 días. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figura 7. Efecto de la sal de sodio de OHOD (NaOHOD) sobre diferentes tipos de tumores humanos en modelos animales.

- A. Efecto del NaOHOD (600 mg/kg diarios durante 50 días) sobre el volumen de tumores en ratones inmunodeprimidos ("desnudos") e inmunodeprimidos infectados con células de leucemia humana (células Jurkat).
- B. Efecto del NaOHOD (600 mg/kg diarios durante 50 días) sobre el volumen de tumores en ratones desnudos inoculados con cáncer de próstata humano (células PC3).
- C. Efecto del NaOHOD (600 mg/kg diarios durante 50 días) sobre el volumen de tumores en ratones desnudos inoculados con cáncer de mama humano (células MDA-MB-231).
- D. *Idem* con células de cáncer de colon humano (células HT29). Todos los tratamientos se prolongaron durante 50 días y los animales control se trataron con vehículo (agua). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Esta figura evidencia que la forma Na-OHOD (sal de sodio del OHOD) presenta una mayor eficacia que su correspondiente ácido graso libre, en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer humano xenotransplantados en ratones inmunodeprimidos: leucemia, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon.

- 5 **Figura 8.** Efecto de NaOHOD (sal de sodio del OHOD) y combinaciones con diferentes fármacos: temozolomida (TMZ), erlotinib, gemcitabina y cisplatino (cis-Pt) sobre diferentes tipos de cáncer humano en modelos.
- A. Efecto de tratamientos con vehículo (Control), temozolomida (TMZ, 80 mg/kg), NaOHOD (OHOD, 600 mg/kg) y TMZ más NaOHOD (simultáneamente, a las mismas dosis) durante 60 días, en ratones inmunodeprimidos infectados con cáncer de cerebro humano (SF767).
- 10 B. *Idem*, con NaOHOD (OHOD, 600 mg/ kg), erlotinib (Erlotinib, 40 mg/kg), cisplatino (cis Pt, 100 mg/kg), NaOHOD más erlotinib (OHO Er) o NaOHOD más cisplatino (OHO Pt) en ratones desnudos infectados con células de cáncer de pulmón humano (A549).
- C. *Idem*, con NaOHOD (OHOD, 600 mg/ kg), Gemcitabina (Gemcitab, 40 mg/kg) o NaOHOD más Gemcitabina (OHO Gem) usando las mismas dosis en ratones desnudos infectados con células de cáncer de páncreas humano (BXP33).
- 15

Se evidencia que la combinación de Na-OHOD con cualquiera de estos fármacos dio lugar a reducciones en el volumen de los tumores marcada y significativamente inferiores a las producidas tanto por el Na-OHOD sólo como por cualquiera de los fármacos antitumorales arriba indicados. Es más, el tumor residual observado en la mayoría de animales tratados con Na-OHOD y en la práctica totalidad de los tratados con dos moléculas de forma simultánea estaba constituido por células muertas sin capacidad de regenerar el tumor, por lo que se puede considerar que estas terapias combinatorias produjeron la curación de los tumores humanos implantados en animales.

20

Ref. Figura 9. Efecto de diferentes moléculas sobre la proliferación de células A10 de aorta tras incubaciones de 48 horas a una concentración de 200 μ M. En el eje de abscisas se representan los ácidos grasos utilizados y en el eje de ordenadas el número de células (% control). Todas las células crecieron en idénticas condiciones de temperatura, pH y medio de cultivo, excepto uno de los frascos, al que se retiró el suero (sin suero). Los ácidos grasos de la descripción indujeron una detención de la proliferación celular similar a la que produce la retirada de suero fetal bovino (que contiene múltiples factores de crecimiento celular) a una concentración de 200 μ M ($p < 0,05$ en todos los casos). Este resultado indica que detienen la proliferación de células cardiovasculares, sin tener un efecto tóxico (el número de células es igual o superior a la muestra sin suero).

25

30

Ref. Figura 10. Efecto de diferentes ácidos grasos en la prevención y tratamiento de desarrollo de hipertensión en ratas SHR. En el eje de abscisas se muestran los ácidos grasos utilizados y en el eje de ordenadas la presión arterial (Hg). Se observa que los animales tratados con los ácidos grasos de la descripción no desarrollaron hipertensión ($p < 0,05$ en todos los casos), mientras que los no tratados o tratados con ácidos grasos que no se ajustan a la estructura mostrada en la Fórmula I, sí que desarrollaron hipertensión.

35

Ref. Figura 11. Efecto del OHOD sobre la contractibilidad inducida por noradrenalina (NA) en aorta de ratas SHR. En el eje de abscisas se muestra el logaritmo de NA y en el eje de ordenadas la concentración (g). Las aortas fueron tratadas con OHOD (círculos rellenos) o vehículo (círculos vacíos) durante 60 minutos en baño de órganos a 37°C en medio Ringer con oxígeno. Como muestra la figura, la capacidad de contracción inducida por noradrenalina (NA) es mucho mayor en aorta de ratas pretratadas con este ácido graso ($p < 0,05$). Este resultado indica claramente que la flexibilidad del tejido vascular aumenta de forma significativa ($p < 0,05$) en presencia de los ácidos grasos de la descripción.

40

45

Ref. Figura 12. Efecto de los ácidos grasos de la descripción (mostrados en el eje de abscisas) sobre la producción de melanina en melanocitos de ratón (células B16, barra izquierda más clara) y sobre la proliferación de adipocitos (células 3T3-L1, barra derecha más oscura). Los resultados corresponden a valores de la media de tres experimentos independientes. En este sentido, concentraciones de 100 μ M de estos compuestos durante 48 horas producen reducciones en el contenido en melanina en células B16 ($p < 0,05$ en todos los casos). Además las moléculas que tienen la estructura delimitada por la Fórmula I inhiben el crecimiento de las células 3T3-L1 (células adiposas o adipocitos, $p < 0,05$ en todos los casos), mientras que las moléculas que no tienen la estructura descrita en dicha Fórmula I no tienen efectos significativos sobre la proliferación de los adipocitos.

50

Ref. Figura 13. En las cuatro barras se muestra de izquierda a derecha respectivamente el efecto de tratamientos con vehículo (control, primera barra), con OHOD a 200 mg/kg (segunda barra), con OHOD a 400 mg/kg (tercera barra) y con OHOD a 600 mg/kg (cuarta barra) sobre los niveles de colesterol (grupo de cuatro barras de la izquierda), triglicéridos (grupo de cuatro barras del medio) y glucosa (grupo de cuatro barras de la derecha). Los tratamientos fueron orales en todos los casos y se prolongaron durante 30 días. Los valores indicados corresponden a medias de los valores obtenidos en 6 animales por grupo. Como puede observarse el tratamiento con OHOD produjo reducciones importantes de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa ($p < 0,05$ en todos los casos).

55

60

Ref. Figura 14. Efecto del tratamiento con vehículo (control) o con los ácidos grasos de la descripción (600 mg/kg), sobre los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa. Los valores indicados son medias de los valores obtenidos en 6 animales. Cada grupo de tres barras representa el tratamiento con un ácido graso diferente correspondiendo la barra de la izquierda al colesterol, la del medio a triglicéridos y la de la derecha a glucosa. Como puede observarse, los ácidos

65

grasos que se ajustan a la Fórmula I producen reducciones significativas en estos tres parámetros ($p < 0,05$), mientras que aquellas moléculas análogas que no se ajustan a la Fórmula I carecen de efectos para el tratamiento eficaz de patologías metabólicas, como la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, la diabetes y el síndrome metabólico.

5 **Ref. Figura 15.** Índice cognitivo en ratones con Alzheimer. Para este estudio se emplearon ratones de 6 meses que presentan una serie de mutaciones idénticas a las que producen la enfermedad de Alzheimer en humanos y que presentan la sintomatología neurológica y cognitiva propia de esta enfermedad (Jackson Laboratorios-Charles River). Las barras corresponden a valores de índice cognitivo, determinado como la media entre los resultados obtenidos en el test de Miller y el laberinto radial. En el test de Miller, se consideró 100% el valor tiempo de encuentro de la plataforma antes del aprendizaje dividido por el tiempo de encuentro tras aprendizaje. En este test, el tiempo empleado por animales tratados con vehículo (agua, Control) se consideró 100%. Valores superiores para este parámetro se corresponden a tiempos menores de encuentro tras aprendizaje, originados por una mejora en la memoria de los animales. En el laberinto radial, se consideró el número de intentos promedio hasta encontrar el laberinto con estímulo (comida) antes del entrenamiento dividido por el número de intentos tras el entrenamiento. Se consideró 100% este coeficiente medido en animales control y un aumento en este parámetro se debe a un menor número de intentos, en relación a la capacidad de memoria del animal. En el eje de abscisas se representan los ácidos grasos utilizados. Cada grupo de animales ($n=8$) se trató con vehículo (control) o con los ácidos grasos de la descripción (100 mg/kg). Tras un estudio realizado se observa que los ácidos grasos de la descripción tienen gran eficacia para prevenir el desarrollo del proceso neurodegenerativo (Alzheimer), en base a la mejora en parámetros cognitivos ($p < 0,05$ en todos los casos).

20 **Ref. Figura 16**

A. Evolución de la recuperación motora desde 4 hasta 28 días después de la lesión medular (eje X) en función del movimiento voluntario sobre el Rotarod (eje Y) después de la lesión medular por contusión (Cont), expresado como porcentaje del tiempo de permanencia en el aparato respecto al tiempo de control de cada grupo obtenido antes de la contusión (100%). Se muestran los resultados para los grupos tratados con 10 μ l de Salino sólo (Sal), Albúmina-Ácido Oleico (Alb-OA 4 mM), Albúmina-OHOD (Alb-2OHOA 4mM).

B. Las células de glioma humano (U118) son astrocitos del sistema nervioso central (SNC) que han perdido su diferenciación (Control). En presencia de NaOHOD (200 μ M), las células de glioma se diferencia y evolucionan hacia el fenotipo glial, emitiendo proyecciones típicas de los astrocitos. Esta actividad diferenciadora podría estar implicada en los procesos neuroregenerativos necesarios para la recuperación de la actividad motora. Estos resultados muestran la eficacia de OHOD y derivados (p.ej., NaOHOD) para el tratamiento neuroregenerativo necesario para tratar la lesión medular.

35 **Ref. Figura 17.** Efecto de 10 μ l de Salino sódico, Albúmina-Ácido Oleico (Alb-OA-4mM) y Albúmina- Ácido 2-Hidroxi-Oleico (Alb-2OHOA-4mM) sobre la suma temporal del reflejo plantar-Tibialis Anterior (TA), presente por debajo de la contusión moderada a nivel T8, expresado como un porcentaje de la primera respuesta. El eje X de la gráfica representa el número de estímulos y el eje Y representa el incremento en la integral del reflejo Tibialis Anterior (como % de la primera respuesta).

Las ratas tratadas con Albúmina-OHOD (4 mM, 10 μ l por vía intratecal) mostraron una inhibición mayor de la suma temporal del reflejo de retirada plantar-Tibialis Anterior, 28 días después de la lesión medular respecto a las ratas tratadas con suero salino o con Albúmina-Ácido Oleico. Estos resultados sugieren que los complejos de Albúmina-OHOD tienen una gran eficacia en el tratamiento del dolor agudo o crónico.

45 **Ref. Figura 18.** Niveles de interleuquina 6 IL-6 (barra de la izquierda) y del factor de transcripción TNF α (barra de la derecha) en monocitos humanos en ausencia (control) o presencia de un tratamiento pro-inflamatorio con lipopolisacárido bacteriano (LPS). Las células tratadas con LPS se cultivaron en ausencia (Control+LPS) o presencia de diferentes ácidos grasos mostrados en el eje de abscisas. En un modelo celular de inflamación (monocitos U937 en cultivo estimulados con lipopolisacárido bacteriano, LPS) los ácidos grasos de la descripción (250 μ M, 72h) inhibieron significativamente la expresión de las citoquinas proinflamatorias más importantes (IL-6 y TNF- α , $p < 0,05$).

50 **Ref. Figura 19**

A. Efecto de diferentes ácidos grasos en la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) (Cayman COX-1 inhibitor screening system). En el eje de abscisas se muestra el tipo de ácido graso utilizado y en el eje de ordenadas la actividad de la COX-1 (% respecto al control). Los cultivos celulares (monocitos U937 diferenciados) se trataron con los ácidos grasos de la descripción (250 μ M, 6h). El eje de ordenadas muestra la actividad de la COX-1 tras el tratamiento. Se observa como los ácidos grasos de la descripción (OHHD, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHEE y OHDE) tienen un efecto más marcado ($p < 0,05$ en todos los casos) que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sin derivatizar en posición α (EE, DE, HOD, ODO), que los ácidos grasos saturados de idéntica longitud (HD, OD, EO), y que los α -derivados de ácidos grasos cuando no son *cis*-monoinsaturados (OHS, tOHOD).

B. Efecto de diferentes ácidos grasos en la inhibición (concentración de proteína) de la ciclooxigenasa-2 (immunoblot de COX-2). En el eje de abscisas se muestra el tipo de ácido graso utilizado y en el eje de

ordenadas la concentración celular de COX-2 (% respecto al control). Los cultivos celulares (monocitos U937 diferenciados) se trataron con los ácidos grasos de la descripción (250 μ M, 6h). Se observa como los ácidos grasos de la descripción (OHHD, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHEE y OHDE) tienen un efecto más marcado ($p < 0,05$ en todos los casos) que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sin derivatizar en posición α (EE, DE, HOD, ODO), que los ácidos grasos saturados de idéntica longitud (HD, OD, EO), y que los α -derivados de ácidos grasos cuando no son *cis*-monoinsaturados (OHS, tOHOD).

Ref. Figura 20. Temperatura de transición lamelar-hexagonal en membranas modelo de dielaidoil fosfatidiletanolamina (DEPE), medida por calorimetría diferencial de barrido. En el eje de abscisas se representan los ácidos grasos utilizados y en el eje de ordenadas la temperatura. A mayor cambio en esta temperatura de transición mayor capacidad para poder regular la estructura de las membranas, como la que envuelve a células humanas o al virus del SIDA. Los ácidos grasos de la descripción (proporción de ácido graso:DEPE 1:20, mol:mol) indujeron reducciones significativas ($p < 0,05$ en todos los casos) en la temperatura de transición lamelar-hexagonal.

Ref. Figura 21

- A. Ejemplo representativo del efecto de los ácidos grasos de la descripción sobre los “membrana raft”. Membranas modelo de fosfatidilcolina-colesterol-esfingomielina (modelo de *membrane raft*) en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de OHOD. La presencia de este ácido graso induce una reducción en la superficie ocupada por los *membrane rafts* y el tamaño medio de los mismos.
- B. En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto de diferentes ácidos grasos sobre la superficie total de *membrane rafts* (o regiones lamelares ordenadas de membrana, Lo, columna izquierda) respecto a regiones Ld (regiones lamelares desordenadas de membrana, se asigna un valor de 100% a las membranas control) y el tamaño medio (diámetro promedio) de dichos *membrane rafts* (columna derecha), en membranas de fosfatidilcolina-colesterol-esfingomielina. Los ácidos grasos de la descripción regulan la estructura de los “lipid rafts”, por lo que interfieren en la interacción virus-célula, necesaria para producir y amplificar la infección del virus.

Ref. Figura 22. Niveles de DHFR (Dihidrofolato Reductasa) en células A549 tras tratamientos con diferentes ácidos grasos (eje de abscisas) a una concentración de 100 μ M durante 48 horas. Los ácidos grasos de la descripción inducen una reducción muy marcada de esta enzima por lo que tienen una importante actividad en la prevención y/o tratamiento de la malaria y otros procesos infecciosos.

Tabla 1

Ácido Graso	Serie	Abreviatura	Grupo estructural	(a),(b)	(X)
α -Hidroxi- <i>cis</i> - Δ 9-hexadecenoico	16:1	OHHD	1	4, 7	OH
α -Hidroxi- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	OHOD	1	6, 7	OH
α -Metil- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	MOD	1	6, 7	CH ₃
α -Amino- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	AOD	1	6, 7	NH ₂
α -Fluo- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	FOD	1	6, 7	F
α -Trifluorometil- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	TFMOD	1	6, 7	F ₃ C
α -Metoxi- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	MOOD	1	6, 7	O-CH ₃
α -Mercapto- <i>cis</i> - Δ 9-octadecenoico	18:1	SHOD	1	6, 7	HS
α -Metil- <i>cis</i> - Δ 11-octadecenoico	18:1	MOD11	1	4, 9	CH ₃
α -Hidroxi- <i>cis</i> - Δ 11-octadecenoico	18:1	OHOD11	1	4, 9	OH
α -Hidroxi- <i>cis</i> - Δ 11-eicosenoico	20:1	OHEE	1	6, 9	OH
α -Hidroxi- <i>cis</i> - Δ 13- Docosenoico	22:1	OHDE	1	6,11	OH
Cis-Eicosenoico	20:1	EE	2	6, 9	-
Cis-Docosenoico	22:1	DE	2	6,11	-
α -Hidroxi-octadecanoico	18:0	OHS	3	-	OH
Trans-Hexadecenoico	16:1	HD	2	4, 7	-
Trans-Octadecenoico	18:1	OD	4	6, 7	-
Eicosanoico	20:0	EO	4	-	-
Hexadecanoico	16:0	HDO	4	-	-
Octadecanoico	18:0	ODO	4	-	-
α -Hidroxi-trans-octadecenoico	18:1	tOHOD	3	6, 7	OH

- (1) α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (ácidos grasos de la descripción).
 (2) ácidos grasos con doble enlace en configuración *cis*, pero sin modificaciones en el carbono α .
 (3) ácidos grasos con el carbono α modificado, pero sin doble enlace en configuración *cis*.
 (4) ácidos grasos sin doble enlace en configuración *cis* y sin modificaciones en el carbono α .

EJEMPLOS Y REF. EJEMPLOS

Ejemplo 1. Uso de los ácidos grasos de la descripción o de sus sales para la prevención y/o tratamiento del cáncer.

