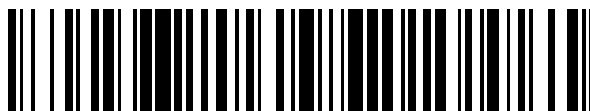


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 869**

51 Int. Cl.:

A61K 31/231 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/201 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2014** **PCT/EP2014/071543**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015** **WO15052237**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2014** **E 14781242 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 3065732**

54 Título: **Compuestos, composiciones y utilizaciones correspondientes, para la prevención y/o el tratamiento de las dislipidemias**

30 Prioridad:

08.10.2013 FR 1302334

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
UNIVERSITÉ DE POITIERS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FERREIRA, THIERRY;
FERRU-CLEMENT, ROMAIN y
VANDEBROUCK, CLARISSE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 674 869 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

Compuestos, composiciones y utilizaciones correspondientes, para la prevención y/o el tratamiento de las dislipidemias

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina. Más particularmente se refiere a la utilización de compuestos para prevenir y/o tratar, en un sujeto, una lipointoxicación, principalmente una lipointoxicación por hipoxia. La lipointoxicación, o dislipidemia, en su acepción más amplia, está asociada típicamente con la presencia en exceso en las membranas biológicas, incluyendo las membranas biológicas de células no adipocitarias, de ácidos grasos, en particular ácidos grasos de cadenas largas saturadas, y/o esteroides. La invención se refiere igualmente a composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y suplementos o complementos alimenticios, que comprenden dichos compuestos, para sus utilizaciones para prevenir y/o tratar una lipointoxicación por hipoxia. Los compuestos y composiciones según la invención se pueden utilizar en particular ventajosamente para prevenir y/o tratar una patología elegida entre las patologías pulmonares, principalmente la mucoviscidosis o las bronconeumopatías obstructivas crónicas.

2. Soluciones de la técnica anterior

La mucoviscidosis es una enfermedad que afecta principalmente a los epitelios glandulares de numerosos órganos. Esta enfermedad genética letal de transmisión autosómica recesiva está asociada con las mutaciones del gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) situado en el cromosoma 7, que provocan una alteración de la proteína CFTR. Ya se han identificado más de 1900 mutaciones diferentes. La mutación más frecuente es la mutación "F508del-CFTR" ($\Delta F508$) que consiste en una delección de tres nucleótidos al nivel del décimo exón del gen, dando lugar a la eliminación de un aminoácido, la fenilalanina, en la posición 508. El disfuncionamiento de la proteína CFTR provoca principalmente un aumento de la viscosidad de la mucosidad y su acumulación en las vías respiratorias y digestivas. Desde un punto de vista clínico, la forma más frecuente asocia trastornos respiratorios, trastornos digestivos y trastornos del crecimiento estatura-ponderal. Los trastornos pulmonares siguen siendo la causa principal de la morbilidad y mortalidad. La mucoviscidosis ocasiona una inflamación crónica de los bronquios con sobreinfección bacteriana, causando una degradación progresiva del estado respiratorio, evolucionando por accesos, que comienzan con síntomas tales como tos, y dando lugar a una insuficiencia respiratoria grave. Están disponibles diversos tratamientos paliativos sintomáticos – tales como fisioterapia, tratamiento con antibióticos y administración de medicamentos mucolíticos. Por el contrario, no existe hoy en día ningún tratamiento curativo, de naturaleza medicamentosa o por un protocolo de terapia génica. Solo el medicamento Ivacaftor®, que comprende una molécula potenciadora de la proteína CFTR en los sujetos con mucoviscidosis portadores de la mutación G551D, está comercializado actualmente. Además, se han realizado varios estudios farmacológicos y/o clínicos referentes a moléculas de interés terapéutico. Estas moléculas candidatas pretenden generalmente corregir, regular, potenciar y/o "chaperonear" la proteína CFTR disfuncional (véase, por ejemplo, Kirby *et al.*, 2014; Pedemonte *et al.*, 2005; Van Goor *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Sampson *et al.*, 2011; Van Goor *et al.*, 2011). Algunas tienen principalmente por vocación corregir el defecto de plegamiento de la proteína F508del-CFTR, que le impide adquirir una conformación tridimensional correcta, progresar a lo largo de la vía de secreción y acceder a su sitio de destino, la membrana plasmática. Sin embargo, la gran mayoría de las moléculas candidatas presentan una falta de eficacia en los estudios *in vivo* y/o los ensayos clínicos.