Para estudiar si los ácidos grasos de la descripción tienen aplicaciones en la prevención del desarrollo de procesos tumorales, se utilizó un modelo animal de cáncer. Este modelo consistió en animales inmunodeprimidos (ratones desnudos [Cri:Nu(1co)-Fox1]) a los que se inyectaron células de cáncer humano no microcítico de pulmón (5×10^6 células A549 por animal). El grupo control (infectados con células de cáncer, pero no tratados), comenzó a desarrollar tumores que fueron visibles al cabo de unos días. El tamaño de los tumores se midió por primera vez 10 días después de implantar el tumor y se continuaron las medidas hasta 31 días después de dicha implantación, con un pie de rey digital. El volumen de los tumores se calculó con la siguiente ecuación:

$$v = w^2 \times l / 2$$

donde v es el volumen del tumor, w es la anchura y l la longitud del mismo. Asimismo, se realizaron unos tratamientos preventivos frente al desarrollo de cáncer. Para llevar a cabo estos tratamientos, se administraron 400 mg/kg al día durante 2 semanas antes de la inyección de células tumorales. Este tratamiento se prolongó durante un mes tras la implantación de las células tumorales, y se midió el volumen de los tumores a los animales. Cada grupo experimental estuvo formado por 8 animales. La administración oral de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados previno el desarrollo de cáncer (células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano) (Ref. Figura 2). Sin embargo, la administración de ácidos grasos saturados o *trans*-monoinsaturados (tanto naturales como α -derivatizados) no previno la aparición de cáncer en animales de laboratorio. Por ello, se puede concluir que la introducción de un doble enlace con configuración *cis* en la estructura del ácido graso es un factor crítico en la prevención y tratamiento del desarrollo de cáncer producida por los ácidos grasos. Asimismo, la presencia de una modificación en el carbono α aumenta de forma significativa y muy marcada la eficacia de prevención y tratamiento del desarrollo de cáncer por el tratamiento con ácidos grasos monoinsaturados (Ref. Figura 2). En este sentido, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (OHHD, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHEE y OHDE) tienen un efecto más marcado que los ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sin derivatizar en posición alfa (EE, DE, HOD, ODO), que los ácidos grasos saturados de idéntica longitud (HD, OD, EO), y que los α -derivados de ácidos grasos cuando no son *cis*-monoinsaturados (OHS, tOHOD) (ver Tabla 1).

Por otro lado, se emplearon una serie de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados para investigar su efectividad para el tratamiento de cáncer. Para ello, se realizaron dos tipos de experimentos. En primer lugar, se estudió la dependencia de la concentración sobre el efecto antitumoral de los compuestos estudiados. Para realizar estos experimentos, se cultivaron células de cáncer de pulmón humano (A549) en medio RPMI suplementado con 10% de albúmina bovina fetal, 10 mM Hepes (pH 7,4), 2 mM glutamina, 2 g/l bicarbonato, 1 g/l glucosa, 100 unidades/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomycin, 0.25 μ g/ml Amfotericina B, a 37°C y en presencia de 5% CO₂. En una primera serie experimental, se trataron dichas células con diferentes concentraciones (0-400 μ M) de OHOD y MOD11 y se determinó el número de células a través de citometría de flujo (Ref. Figura 3A). Ambos compuestos redujeron el crecimiento de células tumorales, mostrando valores de IC₅₀ (concentración que reduce al 50% el número de células viables) en el rango de 50 a 100 μ M, tras 48 horas de incubación. Dosis de 200 a 400 μ M produjeron en todos los casos la eliminación total de células tumorales. Por otro lado, se investigó la eficacia antitumoral relativa de estos en células A549 de cáncer de pulmón a una concentración única (150 μ M) y a un tiempo de 48 horas (Ref. Figura 3B). En estos cultivos, la incubación con 150 μ M de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados produjo una inhibición del crecimiento de células tumorales, lo que indica que son moléculas adecuadas para el tratamiento de cáncer. Las moléculas con derivatización en el carbono α (independientemente del tipo de modificación) y con un doble enlace en configuración *cis* (pero no en configuración *trans*) mostraron eficacia antitumoral, de acuerdo con la fórmula arriba indicada. Por el contrario, las moléculas que carecían de una modificación en el carbono alfa (EE, DE, HD, OD, EO, HDO, ODO) no mostraron eficacia antitumoral. De forma similar, las moléculas con doble enlace en posición *trans* (tOHOD) o sin doble enlace (OHS, EO, HDO, ODO, OHS) carecieron de eficacia antitumoral. Obviamente, entre las moléculas anteriores hay algunas que carecen de modificación en el carbono alfa y doble enlace en configuración *cis* (EO, HDO, ODO) que carecían de efecto terapéutico. Estos resultados demuestran que sólo aquellos ácidos grasos que se ajustan a la Fórmula I tienen eficacia terapéutica.

En una segunda serie experimental, diseñada para conocer si estas moléculas sirven para el tratamiento de diferentes tipos de tumores, se estudió el efecto de OHOD a varias concentraciones en células humanas de diferentes tipos de cáncer. Estos experimentos se realizaron como se describió anteriormente, excepto que las líneas celulares M220 y HT-29 se cultivaron en medio DMEM y la línea MDA-MB-231 se incubó en medio L-15 Leibowitz suplementado con 15% de albúmina bovina fetal. En este sentido, se pudo comprobar que estas moléculas tienen un amplio espectro de acción, por lo que su uso se puede extender al tratamiento de varios tipos de cáncer (pulmón, glioma, próstata, mama, páncreas, leucemia, útero, colon, etc., Tabla 2). Dado que estas moléculas no indujeron efectos secundarios de relevancia, que se pueden administrar de forma oral y se pueden tomar en grandes cantidades, su uso puede realizarse tanto a través de aproximaciones nutraceuticas como farmacéuticas. En aquellos casos en los que la naturaleza del proceso tumoral lo requiera, la utilización puede ser de tipo tópico (utilización sobre la piel de los productos activos para el tratamiento de melanoma u otras alteraciones cutáneas de naturaleza tumoral), que puede considerarse cosmético en los casos en los que además se pretenda corregir defectos de naturaleza estética.

Tabla 2

Línea celular	Tipo de cáncer	Mecanismo de acción ¹	Efecto antitumoral ²
PC3	Próstata	P A	+++
LNcaP	Próstata	A	+++
MDA-MB-231	Mama	A	++
M220	Páncreas	A	++
L-1210	Leucemia-linf	A	+++
Jurkat	Leucemia-linf	A	+++
HL-60	Leucemia-miel	P D A	+++
HeLa	Cérvix	A	+++
HT-29	Colon	A	++
C-6	Cerebro-glio	P D	+++
SH-SY5Y	Cerebro-nblast	P	+
A549	Pulmón	P D	+++
T98G	Glioma	D	+++
A172	Glioma	D	++
A118	Glioma	D	+++
SF-767	Glioma	D	++
U87-MG	Glioma	D	+++
SF-268	Glioma	nd	+++
MCF7	Mama	nd	+++
NCI-H460	Pulmón (CPNM)	nd	+++
IMR90	Normal Fibroblasts	nd	-

5 ¹P [antiproliferativo] D [diferenciación] A [apoptosis] nd [no determinado]

² +[inhibición de crecimiento], ++[parada total de crecimiento], +++[eliminación total de células tumorales]

Por otro lado, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados son capaces de inducir la expresión de cadherina. La cadherina es una proteína de adhesión celular. Las células que la expresan no suelen desplazarse de su ubicación tisular, ya que están adheridas a las células del entorno. Las células tumorales que pierden la capacidad de sintetizar esta proteína pueden migrar desde el tejido donde se han generado hasta otros tejidos corporales, donde pueden desarrollar un nuevo foco tumoral a partir de un proceso conocido como metástasis. En tratamientos con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, se observó un aumento significativo de los niveles de cadherina (Ref. Figura 4). Por otra parte, la capacidad invasiva de células cancerosas se investigó en un modelo de invasión de placa de cultivo. En este modelo, se dejan crecer las células hasta que invaden todo el sustrato del frasco de cultivo. A continuación, se realiza un raspado en una zona del frasco de cultivo y se cuenta el número de células que invade esa región a diferentes tiempos, en presencia o ausencia del compuesto anti-metastásico. Como muestra la Ref. Figura 5, las células de cáncer de pulmón cultivadas en presencia de OHOD tienen una capacidad invasiva inferior a la que presentan las células no tratadas. Estos resultados indican que estos α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden ser empleados para prevenir o tratar el desarrollo de metástasis tumorales.

Además, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados impiden la proliferación de células vasculares (ver adelante), lo que impide la creación de vasos sanguíneos, necesaria para el desarrollo de tumores. Por ello, estas moléculas pueden ser utilizadas como anti-angiogénicas tumorales.

Una característica importante de las moléculas englobadas en la presente descripción es que pueden formarse diferentes tipos de sales. En la Figura 6A y en la Tabla 5 se muestran los efectos terapéuticos de varios α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados y sus sales. En este sentido, bien debido a una mejor absorción o distribución de estas moléculas, algunos de estos compuestos tiene efectos significativamente superiores a los presentados por las formas de ácido graso libre, lo que sugiere que esta forma sería la preferida a la hora de elaborar un medicamento o

diseñar una terapia para el tratamiento de dicha enfermedad. La especificidad de este efecto viene determinada por la relación entre dosis y efecto que producen estas moléculas sobre el volumen de tumores humanos implantados en animales (**Ref. Figura 6B**). Dado que la forma Na-OHOD (sal de sodio del OHOD) presenta una mayor eficacia que su correspondiente ácido graso libre, se estudió su acción antitumoral en diferentes tipos de cáncer humano xenotransplantados en ratones inmunodeprimidos (**Figura 7**): leucemia, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon.

Dado que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados tienen un mecanismo muy diferente al de otros fármacos antitumorales actualmente empleados, la combinación de estos ácidos grasos con cualquier fármaco antitumoral puede dar lugar a eficacias superiores, que incluso logran curar a animales infectados con cánceres humanos. En la **Figura 8**, se muestra el efecto del Na-OHOD sólo o combinado con temozolomida, erlotinib, gemcitabina y cisplatino para el tratamiento de glioma (cáncer de cerebro) humano, cáncer de pulmón humano y cáncer de páncreas humano en modelos de ratones inmunodeprimidos. Por una parte, se puede observar que el NaOHOD es más eficaz que los otros fármacos empleados en humanos para el tratamiento del cáncer. Por otro lado, la combinación de Na-OHOD con cualquiera de estos fármacos dio lugar a reducciones marcada y significativamente inferiores a las producidas tanto por el Na-OHOD sólo como por cualquiera de los fármacos antitumorales arriba indicados. Es más, el tumor residual observado en la mayoría de animales tratados con Na-OHOD y en la práctica totalidad de los tratados con dos moléculas de forma simultánea estaba constituido por células muertas sin capacidad de regenerar el tumor, por lo se puede considerar que estas terapias combinatorias produjeron la curación de los tumores humanos implantados en animales.

Todos estos datos indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados son agentes que pueden ser utilizados en la (a) prevención y (b) el tratamiento del cáncer por su efecto directo sobre las células tumorales. Además, son agentes de amplio espectro, ya que impiden el crecimiento de una amplia gama de células tumorales de muy variada naturaleza. Debido a su falta de toxicidad se pueden usar en poblaciones de alto riesgo, como fumadores, personas expuestas a riesgos biológicos o radiológicos que puedan derivar en desarrollo de cáncer, portadores de alteraciones genéticas o somáticas asociadas al desarrollo de tumores de diversa índole, etc. Asimismo, se pueden utilizar en la prevención o tratamiento de los procesos de metástasis y angiogénesis en pacientes en los que se haya desarrollado algún proceso tumoral. Estas moléculas se pueden administrar de forma oral y no presentan efectos tóxicos aparentes, por lo que se pueden emplear como medicamentos o como alimentos funcionales. Además, su utilización en tumores de piel puede ser de tipo tóxico.

Ref. Ejemplo 2. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de la proliferación de células vasculares y otras patologías del corazón y vasos sanguíneos.

La proliferación de células vasculares está en la base de determinadas patologías, como aterosclerosis, cardiomiopatías, hiperplasia cardíaca, hipertensión y otras patologías cardíacas y de la vasculatura, así como la angiogénesis tumoral. Para determinar la eficacia de los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados contra la proliferación de células vasculares, se estudió el efecto de diferentes ácidos grasos sobre la multiplicación de células A10, que son células vasculares normales de origen aórtico. En este sentido, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados empleados mostraron tener una elevada potencia para inhibir la hiper-proliferación de células vasculares A10. Este efecto no es tóxico, ya que el número de células no disminuyó tras la adición de los compuestos, sino que evitó la proliferación en presencia de suero fetal, que contiene moléculas que inducen la multiplicación celular. Para cultivar las células A10 se empleó medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino, empleando otros aditivos y condiciones indicados anteriormente. Al medio de cultivo se añadieron los ácidos grasos listados en la **Tabla 1**, utilizando dos controles de crecimiento. El primero de ellos, carecía de cualquier ácido graso, mientras que el segundo carecía de ácidos grasos y de suero fetal bovino (Sin Suero). Finalmente, se realizó el recuento de células mediante citometría de flujo.

Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados indujeron una detención de la proliferación celular similar a la que produce la retirada de suero fetal bovino (que contiene múltiples factores de crecimiento celular) a una concentración de 200 μ M (**Ref. Figura 9**). Estos datos indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados son moléculas que pueden ser usadas para la prevención y tratamiento de aterosclerosis, cardiomiopatías, angiogénesis dependiente de tumores, hiperplasia cardíaca, hipertensión y otras patologías relacionadas, a través de medicamentos o alimentos funcionales.

Por el contrario, los ácidos grasos que no presentan dobles enlaces, o el doble enlace tienen configuración *trans*, no son eficaces a la hora de reducir la proliferación de células de aorta, A10. De forma similar, los ácidos grasos que no presentaban modificaciones en el carbono α , no tuvieron efectos importantes sobre la proliferación de células A10. En cambio, los ácidos grasos con el doble enlace en configuración *cis* y una modificación en el carbono α , produjeron efecto, con independencia del radical que introducido en dicho carbono. Por otro lado, la angiogénesis tumoral viene mediada por la proliferación de células vasculares alrededor de cánceres. Por ello, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados son potentes anti-angiogénicos, que pueden ser empleados también para evitar la proliferación de vasos sanguíneos que aporten nutrientes a los tumores de nueva formación.

En otra serie experimental, se investigó la eficacia de diferentes ácidos grasos para prevenir la aparición de hipertensión. Para ello, se trataron ratas hipertensas (SHR) con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados y otros ácidos grasos (**Ref. Figura 10**). Las ratas SHR son normotensas durante sus primeros meses de vida, hasta que llegan a la madurez y adquieren su condición de hipertensas (entre los 3 y 4 meses de edad). Para determinar si los derivados empleados eran capaces de prevenir el desarrollo de hipertensión, se trataron ratas SHR de 10 semanas con diferentes ácidos grasos. Estos animales son todavía normotensos a esta edad, teniendo una presión arterial de entre 130 y 140 mmHg, que fue medida al inicio del tratamiento. Los animales se dividieron en grupos experimentales de 8 animales de forma que la media de presión arterial fuera similar en todos los grupos (valores de media entre 128 y 132 mmHg para todos los grupos al inicio del experimento). El estudio de la prevención del desarrollo de hipertensión se realizó administrando a los animales una dosis de 200 mg/kg al día durante 10 semanas y se midió la presión arterial al final del tratamiento. En la **Ref. Figura 10**, se observa que los animales tratados con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados no desarrollaron hipertensión, mientras que los no tratados o tratados con ácidos grasos que no se ajustan a la estructura mostrada en la Fórmula I, sí que desarrollaron hipertensión. Este resultado es claramente diferente del de un efecto para el tratamiento de la hipertensión, ya que la prevención evita que los animales padezcan hipertensión en algún momento de su vida. Por ello, la prevención del desarrollo de hipertensión evitaría todos los problemas asociados a dicho estado, como la hipertrofia cardíaca, el riesgo de accidente cardiovascular, de isquemia, etc. De hecho, en animales tratados con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados se observaron reducciones significativas en el peso del corazón en animales hipertensos (reducciones de entre el 2% y el 7% en el peso del corazón de ratas SHR para los compuestos englobados en la presente descripción). Los animales hipertensos realizan un sobre-esfuerzo cardíaco para compensar la resistencia que opone el sistema vascular al paso de la sangre, por lo que tienden a presentar una hipertrofia cardíaca. Por ello, los compuestos de la presente descripción pueden ser utilizados para el tratamiento de varias patologías relacionadas con los procesos de hipertrofia cardíaca.

Por otro lado, se emplearon una serie de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (**Tabla 5**), pudiéndose observar de nuevo que el Na-OHOD presenta una mayor eficacia que el OHOD, lo que indica que la sustitución del hidrógeno (H) en la posición **R** por sodio (Na) aumenta el poder terapéutico del ácido graso para el tratamiento de la hipertensión.

Todos estos resultados demuestran que la estructura indicada en la Fórmula I es la adecuada tanto para la prevención como para el tratamiento de patologías relacionadas con la proliferación de células del corazón o vasos sanguíneos. Estos tratamientos se pueden realizar a través de aproximaciones farmacéuticas, nutracéuticas y tópicas/estéticas.

La aterosclerosis o arteriosclerosis es una patología caracterizada por la pérdida de contractibilidad de los vasos sanguíneos. Dicha pérdida está asociada a diversos factores, entre los que se encuentran la formación de depósitos en el lumen vascular que dan lugar a la proliferación de células vasculares, la reducción del flujo sanguíneo y la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora a neurotransmisores (tales como la noradrenalina) y a hormonas. En estudios en aorta de rata aislada en baño de órganos, hemos podido comprobar que el poder de contracción del músculo aórtico en respuesta a noradrenalina aumenta de forma muy marcada tras pretratamientos con ácido OHOD. Además, todos los compuestos que se ajustan a la Fórmula I producen efectos similares sobre la musculatura vascular. Estos resultados indican claramente la capacidad de estos compuestos para prevenir o tratar la aterosclerosis y patologías relacionadas. En la **Ref. Figura 11** se muestra el efecto del pretratamiento *in vitro* (baño de órganos) con OHOD sobre la capacidad de contracción de aorta de ratas SHR. Como demuestra la figura, la capacidad de contracción inducida por noradrenalina (NA) es mucho mayor en aorta de ratas pretratadas con este ácido graso. Este resultado indica claramente que la flexibilidad del tejido vascular aumenta de forma significativa ($p < 0,05$) en presencia de este compuesto, lo que justifica la utilidad de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados en la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis y otras patologías cardiovasculares. Además, la mejora en la respuesta de la contractibilidad en aorta indica que estos compuestos también pueden ser empleados para el mantenimiento del tejido vascular en sujetos sanos y en el tratamiento de vasos deteriorados en pacientes de patologías cardiovasculares.

50 **Ref. Ejemplo 3. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de patologías cutáneas y enfermedades relacionadas.**

Los errores en la producción de melanina dan lugar a defectos en la pigmentación cutánea pueden ser de naturaleza patológica. Para estudiar la aplicación potencial de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados al tratamiento de melanopatías, se midió la producción de melanina en melanocitos de ratón (células B16). Para ello, las células se rompieron con NaOH y se determinó la concentración de melanina por absorción espectroscópica a 490 nm, utilizando el método anteriormente descrito por Curto y colaboradores (1999). En este sentido, concentraciones de 100 μ M de estos compuestos durante 48 horas producen reducciones en el contenido en melanina en células B16 (**Ref. Figura 12**). Estos resultados indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados que se ajustan a la fórmula I pueden emplearse para el tratamiento de problemas dermatológicos relacionados con patologías de la pigmentación. De forma similar a lo que ocurre con el tratamiento de otras patologías, los ácidos grasos que no se ajustan a la Fórmula I carecen de efectos significativos para regular el contenido de melanina (**Ref. Figura 12**).

Por otro lado, la **Ref. Figura 12** también muestra el efecto de los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (100 μ M, 48 horas) sobre la proliferación de adipocitos (células 3T3-L1). Las moléculas que tienen la estructura

delimitada por la Fórmula I inhiben el crecimiento de las células 3T3-L1, mientras que las moléculas que no tienen la estructura descrita en dicha Fórmula I no tienen efectos significativos sobre la proliferación de los adipocitos (**Ref. Figura 12**). Este tipo de células adiposas pueden crecer de forma anómala o multiplicarse de forma anómala, en zonas subcutáneas (hipertrofia o hiperplasia de los adipocitos). Este crecimiento anómalo puede dar lugar a procesos patológicos de diversa índole, como la obesidad o la celulitis.

Los resultados mostrados aquí indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados se pueden emplear α para la prevención y el tratamiento de patologías como la obesidad, la celulitis, vitiligo, la soriasis y manchas de la piel y similares. Dada la especial tipología de la piel y las capas que subyacen a ésta, el tratamiento de algunas de estas patologías puede realizarse de forma tópica, por lo que estas moléculas pueden emplearse como cosméticos. El tratamiento de estas patologías también puede realizarse a través de aproximaciones farmacológicas y nutracéuticas.

Ref. Ejemplo 4. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de metabopatías (patologías metabólicas: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes) y obesidad.

Las enfermedades metabólicas forman un conjunto de patologías caracterizadas por la acumulación o el déficit de ciertas moléculas (colesterol, triglicéridos, glucosa, etc.) en suero y tejidos. Estas alteraciones son el reflejo de disfunciones, que normalmente se asocian a errores en la actividad de ciertos enzimas o en el control de dichas proteínas. Entre las metabopatías más importantes se encuentran la hipercolesterolemia (elevados niveles de colesterol), hipertrigliceridemia (elevados niveles de triglicéridos) y la diabetes (elevados niveles de glucosa). Estas patologías tienen tasas de incidencia, de morbilidad y mortalidad elevadas, por lo que su tratamiento es una necesidad de primer orden. En este sentido, el tratamiento con OHOD produjo reducciones importantes de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa (**Ref. Figura 13**) en ratas Sprague-Dowley (hembras de 300 g). Para realizar estos experimentos, se suministró de forma oral, a la dosis indicada en cada caso de forma diaria (0, 200, 400 y 600 mg/kg al día). Al final del tratamiento (30 días) se extrajo sangre de los animales control y tratados (n = 6) y se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa utilizando métodos colorimétricos estándar. Los efectos observados dependieron de la dosis, lo que indica su especificidad.

Por otro lado, se estudió el efecto de las diferentes moléculas estudiadas a dosis única (600 mg/kg). En estos estudios, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados mostraron un efecto importante sobre la reducción de colesterol, triglicéridos y glucosa. En cambio, las moléculas que no tienen la estructura arriba indicada, tampoco tienen efectos terapéuticos (**Ref. Figura 13**). En este sentido, la modificación en el carbono α y el doble enlace en la configuración *cis* son elementos cruciales para producir el efecto terapéutico arriba indicado. Aquellas moléculas análogas que no se ajustan a la Fórmula I carecen de efectos para el tratamiento eficaz de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y diabetes (**Ref. Figura 14**). Finalmente, se investigó el efecto de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sobre la prevención de la obesidad. Para ello, se utilizó un modelo de rata con obesidad inducida por dieta de cafetería, una alimentación hipercalórica que aumenta el peso de los animales de forma muy marcada. Se realizaron varios grupos experimentales (ver **Tabla 3**), cada uno consistente en 6 ratas hembras Wistar Kyoto de 250-300 g de peso. Todos los animales recibieron una dieta estándar durante 2 semanas. Además, 2 de los grupos recibieron un pretratamiento preventivo oral de vehículo y los otros grupos recibieron 300 mg/kg de los ácidos grasos abajo indicados. Después, uno de los grupos control se mantuvo con dieta estándar (control delgado) y al otro se le alimentó con dieta de cafetería (control obeso). Asimismo, los grupos de animales tratados se alimentaron con dieta de cafetería. En todos los grupos se mantuvo el pretratamiento preventivo. Después de dos semanas con estas dietas, el grupo control delgado aumentó su peso corporal un promedio de 16±16 gramos, en tanto que el grupo control obeso había aumentado un promedio de 43±17 gramos de peso corporal (significancia estadística, $p < 0,01$). Las ratas tratadas con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados mostraron incrementos en el peso similares al control delgado y significativamente inferiores al control obeso ($p < 0,05$), con respecto al cuál consumían una misma dieta. Por lo tanto, los animales pretratados con estos ácidos grasos presentaban reducciones marcadas y estadísticamente significativas con respecto a los animales que recibían una dieta de cafetería idéntica. En este contexto, el uso de determinados derivados (sales) de los ácidos grasos recogidos en esta descripción produjo un efecto terapéutico mayor en algunos casos, con reducciones en los niveles de colesterol (CHO) y triglicéridos (TG) superiores a los observados tras los tratamientos con los ácidos grasos libres (**Tabla 5**).

Por otro lado, el peso de los animales tratados era estadísticamente inferior al peso de las ratas obesas y estadísticamente indistinguibles de las ratas delgadas. Estos resultados, junto a la prevención de ganancia de peso (**Tabla 3**) y la inhibición del desarrollo de adipocitos (**Ref. Figura 12**), indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados constituyen moléculas activas para el tratamiento y la prevención del desarrollo de obesidad. Cabe destacar que en esta serie experimental con animales (**Tabla 5**) no se realizó un pretratamiento, lo que indica que Na-OHOD tiene una mayor eficacia para el tratamiento de la obesidad que el OHOD. Asimismo, tanto las sales como otras formas farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de estas y otras metabopatías muestran una gran actividad terapéutica, por lo que su uso puede ser indiferente o escogerse entre aquellas formas que presenten una seguridad farmacológica mayor.

TABLA 3

DIETA RECIBIDA Y TRATAMIENTO PREVENTIVO	Peso inicio estudio	Peso fin estudio
Estándar+tratamiento vehículo (Control delgado)	264±21	280±16
Cafetería+tratamiento vehículo (Control obeso)	265±14	308±17
Cafetería+tratamiento OHHD	259±21	275±19*
Cafetería+tratamiento OHOD	269±11	284±13*
Cafetería+tratamiento MOD	255±12	268±12*
Cafetería+tratamiento AOD	249±14	272±15*
Cafetería+tratamiento FOD	261±13	279±13*
Cafetería+tratamiento TFMOD	262±12	278±14*
Cafetería+tratamiento MOOD	251±21	263±22*
Cafetería+tratamiento SHOD	254±16	269±16*
Cafetería+tratamiento MOD11	257±16	274±18*
Cafetería+tratamiento OHOD11	256±10	269±12*
Cafetería+tratamiento OHEE	252±9	264±11*
Cafetería+tratamiento OHDE	260±12	273±15*
Cafetería+tratamiento EE	258±14	301±17‡
Cafetería+tratamiento DE	253±11	305±12‡
Cafetería+tratamiento HDO	255±15	299±15‡
Cafetería+tratamiento ODO	259±19	301±18‡
Cafetería+tratamiento EO	262±12	298±12‡
Cafetería+tratamiento HD	260±16	309±15‡
Cafetería+tratamiento OD	259±14	311±17‡
Cafetería+tratamiento OHS	251±10	314±11‡
Cafetería+tratamiento tOHOD	258±17	312±19‡

* Significativamente inferior a control obeso ($p < 0,05$)

‡ Estadísticamente indistinguible del control obeso ($p > 0,05$)

5

Por otro lado, la combinación de varias de estas patologías da lugar a un proceso denominado síndrome metabólico. Los resultados mostrados en esta sección indican claramente que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados son moléculas muy activas para la prevención y el tratamiento de la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, la diabetes, el síndrome metabólico, la obesidad, y otras metabolopatías, a través de aproximaciones farmacéuticas o nutracéuticas.

10

Ref. Ejemplo 5. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de patologías neurodegenerativas.

15

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, en cambio, dan lugar a alteraciones de tipo motor, como la enfermedad de Parkinson o diferentes tipos de esclerosis. Finalmente, ciertas patologías neurodegenerativas pueden derivar en procesos en los que se desarrolla ceguera, problemas de audición, desorientación, alteraciones en el estado de ánimo, etc.

20

Un ejemplo de desorden neurodegenerativo bien caracterizado lo constituye la enfermedad de Alzheimer, en la que se ha observado la formación de placas seniles, formadas por restos de proteínas de membrana (p.ej., el péptido β -amiloide) procesadas erróneamente, que se acumulan en el exterior de las células y de ovillos de neurofilamentos 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 (Raid et al., 2007). De hecho, el desarrollo de esta enfermedad está relacionado con otras patologías en las que se han descrito alteraciones del metabolismo lipídico, y más concretamente del colesterol, como las de tipo cardiovascular.

25

30

Por otro lado, la esclerosis y otros procesos neurodegenerativos se relacionan con la "desmielinización", cuyo resultado neto es la pérdida de lípidos en la cubierta de los axones neuronales, con las consiguientes alteraciones en el proceso de propagación de señales eléctricas. 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 glía (células de Schwann). Por todo ello, está claro que los lípidos juegan un papel importantísimo en el desarrollo de patologías neurodegenerativas.

35

Dado que los lípidos que se ajustan a la Fórmula I son capaces de reducir los niveles de colesterol (Ref. Figuras 13 y 14), se podría pensar a priori que podrían ser efectivos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Tras un estudio realizado Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados han mostrado tener una gran eficacia para

40

prevenir la neurodegeneración en un modelo animal (**Ref. Figura 15**). Los ratones transgénicos empleados en este estudio, que sobreexpresan ApoB-100, se caracterizan por un inicio temprano de un síndrome similar a la enfermedad de Alzheimer, con una importante pérdida cognitiva y características cito-histológicas similares a las que presentan los procesos neurodegenerativos en humanos. En estos animales, los tratamientos con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados dieron lugar a mejoras marcadas y significativas de los parámetros cognitivos en animales. Para este estudio, se trataron los ratones (n=8) durante 6 meses con 100 mg/kg por vía oral 5 veces a la semana (lunes a viernes). El grupo control consistió en ratones (n=8) tratados con vehículo (agua) de forma similar al grupo problema. Para los determinar la capacidad cognitiva de los animales se emplearon el laberinto radial y el test de Miller y se definió la capacidad cognitiva de los animales control (no tratados) como 100% (Wise et al., 2007; Patil et al., 2006). La capacidad cognitiva de animales tratados con diferentes tipos de ácidos grasos se expresó como porcentaje de mejora en la realización de estos tests. Estos resultados indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden ser utilizados para el tratamiento de patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, los diferentes tipos de esclerosis, enfermedad de Parkinson, etc., a través de aproximaciones farmacéuticas y nutracéuticas.

Ref. Ejemplo 6. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de lesiones medulares y dolor.

El sistema nervioso central, después del tejido adiposo, es el que más lípidos contiene en el organismo, de lo que se deduce la importancia de éstos para las neuronas y células de la glía. En este contexto, los ácidos grasos recogidos en la presente descripción pueden prevenir y curar los síntomas funcionales, como por ejemplo la pérdida de función motora, dolor neuropático o espasticidad, inducidos por una lesión medular. Para prolongar la liberación de OHOD y similares después de una inyección única de compuesto, se unieron a albúmina bovina sérica (complejos Albúmina-Ácido Graso, o A-AG, donde AG puede ser OHOD) y se observó la recuperación de actividad motora (**Ref. Figura 16**).

Tal y como se muestra en la **Ref. Figura 16A**, el complejo Albúmina-OHOD, a una dosis de 4 mM en 10 μ l por vía intratecal, potenció la recuperación de la función motora voluntaria en general desde 4 a 28 días después de la lesión medular en ratas, comparado con los animales tratados suero salino o con Albúmina-Ácido Oleico. Estos resultados demuestran que los complejos de Albúmina-OHOD tienen efectos neuroregeneradores y neurotróficos durante la fase crónica de la lesión medular. Este efecto puede deberse a la inducción del brotamiento de proyecciones neurales necesarias para restablecer las conexiones perdidas por la lesión medular. En la **Ref. Figura 16B** se observa el efecto del OHOD (sal de sodio) sobre la diferenciación y emisión de proyecciones en células U118, que justifica la capacidad neuroregeneradora y neurotrófica de los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados.

Por otro lado, los ensayos *in vivo* realizados demuestran que la administración de un complejo A-AG puede inhibir los cambios en la sensibilidad y función sensitivomotora, siendo por ello de aplicación al tratamiento de cambios en la nocicepción y el dolor. Concretamente, las ratas tratadas con Albúmina-OHOD (4 mM, 10 μ l por vía intratecal) mostraron una inhibición mayor de la sumación temporal del reflejo de retirada plantar-Tibialis Anterior, 28 días después de la lesión medular respecto a las ratas tratadas con suero salino o con Albúmina-Ácido Oleico (**Ref. Figura 17**). Estos resultados sugieren que los complejos de Albúmina-OHOD tienen una gran eficacia en el tratamiento del dolor crónico.

Por tanto, los ensayos realizados indican que las moléculas recogidas en la presente descripción pueden ser utilizadas para la prevención de la aparición de la parálisis motora y el tratamiento del dolor neuropático y la espasticidad derivados de lesiones medulares.

En vista de lo anterior, medicamentos basados en un complejo A-AG permitirían el tratamiento de lesiones medulares especialmente de lesiones traumáticas.

En una realización particular, la albúmina se selecciona de albúmina nativa o recombinante de origen humano, bovino, murino, o de conejo, o de la ovoalbúmina y la lactoalbúmina, más preferiblemente, la albúmina utilizada es albúmina sérica humana o albúmina sérica bovina, tal y como se utiliza en los ejemplos del presente documento. Todas estas albúminas tienen estructuras y funciones similares. Por ejemplo, una comparación de una secuencia de albúmina bovina con una de albúmina humana muestra una correspondencia en la secuencia de aminoácidos del 76%. La correspondencia se eleva al 88% cuando se tiene en cuenta si se tienen en cuenta los cambios conservativos.

Para estos ensayos, el complejo albúmina-ácido graso (A-AG) se preparó en una solución de albúmina al 2% (p/v) y se añadió ácido oleico o OHOD hasta alcanzar una concentración final de 78 mM. Se preparó una solución de 50% de albúmina – ácido graso (1:1), a concentración de 78 mM, disuelto en suero salino.

Dicho efecto sobre la recuperación motora después de la lesión medular podría ser explicado por un efecto neurotrófico a través de la membrana lipídica de las neuronas ilesas (p.ej. Kim et al., J.Gen Physiol. 2000; 115(3): 287-304), específicamente en la base de las neuritas con el resultado de crecimiento dendrítico, la regulación alta de GAP-43 y la proteína asociada de microtúbulos (MAP-2, Taberner, Lavado et al., 2001; Rodríguez-Rodríguez et al., 2004). El

receptor para albúmina, la megalina, ha sido identificado en la membrana de los oligodendrocitos específicamente en la médula espinal (Wicher et al., J. Neurol. Res. 2996; 83(5):864-73).

El efecto sobre la sensibilización central a estímulos nocivos después de la lesión medular podría ser explicado por una regulación de la astrogliosis a través de la membrana lipídica con la inhibición de las uniones tipo gap por el ácido oleico (Lavado et al., J. Neurochem. 1997; 69(2):71-8) o por una reducción en la morfología reactiva de las células astrocitos por la albúmina (Manning y Sntheimer, Glia 1997; 20(2):163-72).

Ref. Ejemplo 7. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de procesos inflamatorios.

Los procesos inflamatorios tisulares y celulares se caracterizan por la acción de citoquinas proinflamatorias (interleuquinas-4, -6, -8, -10, TNF- α , etc.) liberadas por células del sistema inmune (linfocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, etc.) tras una estimulación producida por un patógeno (infección) o una agresión antigénica. Los procesos inflamatorios causan una gran variedad de enfermedades entre las que se incluyen las cardiovasculares, las sistémicas, las del aparato locomotor, envejecimiento y enfermedades respiratorias, como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las inflamaciones de diferente índole. Esta liberación descontrolada de citoquinas proinflamatorias se debe fundamentalmente a la activación patológica del factor de transcripción NF κ B (Barnes et al., 1997).

En un modelo celular de inflamación (monocitos U937 en cultivo estimulados con lipopolisacárido bacteriano, LPS) los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (250 μ M, 72h) inhibieron significativamente la expresión de las citoquinas proinflamatorias más importantes (IL-6 y TNF- α). Por el contrario, los compuestos cuya estructura no cumple la Fórmula I no inhibieron la expresión de éstas citoquinas proinflamatorias (Ref. Figura 18).

En un estudio adicional sobre la liberación de varias citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10) y TNF- α en monocitos U937 estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS), se observó una marcada disminución de los niveles de estas moléculas tras tratamientos con OHHD a una concentración de 250 μ M y 72 h de incubación (Tabla 4). En este mismo sistema se estudió el efecto de los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (250 μ M, 6h) en la actividad y la expresión de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Estos ácidos grasos inhibieron significativamente la actividad de la COX-1 (Ref. Figura 19A) y la expresión de la COX-2 (Ref. Figura 19B). Por el contrario, los compuestos cuya estructura no cumple la Fórmula I no inhibieron la expresión de éstas citoquinas proinflamatorias (Ref. Figura 19).

Estos resultados indican que los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden ser eficaces para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria autoinmune conocida como artritis reumatoide, al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, cuyos niveles aumentan de forma marcada en pacientes de artritis reumatoide. La inhibición de la función de la COX-1 y COX-2 por estos ácidos grasos indica que éstos compuestos son de utilidad en el tratamiento del dolor e inflamación. Podemos considerar a estos ácidos grasos como una nueva generación de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Así mismo, la inhibición de la actividad de la función de la COX-1 y COX-2 indica que estos ácidos grasos también pueden ser de utilidad para el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares y reducir el riesgo de eventos isquémicos como ataques al corazón. Por todo ello, debido a la importante inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias por los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados, éstos pueden utilizarse para la prevención y el tratamiento de procesos inflamatorios y derivados de ellos, como el dolor o la artritis reumatoide, tanto a nivel sistémico como a nivel tópico y a través de aproximaciones farmacéuticas, nutracéuticas y tópicos/cosméticas.

Tabla 4. Inhibición de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por OHHD

Citoquina	Control (pg/ml)	LPS (pg/ml)	LPS + OHHD (pg/ml)
IL-1b	12 \pm 2	132 \pm 2	41 \pm 5
IL-6	24 \pm 3	1072 \pm 4	68 \pm 8
IL-8	345 \pm 7	967 \pm 8	529 \pm 7
IL-10	32 \pm 1	315 \pm 9	53 \pm 3
TNF- α	15 \pm 6	1504 \pm 7	65 \pm 9

p<0,001. Media \pm error estándar de 6 experimentos realizados por triplicado.

Ref. Ejemplo 8. Utilización de los ácidos grasos de la descripción para la prevención y/o tratamiento de patologías infecciosas.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está producido por la infección con el picornavirus de inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus tiene una envuelta lipídica, de forma que la integridad de la envuelta viral es imprescindible para la fusión con la membrana de las células humanas. Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados modifican la estructura de membranas modelo, similares a las que tiene el virus del SIDA (Ref. Figura 20), por lo que pueden ser empleados para el tratamiento de esta enfermedad.

La unión entre el virus VIH y la célula huésped se realiza también a través del receptor CD4. Esta proteína de células eucariotas se encuentra ubicada en regiones específicas de la membrana celular denominadas “membrane rafts”. Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados disgregan la estructura de los “lipid rafts”, por lo que interfieren en la interacción virus-célula, necesaria para producir y amplificar la infección (Ref. Figura 21). Por todo ello, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden ser empleados para la prevención y el tratamiento del SIDA.

La malaria es, como el SIDA, una enfermedad infecciosa que en este caso es producida por el protozoo denominado *Plasmodium falciparum*. Este organismo tiene una división celular muy rápida, por lo que necesita sintetizar ADN de forma constante. Para la síntesis de ADN se precisa elevados niveles de tetrahidrofolato, que actúa como co-enzima en algunos enzimas encargados de producir nucleótidos para sintetizar ADN. El enzima encargado de producir tetrahidrofolato es la Dihidrofolato Reductasa (DHFR). Por ello, actualmente se están empleando inhibidores de la DHFR, como el metotrexato, para tratar la malaria (Nduati y cols. 2008). Los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados inducen una reducción muy marcada de este enzima, lo que induce una caída importante de los niveles de DHFR (Ref. Figura 22), por lo que pueden tener una importante actividad frente al desarrollo de malaria. Frente a fármacos como el metotrexato, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados presentan dos ventajas. Por un lado, tienen una toxicidad menor. Por otra parte, la reducción de la expresión del enzima es un mecanismo mucho más eficaz que la inhibición del mismo (que produce elevados niveles de enzima que pueden activarse al acabar el tratamiento). Por todo ello, los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados pueden constituir fármacos para el tratamiento eficaz de la malaria.

Asimismo, los agentes que inhiben la producción de tetrahidrofolato son agentes antibacterianos eficaces. Este hecho, junto a las evidencias presentadas en este ejemplo acerca de la efectividad de los α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados frente al desarrollo de procesos infecciosos de índole muy diversa, indica que estas moléculas pueden ser eficaces agentes para la prevención o el tratamiento de patologías de naturaleza infecciosa.

Ref. Ejemplo 9. Utilización de los ácidos grasos de la descripción y varias sales para la prevención y/o tratamiento de varias patologías.

Determinados átomos en localizaciones definidas de una molécula con actividad farmacológica pueden variar su absorción, distribución en el organismo o su interacción con macromoléculas celulares. Esto puede suponer cambios tanto en sentido positivo como negativo en la eficacia terapéutica de un principio activo. En la Tabla 5 se muestra la potencial eficacia terapéutica de diferentes sales de α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados para el tratamiento de cáncer, metabolopatías (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia), obesidad e hipertensión. En este sentido, se ha podido comprobar que la sal de sodio de OHOD (Na-OHOD) tiene en general una mayor eficacia que el ácido graso libre para la reversión de diferentes patologías. Lo mismo ocurre con Na-DEPOD frente a DEPOD. Por ello, en la formulación de medicamentos con α -derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados sería más recomendable emplear el derivado sódico de dichas sustancias.

Tabla 5

Efectos terapéuticos de diferentes derivados de ácidos grasos <i>cis</i> -monoinsaturados y sus sales en diferentes patologías						
	IC ₅₀		% del control		Peso corporal (g)	PA (control 214 mmHg)
	A549	SF767	CHO	TG	(control=311 g)	
OHOD	62	71	55	38	292	146
Na-OHOD	47	52	51	32	281	128
OMe-OHOD	94	107	71	64	299	155
EE-OHOD	79	68	62	47	295	161
NH3-OHOD	81	85	59	62	290	149
ACOD	153	179	59	53	301	157
Na-ACOD	124	132	49	35	298	166
OMe- ACOD	246	214	86	74	296	152
EE- ACOD	185	176	72	56	294	158
MOOD	61	73	65	64	279	142
Na-MOOD	77	91	63	68	272	131
OMe-MOOD	149	128	77	69	296	143
EE-MOOD	168	195	64	66	297	154
DEPOD	57	99	58	43	301	147
Na-DEPOD	32	104	45	37	298	159
OMe-DEPOD	66	43	63	45	293	175
EE- DEPOD	77	82	69	49	295	168

OHOD: α -Hidroxi-*cis*- Δ 9-octadecenoico; ACOD: α -Acetil-*cis*- Δ 9-octadecenoico; MOOD: α -Metoxi-*cis*- Δ 9-octadecenoico; DEPOD: α -dietil-fosfatidil-*cis*- Δ 9-octadecenoico. El átomo o molécula que sustituye la posición R en la fórmula I es sodio

(con prefijo "Na"), éster metílico (OMe), éster etílico (EE), amonio (NH₃) o hidrógeno (sin prefijo). El parámetro medido para determinar la potencia antitumoral fue el valor de IC₅₀ (concentración que reduce el número de células a la mitad) en células tumorales humanas A549 y SF767. Los valores se expresan en concentración micromolar (μM). La segunda columna muestra los niveles de colesterol (CHO) y triglicéridos (TG) en valor porcentual respecto a controles no tratados (100%). Las ratas recibieron una dosis diaria de 600 mg/kg de las sustancias indicadas en la tabla (para otros detalles sobre el tratamiento ver texto). La tercera columna muestra el peso (gramos, g) corporal de ratas que recibieron una dosis de cafetería durante 2 semanas. Las ratas control, que pesaron 311 g al final del tratamiento (media de 6 animales), recibieron vehículo (agua), mientras que los animales tratados recibieron 300 mg/kg cada día de las sustancias indicadas en la tabla. PA: presión arterial (mmHg). Se midió la presión arterial en ratas hipertensas tras un tratamiento de 8 días con cada uno de los compuestos arriba indicados (400 mg/kg). Como se indica en el encabezamiento, la PA media de ratas no tratadas fue de 214 mmHg. En todas las series experimentales con animales mostradas en esta tabla, los tratamientos fueron siempre orales.

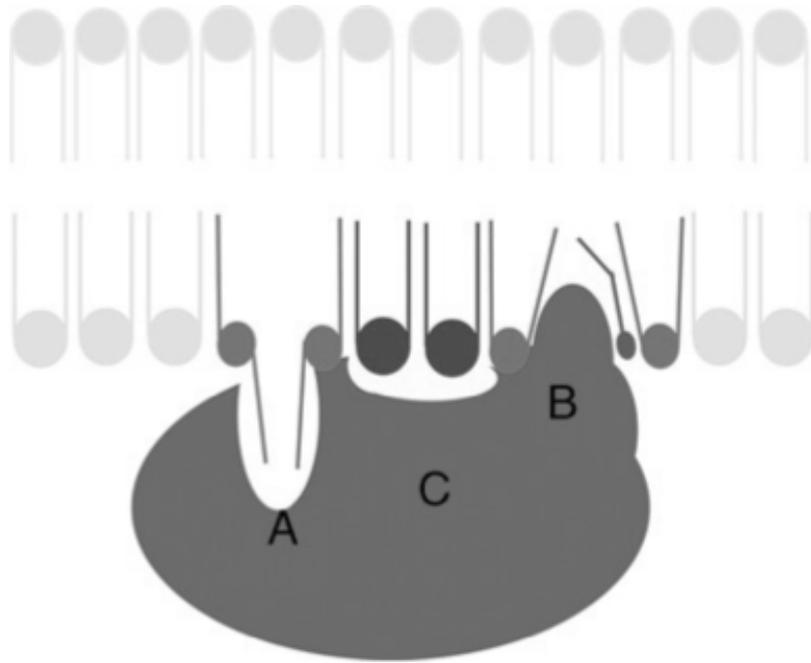
15 REFERENCIAS

1. 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.
2. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**:1066-71
3. 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.
4. Curto EV, Kwong C, Hersmerdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ, Jr., Dooley TP (1999) *Biochem Pharmacol* **57**:663-672
5. Escriba PV, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. (1995) Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:7595-7599.
6. Escriba PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas T, García-Sevilla JA (1997) Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:11375-11380.
7. Escribá PV (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **12**:34-43
8. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquets X, Horváth I, Barceló-Coblijn G (2008) Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell. Mol. Med.* **12**:829-875.
9. 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.
10. Nduati y cols. Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol Res* 102: 1227-1234 (2008).
11. Patil CS, Singh VP, Kulkarni SK (2006) Modulatory effect of Sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacological Reports* **58**: 373-380.
12. Raid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T. (2007) Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med* **11**:383-392
13. Stender S, Dyerberg J (2004) Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.* **48**:61-66.
14. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Litchman AH (2007) Combination of Rimonabant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1805-1812.
15. 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.
16. Lladó, V. Casas, J., Martínez, J., Gutiérrez, A., Busquets, X., Escribá, P. V.. (2007) Molecular basis of the antiproliferative effect of 2-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid (Minerval) in human leukemia Jurkat cells. *Chemistry and Physics of Lipids* 149 (Suppl S): S84.

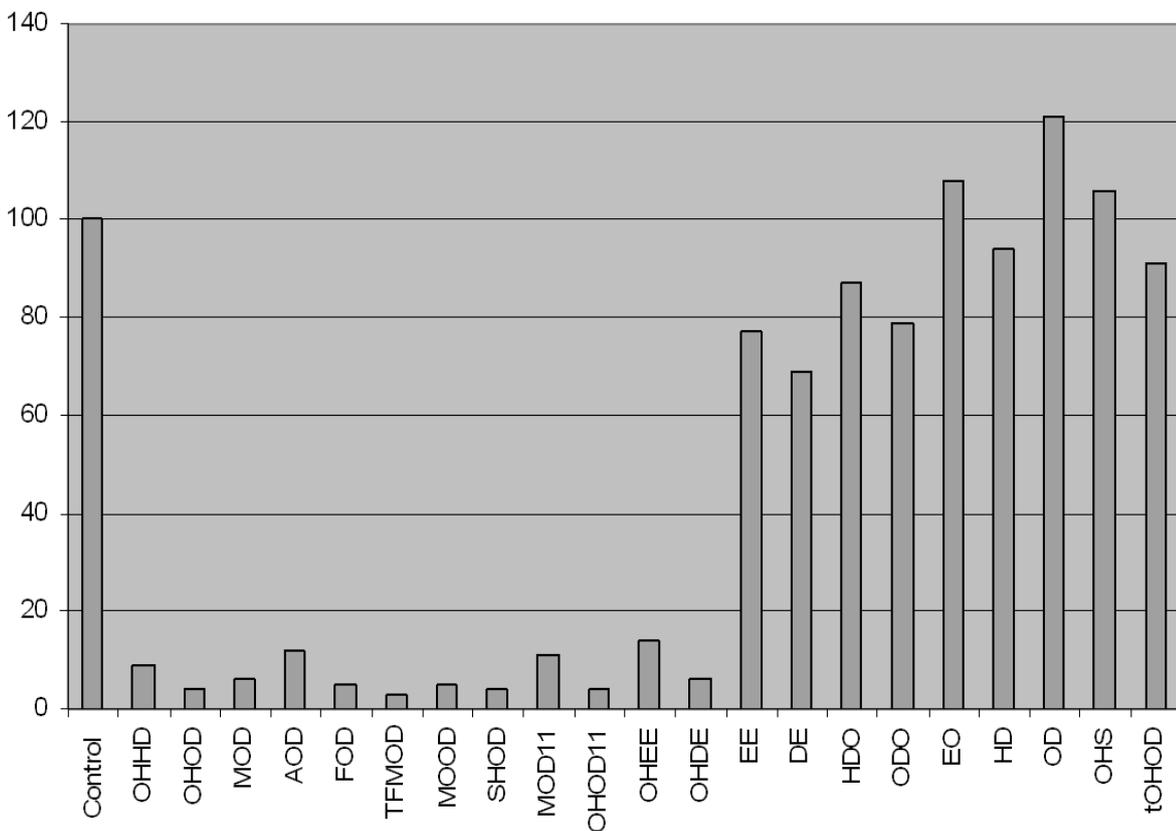
REIVINDICACIONES

- 5
1. Compuesto *cis*-COONa-**OH**CH-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃ (sal de sodio del ácido α-hidroxi-*cis*-Δ⁹-octadecenoico) para uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer.
2. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer pancreático.
- 10
3. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso, independientemente o en combinación con un segundo compuesto con actividad terapéutica o excipiente, en la prevención y/o tratamiento del cáncer.
- 15
4. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 3, para uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer en combinación con al menos un segundo compuesto con actividad terapéutica seleccionado entre: temozolomida, erlotinib, gemcitabina y cisplatino.
- 20
5. Composición farmacéutica y/o nutracéutica que comprende *cis*-COONa-**OH**CH-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃ y al menos un segundo compuesto con actividad terapéutica o excipiente.
6. Composición farmacéutica y/o nutracéutica, de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende *cis*-COONa-**OH**CH-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₇-CH₃ y al menos un segundo compuesto con actividad terapéutica seleccionado entre: temozolomida, erlotinib, gemcitabina y cisplatino.

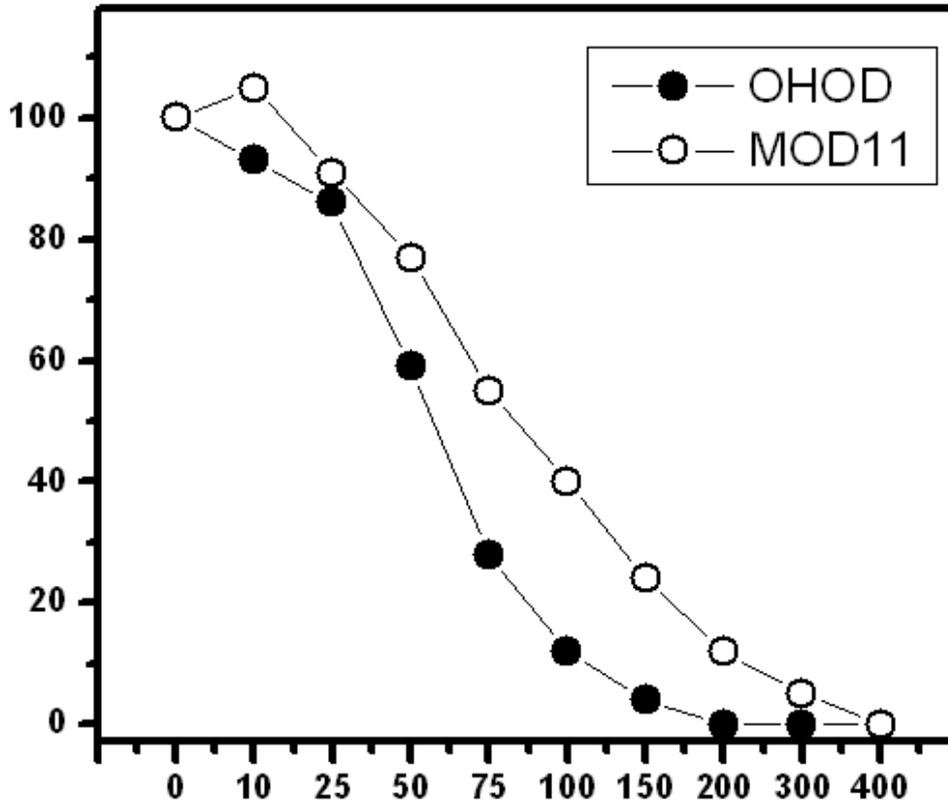
REF. FIGURA 1



REF. FIGURA 2



REF. FIGURA 3A



REF. FIGURA 3B

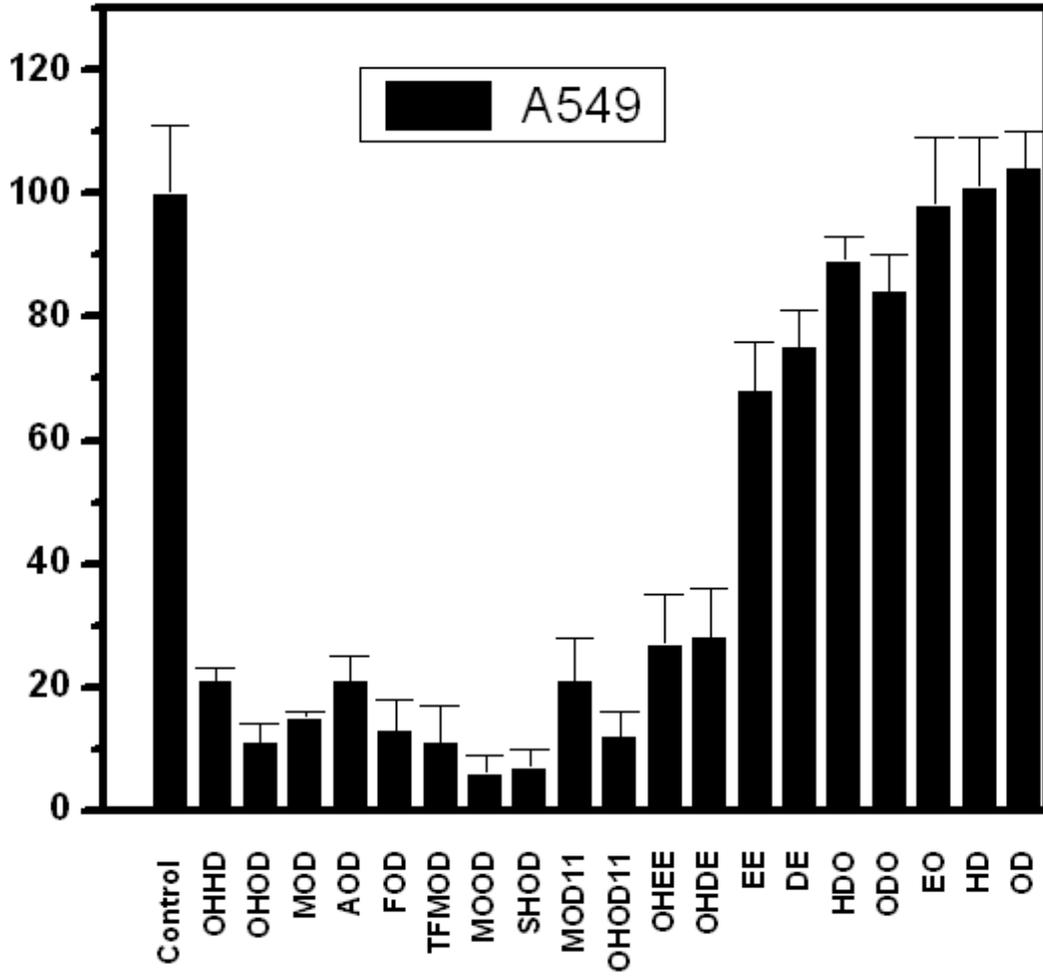
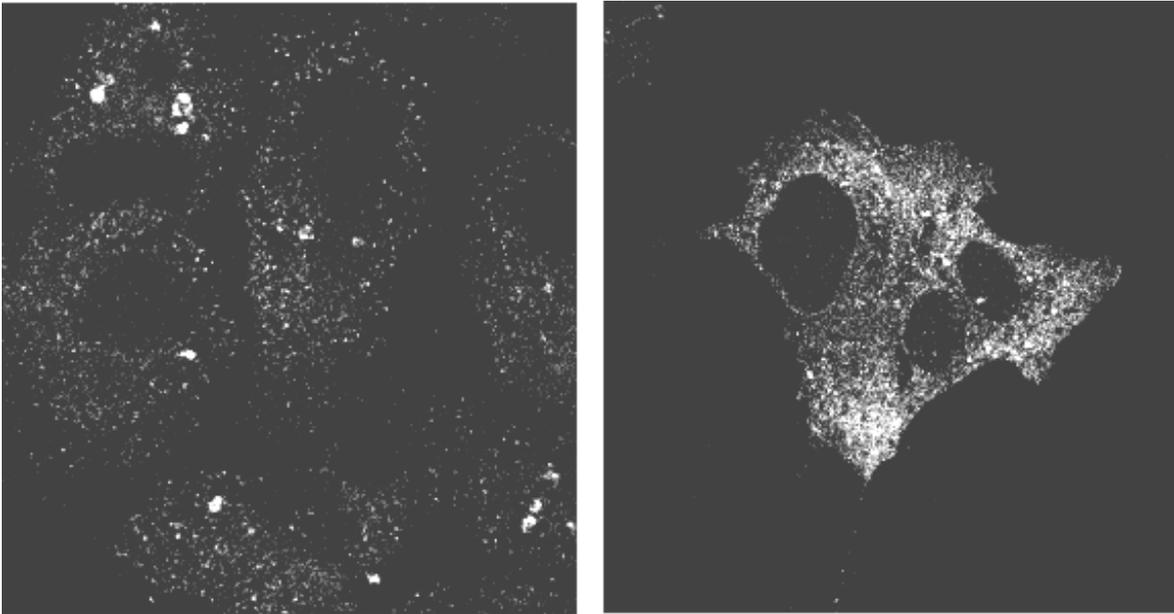


FIGURA 4



REF. FIGURA 5

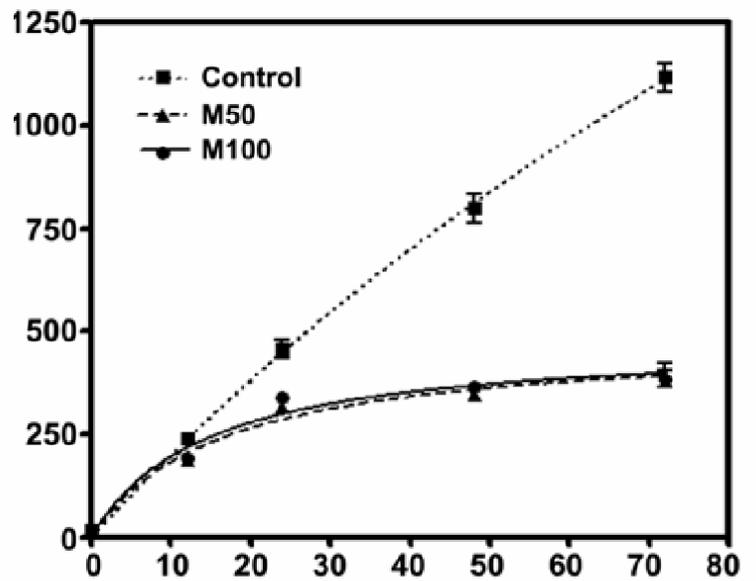
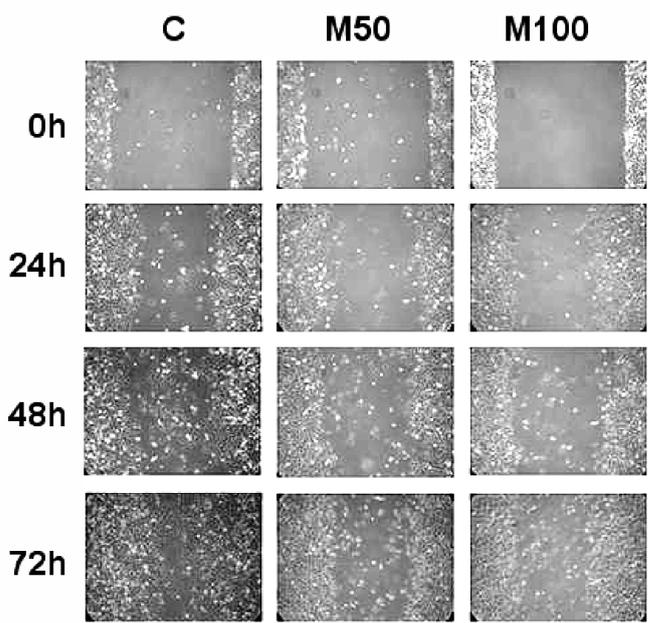


FIGURA 6A

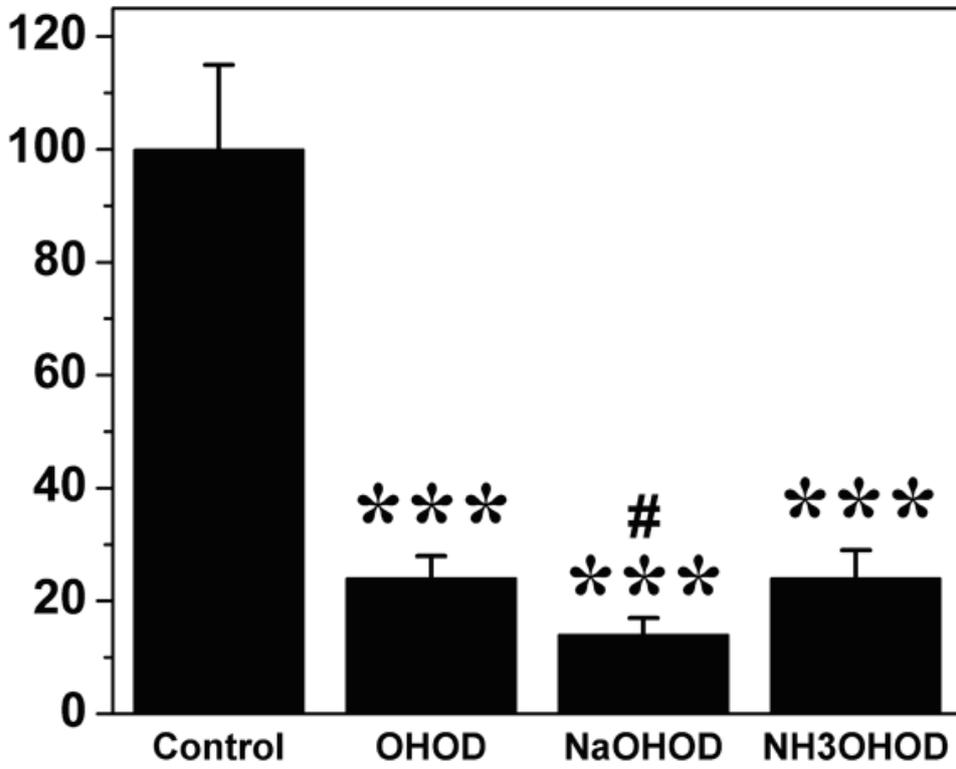


FIGURA 6B

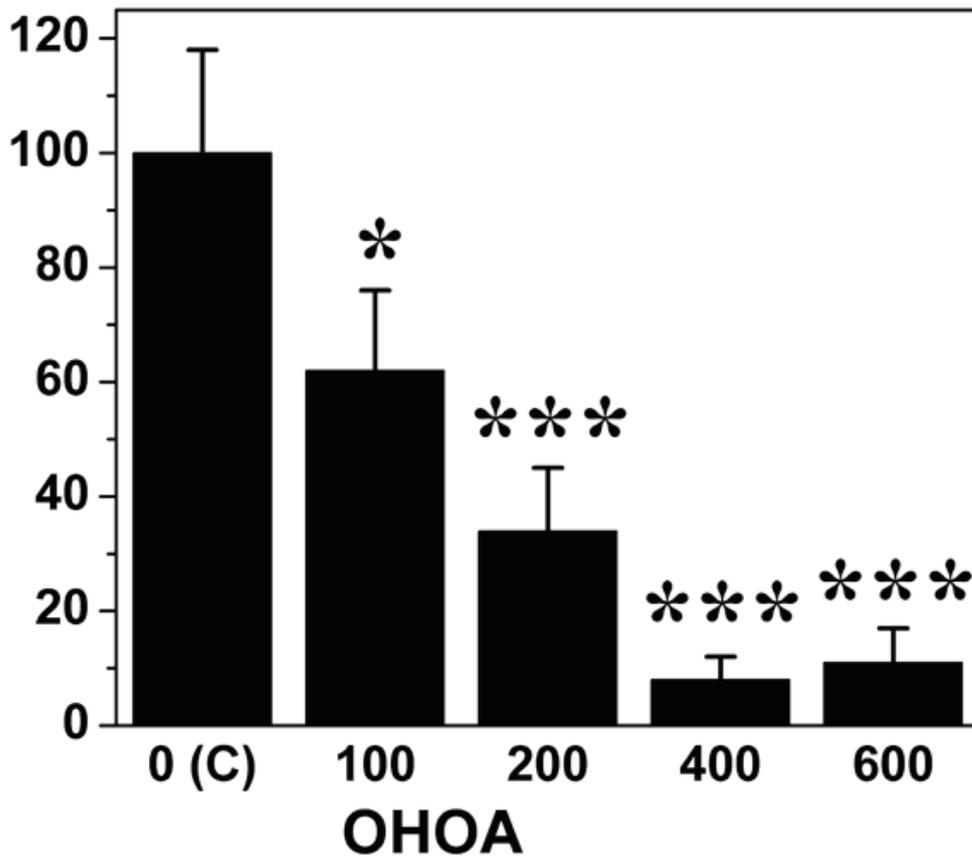


FIGURA 7A

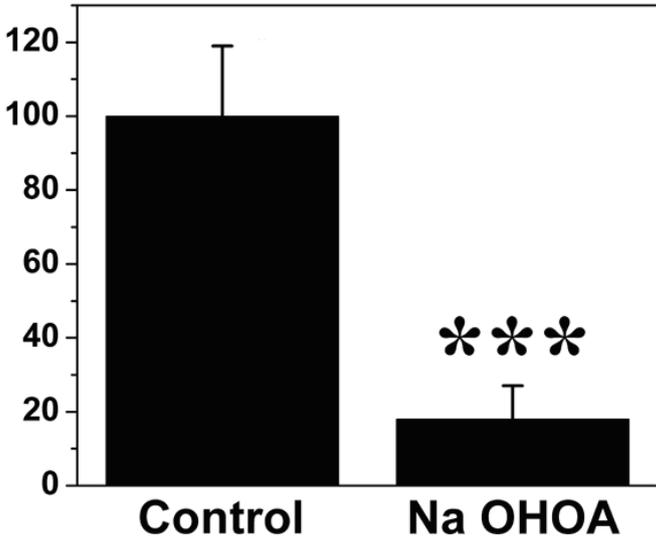


FIGURA 7B

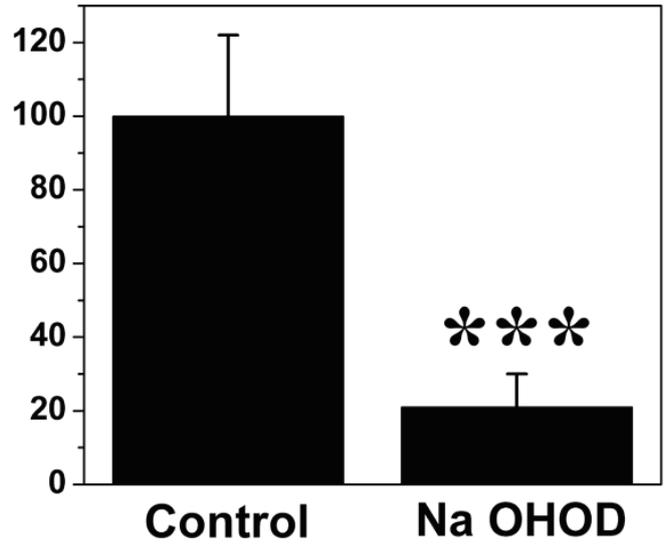


FIGURA 7C

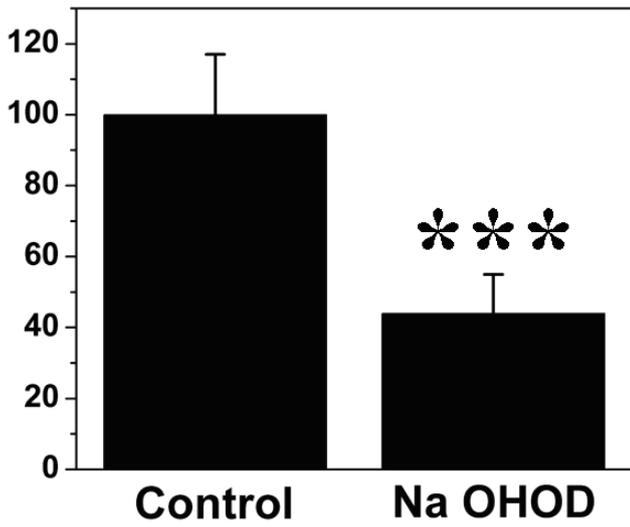


FIGURA 7D

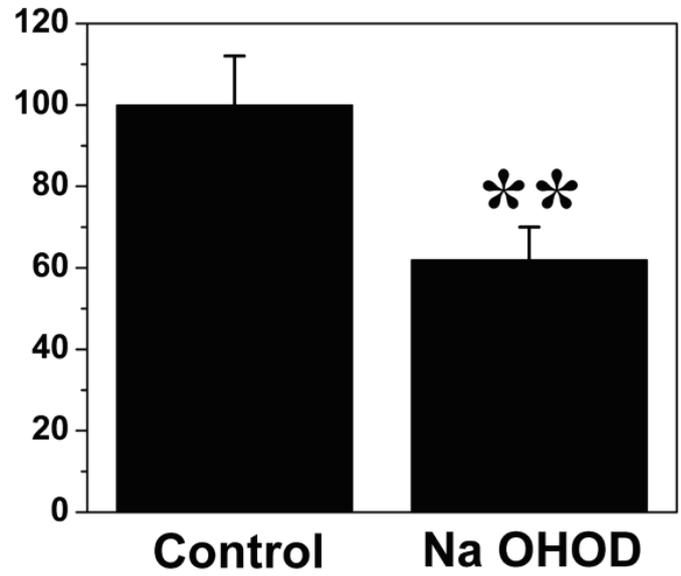


FIGURA 8A

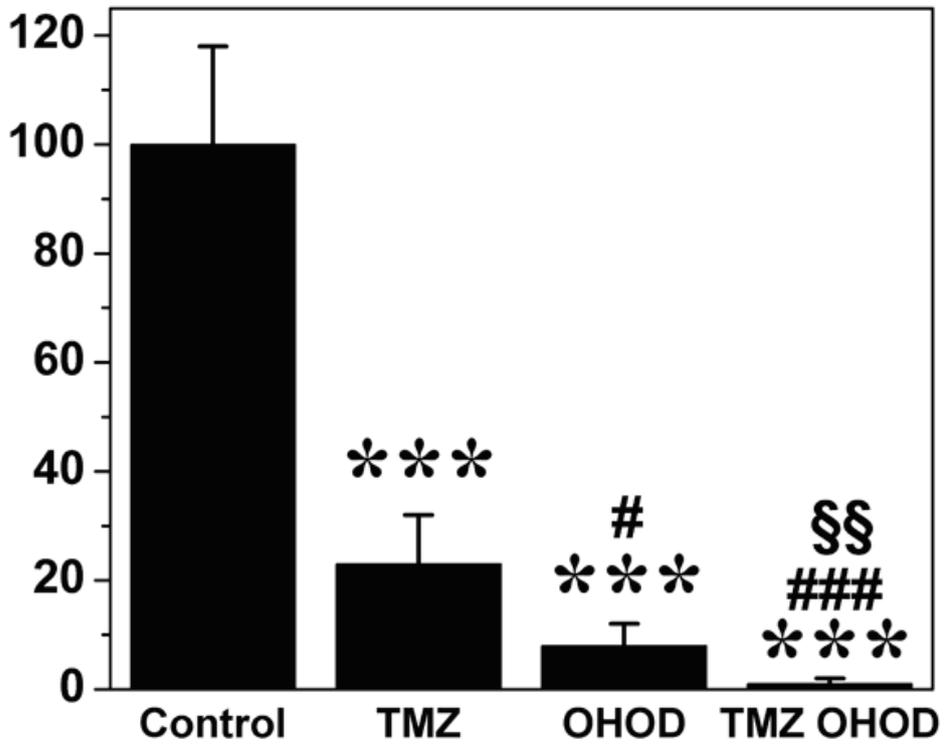


FIGURA 8B

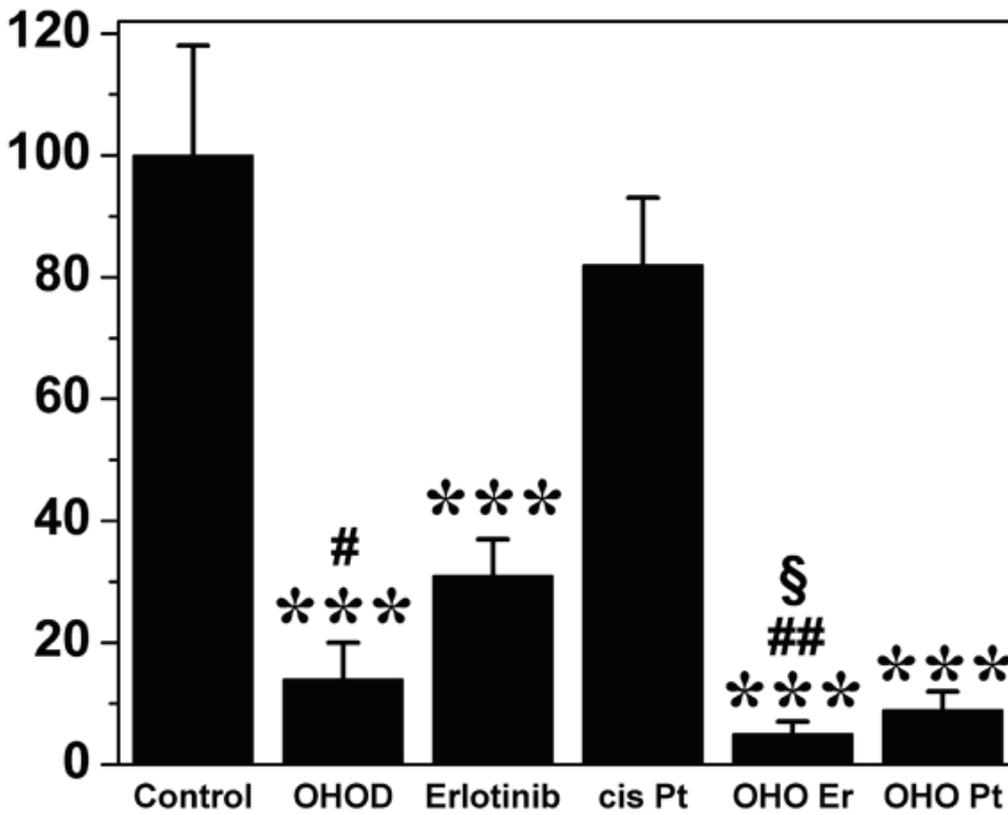
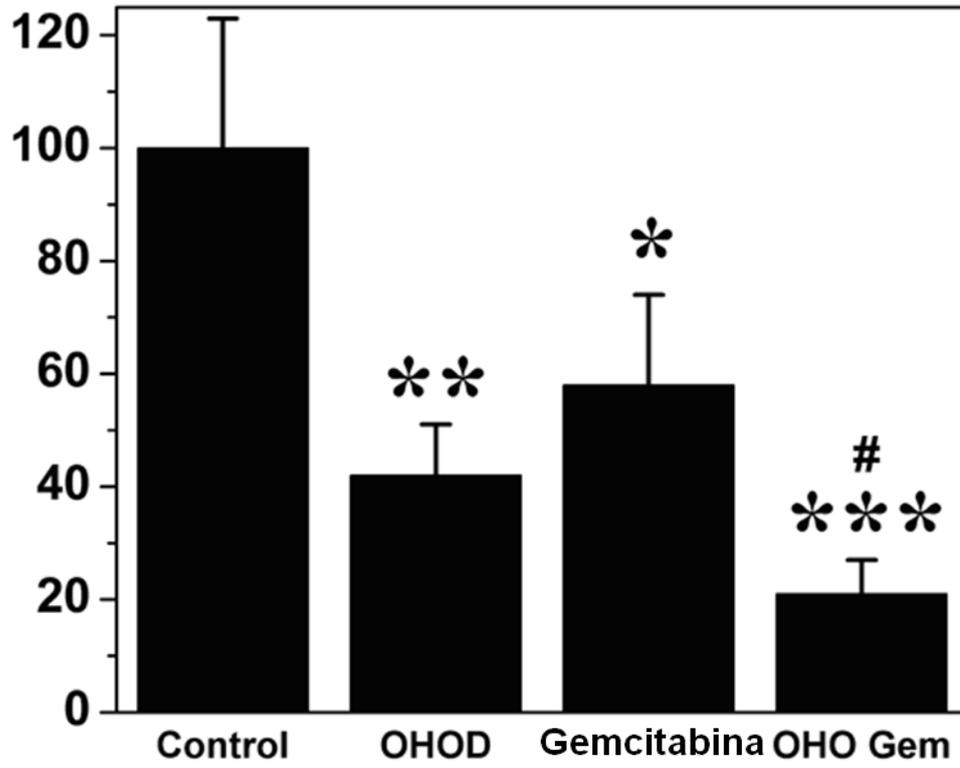
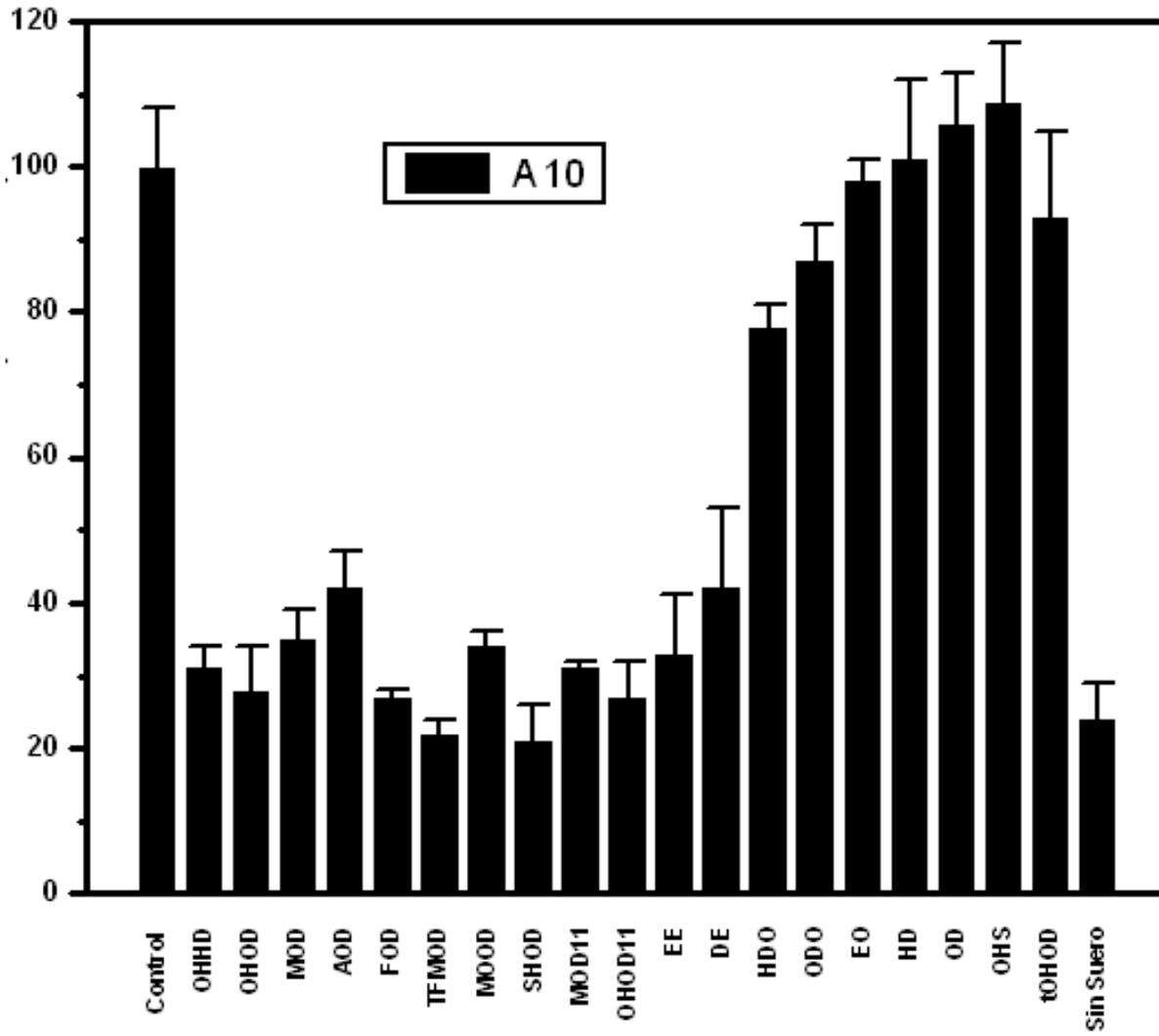


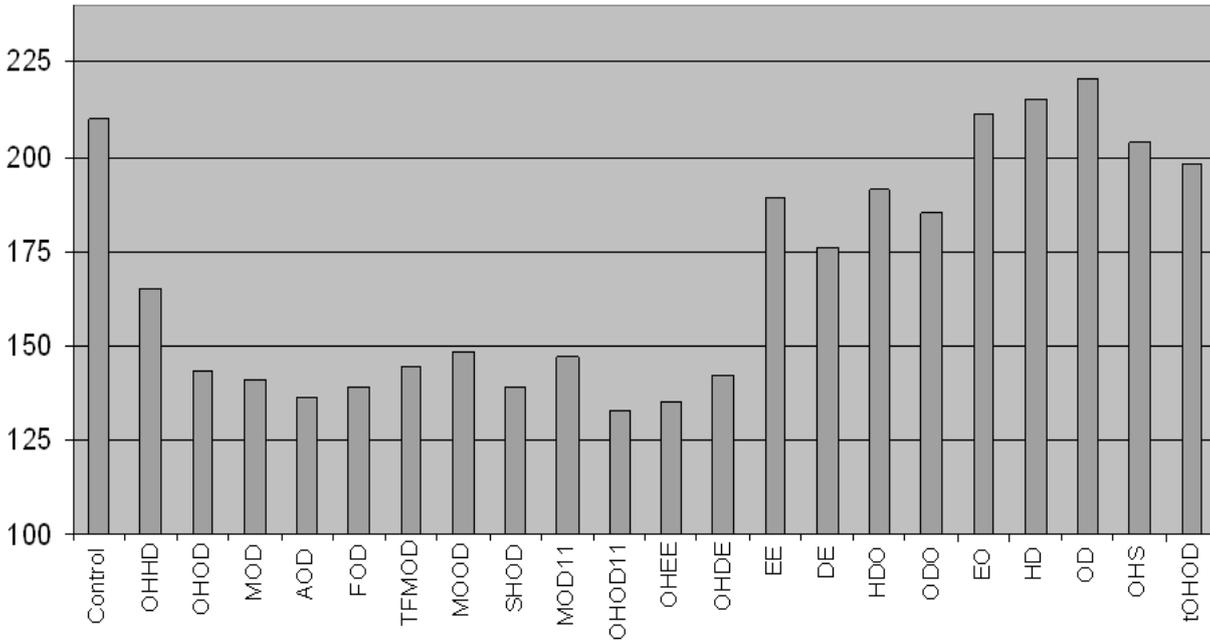
FIGURA 8C



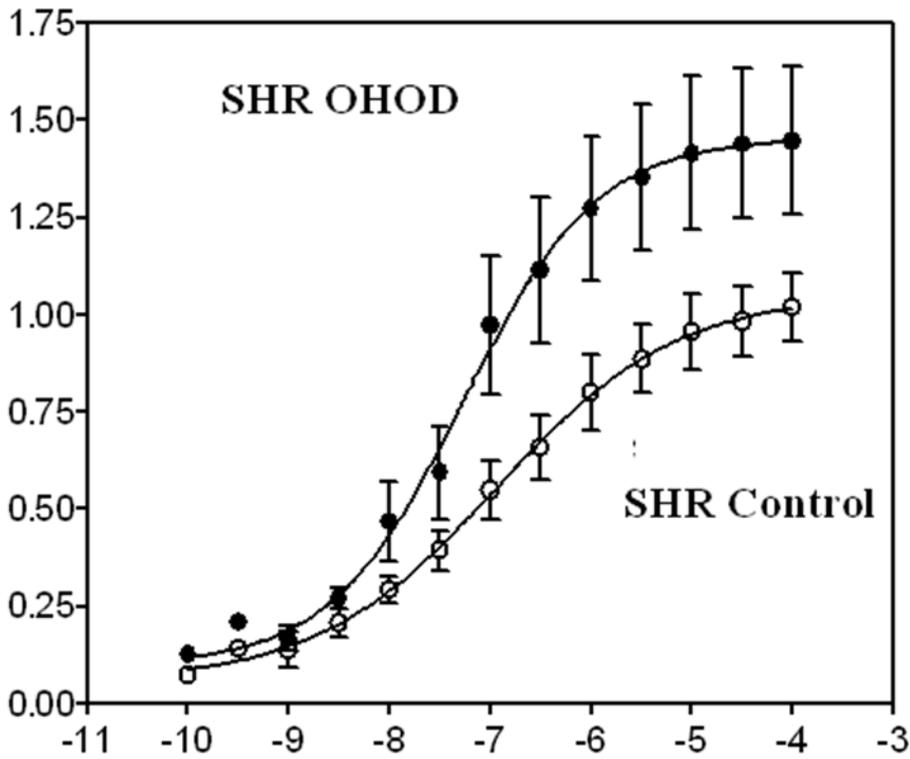
REF. FIGURA 9



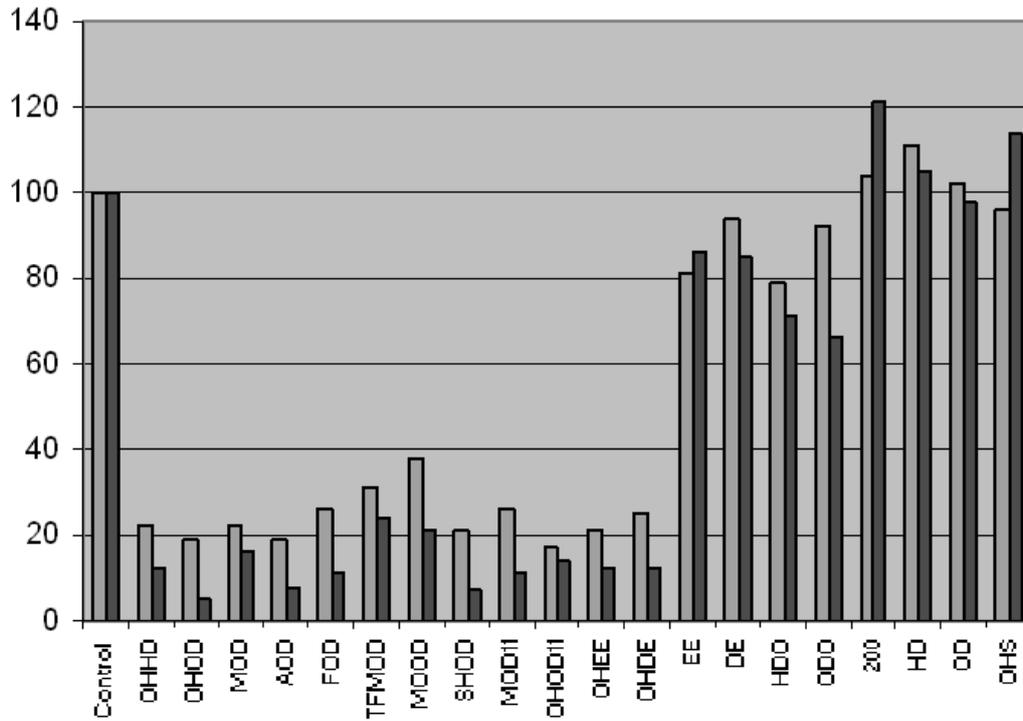
REF. FIGURA 10



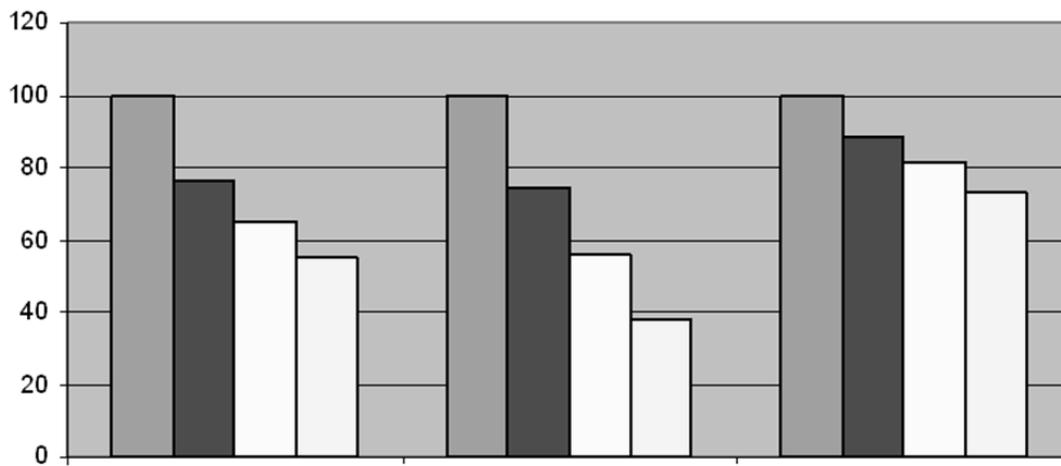
REF. FIGURA 11



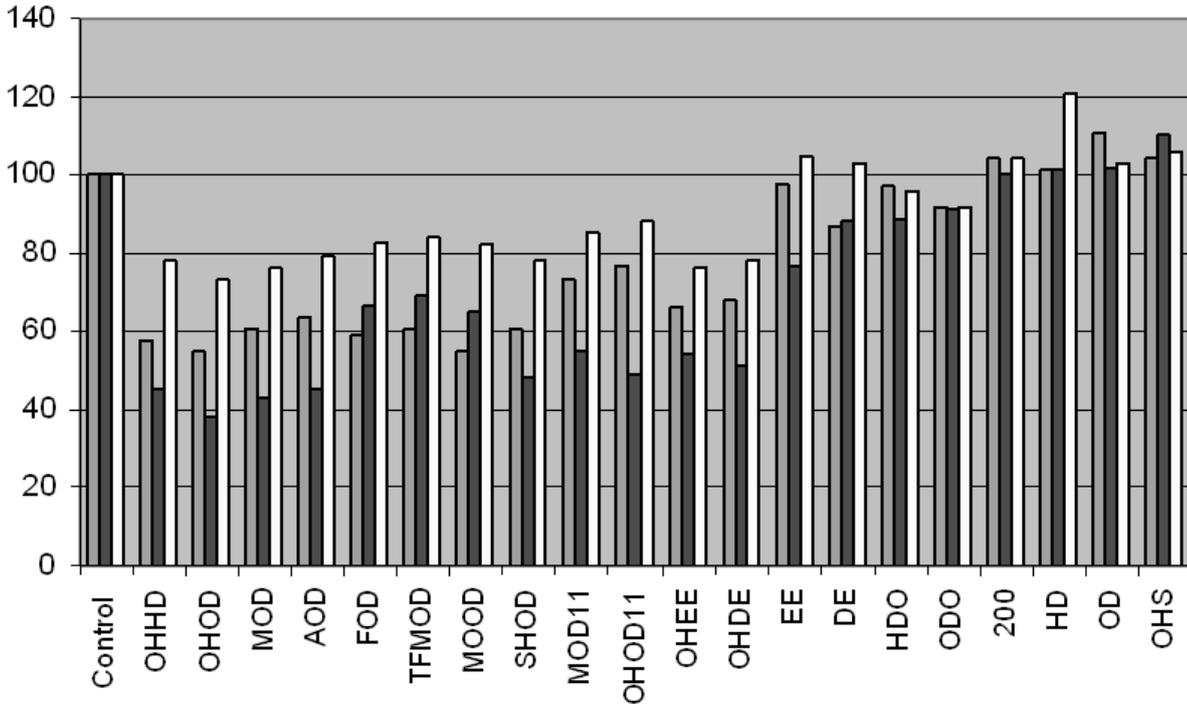
REF. FIGURA 12



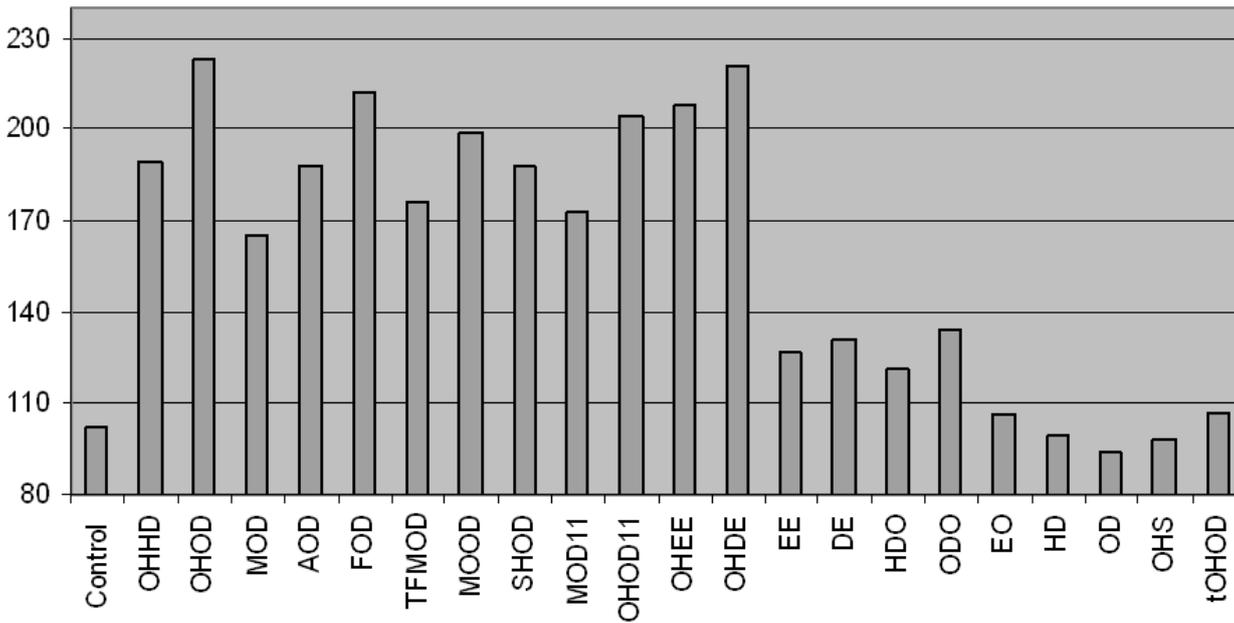
REF. FIGURA 13



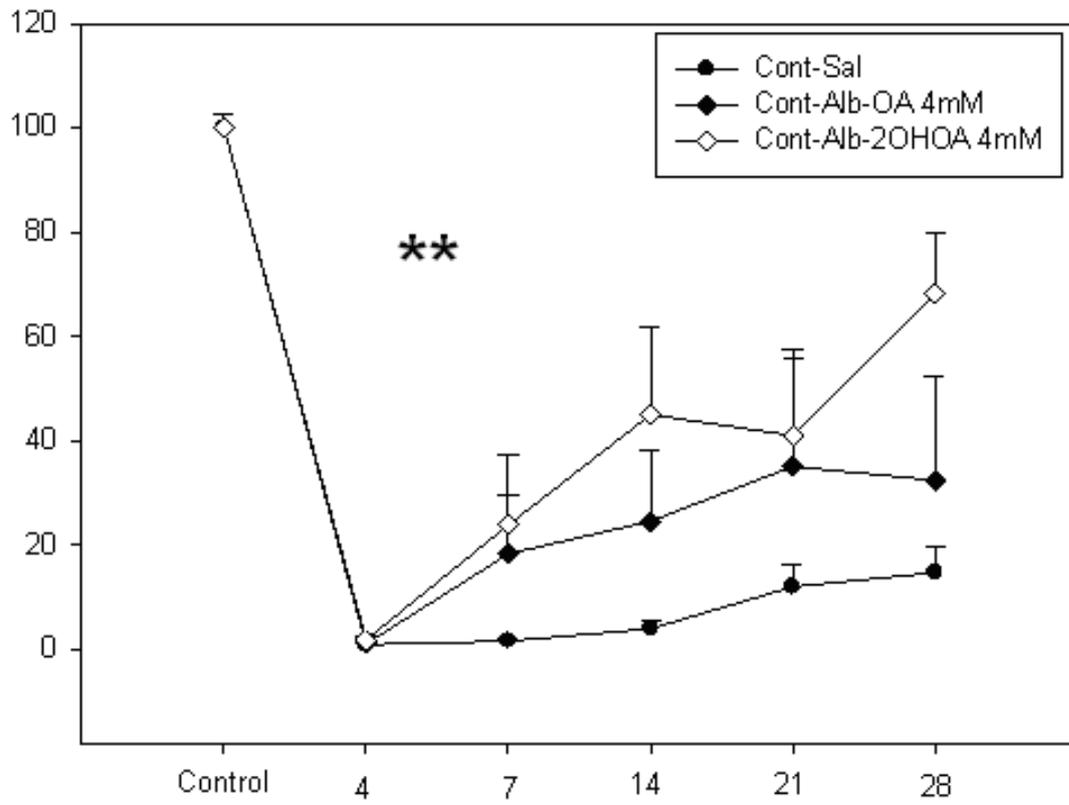
REF. FIGURA 14



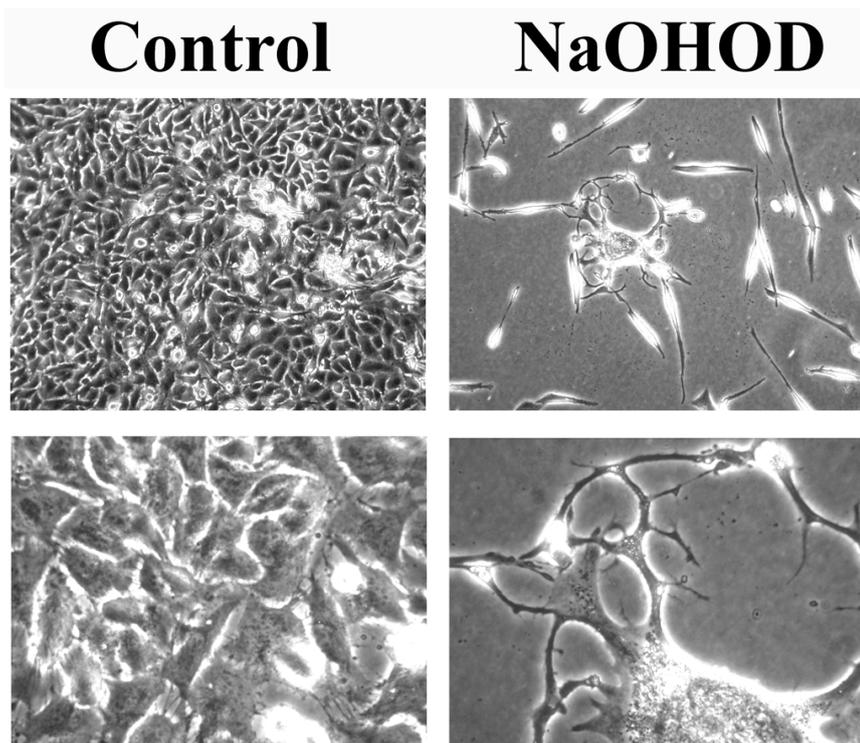
REF. FIGURA 15



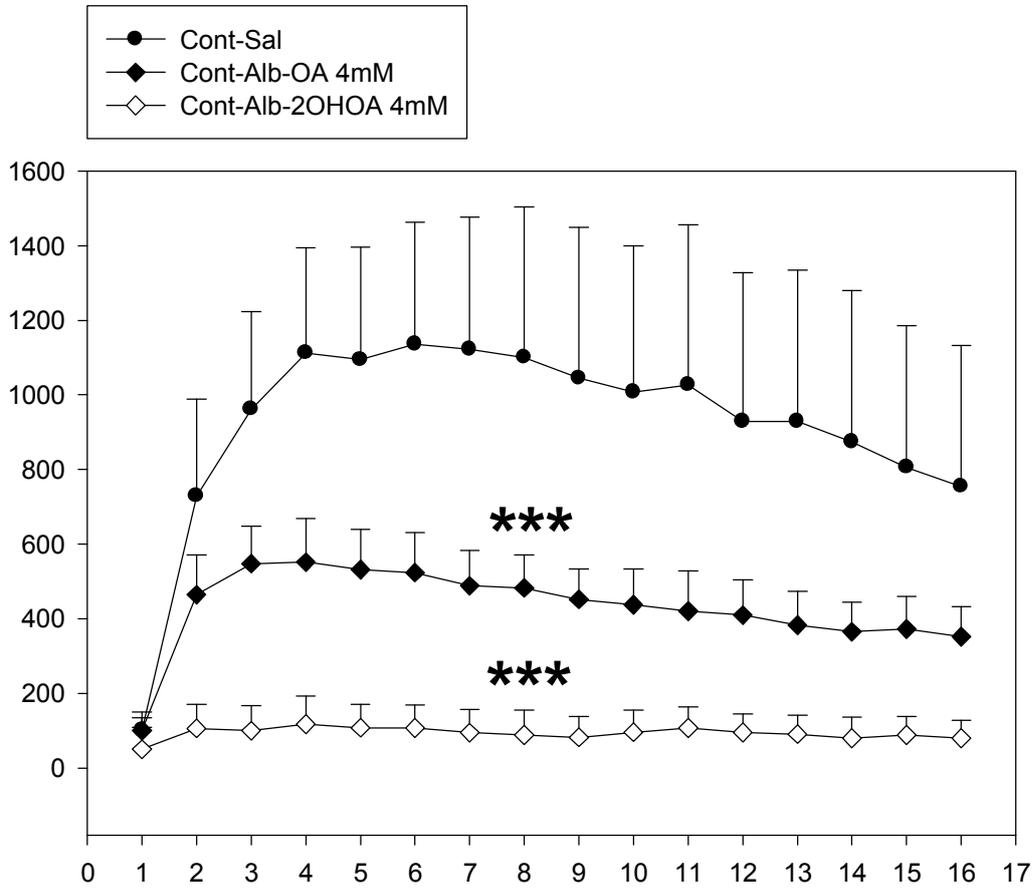
REF. FIGURA 16A



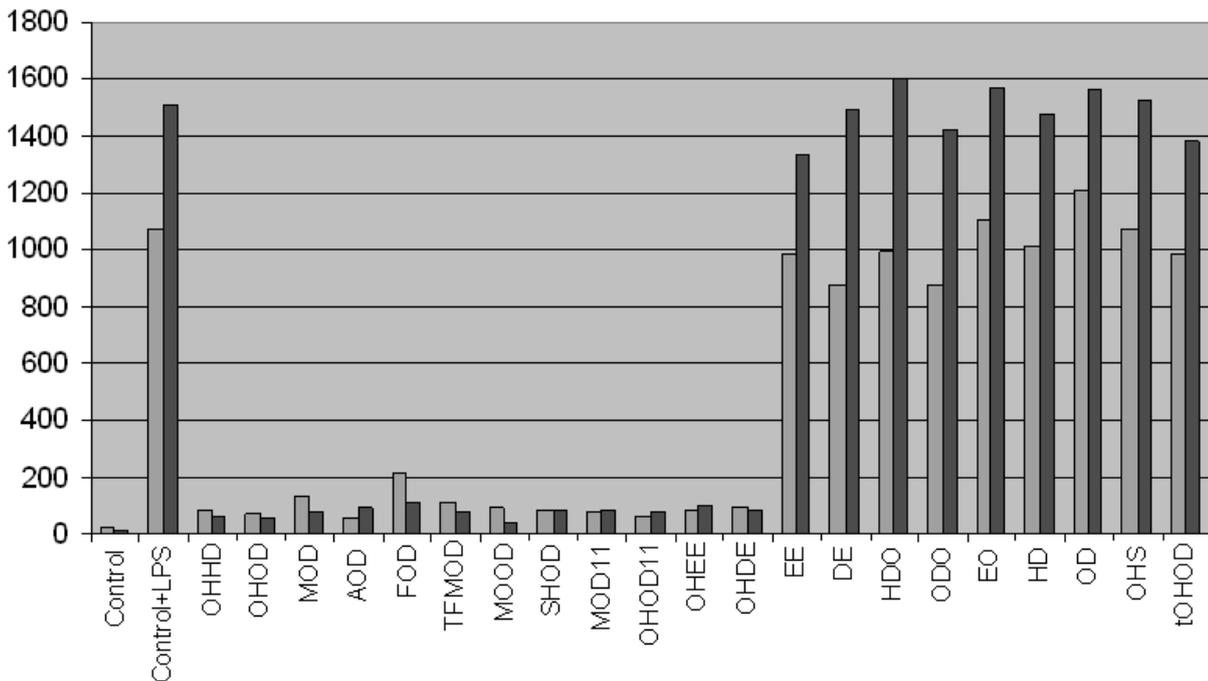
REF. FIGURA 16B



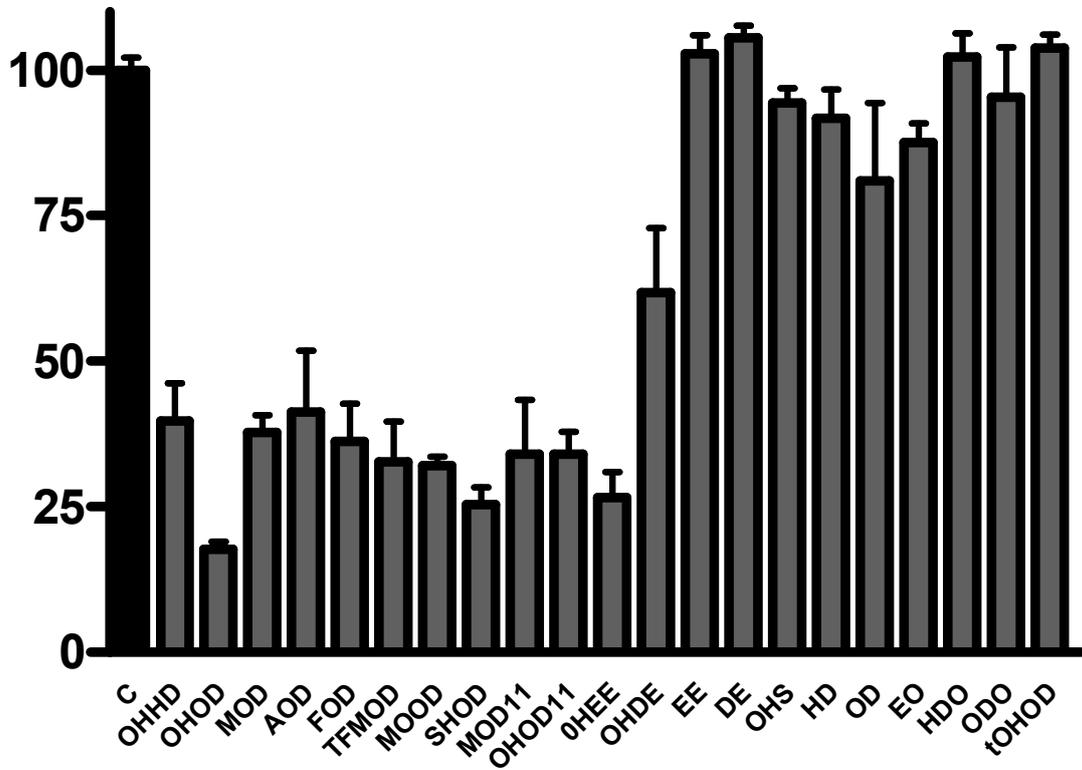
REF. FIGURA 17



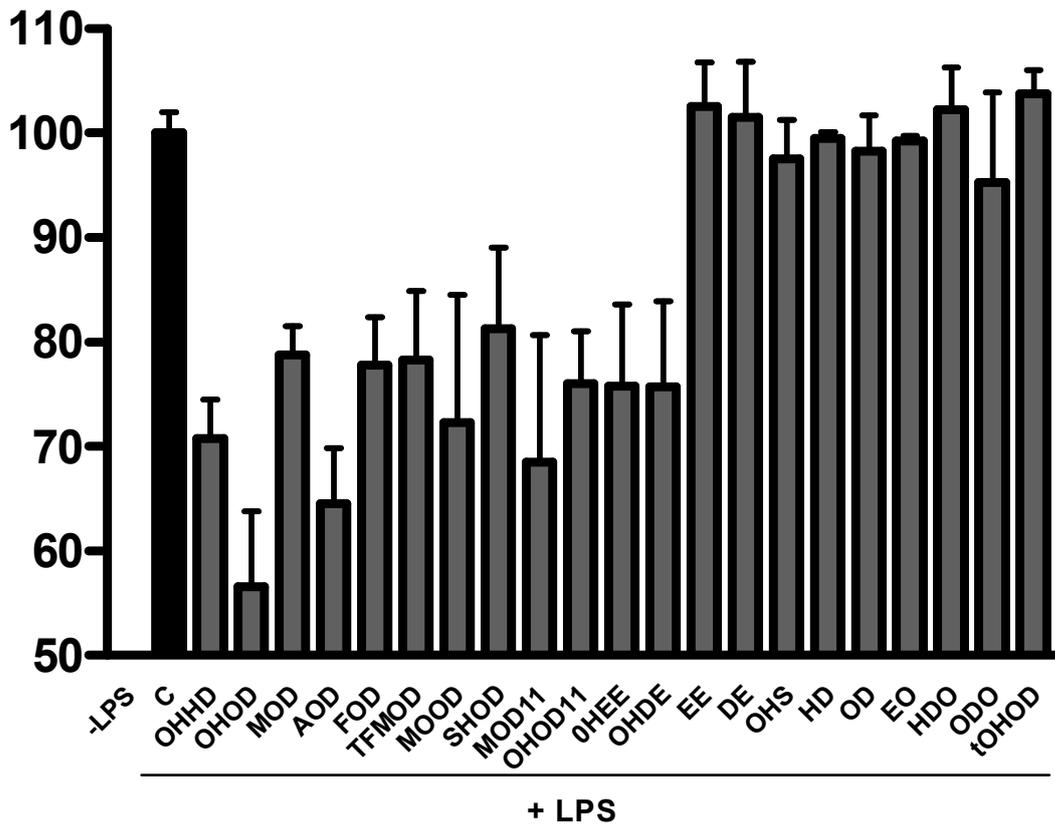
REF. FIGURA 18



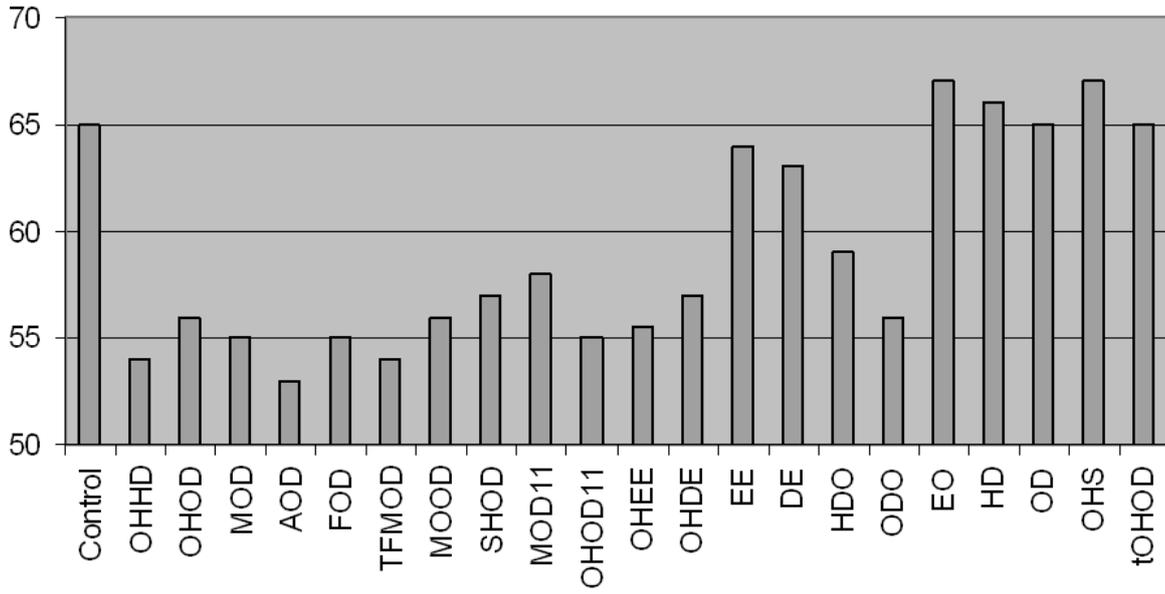
REF. FIGURA 19A



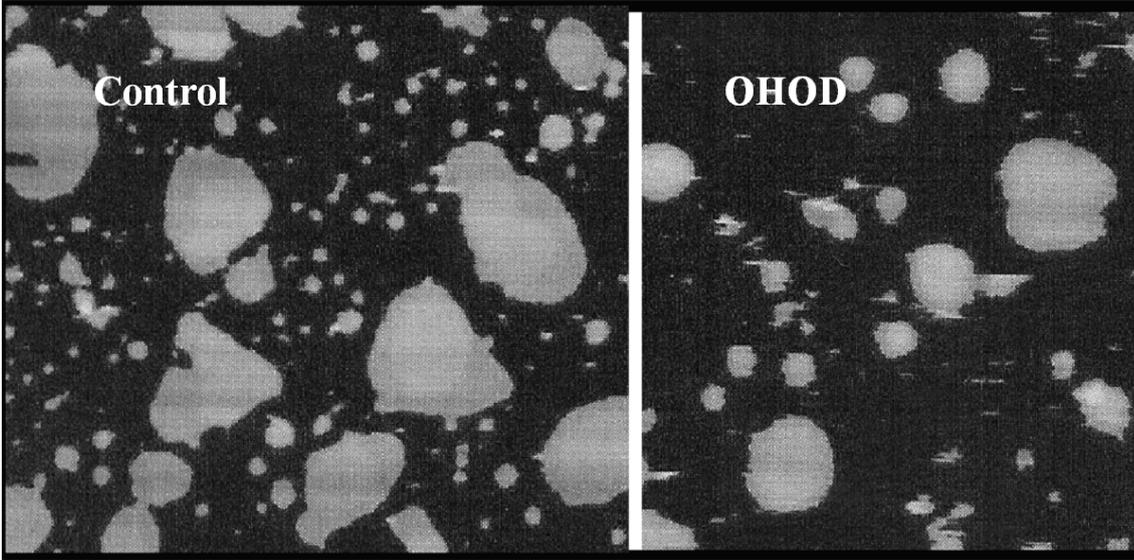
REF. FIGURA 19B



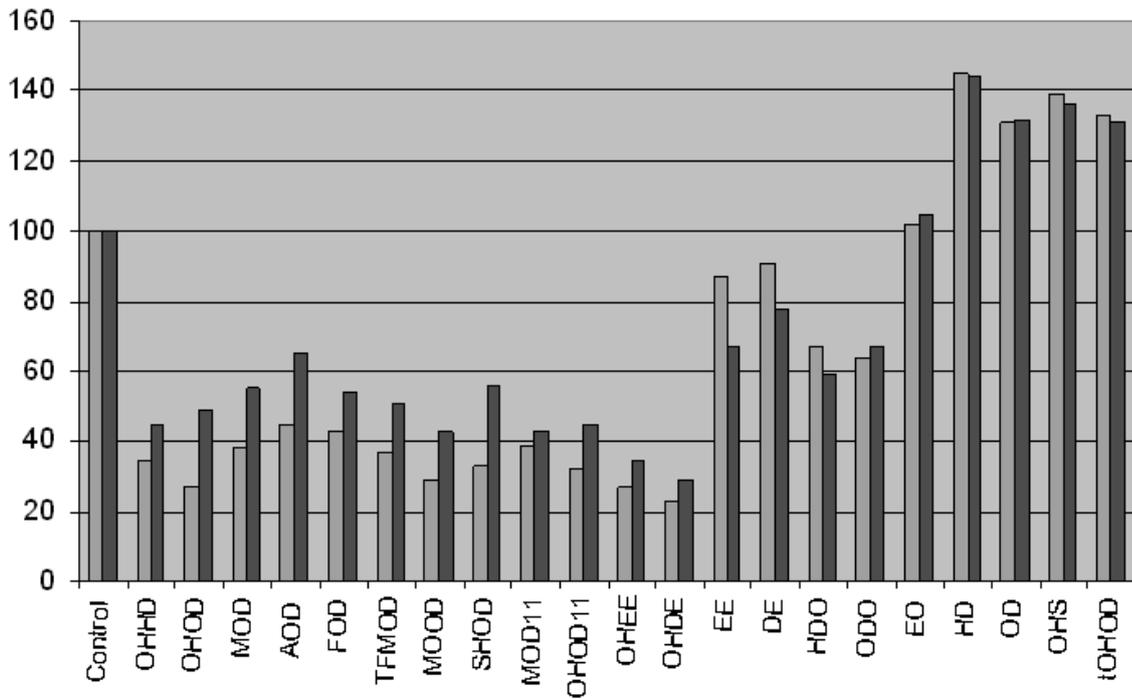
REF. FIGURA 20



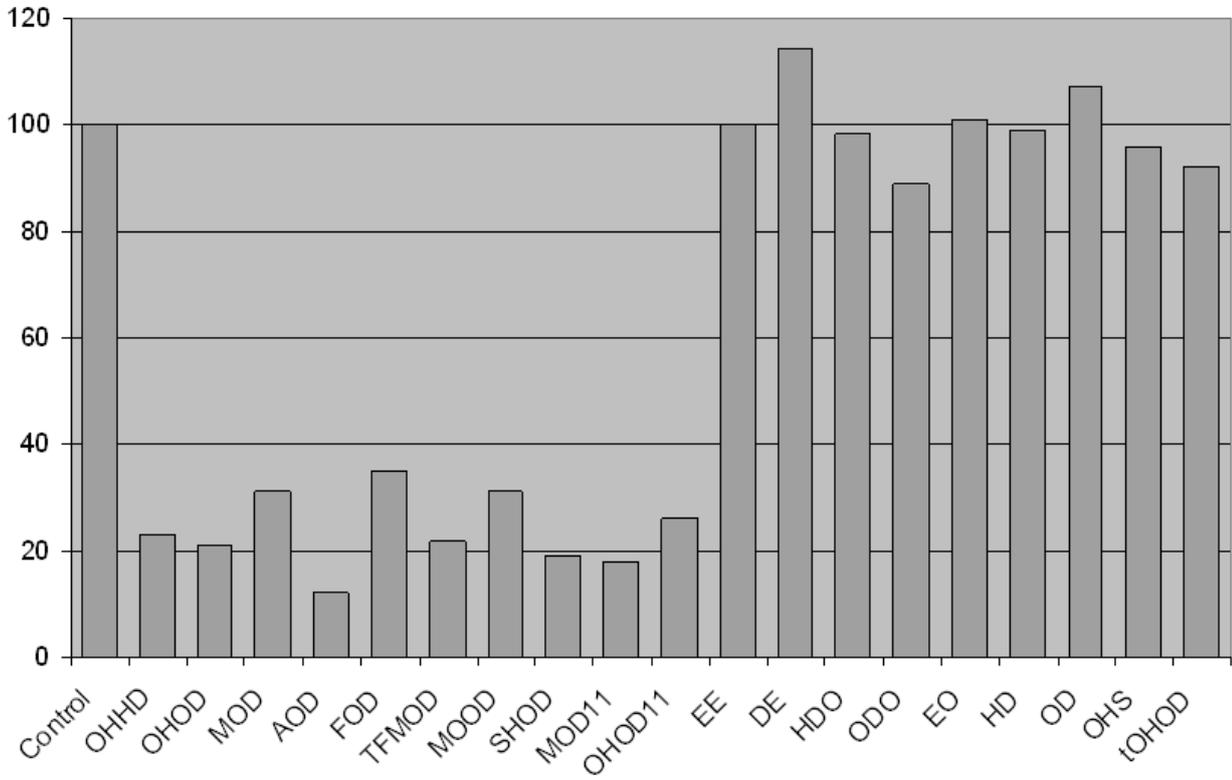
REF. FIGURA 21A



REF. FIGURA 21B



REF. FIGURA 22



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 compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2005041691 A [0009] [0010]
- WO 2003030891 A [0009] [0010]

Literatura no patente citada en la descripción

- KIM et al. *J. Gen Physiol.*, 2000, vol. 115 (3), 287-304 [0074]
- WICHER et al. *J. Neurol. Res.*, 2006, vol. 83 (5), 864-73 [0074]
- LAVADO et al. *J. Neurochem*, 1997, vol. 69 (2), 71-8 [0075]
- MANNING ; SNTHEIMER. *Glia*, 1997, vol. 20 (2), 163-72 [0075]
- 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 [0085]
- BARNES PJ ; KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 1997, vol. 336, 1066-71 [0085]
- 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 [0085]
- CURTO EV ; KWONG C ; HERSMERDORFER H ; GLATT H ; SANTIS C ; VIRADOR V ; HEARING VJ, JR. ; DOOLEY TP. *Biochem Pharmacol*, 1999, vol. 57, 663-672 [0085]
- ESCRIBA PV ; SASTRE M ; GARCIA-SEVILLA JA. Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995, vol. 92, 7595-7599 [0085]
- 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 U S A.*, 1997, vol. 94, 11375-11380 [0085]
- ESCRIBÁ PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.*, 2006, vol. 12, 34-43 [0085]
- ESCRIBÁ PV ; GONZÁLEZ-ROS JM ; GOÑI FM ; KINNUNEN PKJ ; VIGH L ; SÁNCHEZ-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 [0085]
- MARTÍNEZ JO ; 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 [0085]
- NDUATI et al. Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol Res*, 2008, vol. 102, 1227-1234 [0085]
- PATIL CS ; SINGH VP ; KULKARNI SK. Modulatory effect of Sildefanil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacological Reports*, 2006, vol. 58, 373-380 [0085]
- RAID PC ; URANO Y ; KODAMA T ; HAMAKUBO T. Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med*, 2007, vol. 11, 383-392 [0085]
- STENDER S ; DYERBERG J. Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.*, 2004, vol. 48, 61-66 [0085]
- WISE LE ; IREDALE PA ; STOKES RJ ; LITCHMAN AH. Combination of Rimonabant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology*, 2007, vol. 32, 1805-1812 [0085]
- 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 [0085]
- LLADÓ, V. ; CASAS, J. ; MARTINEZ, J. ; GUTIÉRREZ, A. ; BUSQUETS, X. ; ESCRIBÁ, P.V. Molecular basis of the antiproliferative effect of 2-hydroxy-9-cis octadecenoic acid (Minerval) in human leukemia Jurkat cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2007, vol. 149 (S), S84 [0085]