Las bronco-neumopatías obstructivas crónicas (BNOC o EPOC) agrupan enfermedades sistémicas crónicas de origen respiratorio que afectan a los bronquios. La causa principal de esta enfermedad es el tabaquismo. La BNOC se caracteriza principalmente por una obstrucción lenta y progresiva de las vías respiratorias y de los pulmones, asociada con una distensión permanente de los alvéolos pulmonares. Desde un punto de vista clínico, las BNOC se asocian a trastornos respiratorios, con posibles complicaciones neurológicas, cardiovasculares o musculares. Las BNOC causan principalmente una insuficiencia respiratoria, que puede ser grave. Están disponibles diversos tratamientos paliativos sintomáticos - tales como con antibióticos, con corticosteroides, el uso de un broncodilatador o un soporte de ventilación mecánica, incluso oxigenoterapia de larga duración para las formas más graves.

Trabajos recientes han demostrado que las células epiteliales bronquiales recién extraídas por biopsias de pacientes con mucoviscidosis presentaban una acumulación anormalmente elevada de ácido palmítico (ácido graso saturado, AGS) en el seno de las fosfatidilcolinas (FC) de las membranas celulares (véase Payet *et al.*, 2014). Previamente, se había establecido que la conversión de los AGS celulares endógenos en ácidos grasos insaturados (AGI) es catalizada por enzimas dependientes del oxígeno (Pineau *et al.*, 2008; Pineau *et al.*, 2009). Además, después de haber demostrado en biopsias de pacientes con mucoviscidosis que la hipoxia era inducida o, a la inversa, que la hipoxia ocasionaba la lipointoxicación de las células epiteliales bronquiales, *in vitro* (véase Payet *et al.*, 2014), se llegó a la conclusión de que las células epiteliales bronquiales de pacientes con mucoviscidosis eran lipointoxicadas por una acumulación de ácido palmítico causada por la hipoxia. Además, los autores de la presente invención han podido realizar igualmente el mismo tipo de observaciones, relacionando la hipoxia con la lipointoxicación, en biopsias pseudo-saludables de pacientes fumadores afectados de cáncer de pulmón (tomada en el exterior de la zona cancerosa del pulmón).

En su sentido más amplio, una dislipidemia - o lipointoxicación - se define principalmente como una concentración anormalmente elevada o disminuida de lípidos, típicamente de ácidos grasos libres o no esterificados, esteroides (por ejemplo, colesterol, triglicéridos o fosfolípidos en la sangre). Las dislipidemias se definen por tanto como una desregulación de la homeostasis lipídica.

5 Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) o ácidos grasos libres (AGL) representan un elemento energético importante del organismo. Están constituidos por una mezcla compleja de ácidos grasos que difieren en su número de dobles enlaces y en el número de átomos de carbono que constituyen su cadena hidrocarbonada. De origen endógeno, se forman por biosíntesis en el citoplasma de las células y se utilizan, en forma de acil-CoA, para la síntesis de triglicéridos principalmente en el tejido adiposo y en el hígado.

10 En el plasma, se encuentran principalmente cuatro ácidos grasos que representan el 85% de los AGNE: ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico. La mayoría de los AGNE están asociados a la albúmina. Proviene de los triglicéridos del tejido adiposo hidrolizados durante el ayuno bajo la acción de la lipoproteína lipasa tisular y sanguínea en glicerol y ácidos grasos. Su concentración varía en proporciones importantes según la edad, la toma de alimentos y el ejercicio físico. En general, en el período posprandial, se suprime su liberación.

15 Un esteroide es un lípido que posee un anillo de esteroide cuyo carbono 3 es portador de un grupo hidroxilo. Los esteroides se consideran una subclase de esteroides. El colesterol, uno de los esteroides más comunes y generalizados, es vital para el funcionamiento celular y es un precursor de vitaminas y hormonas esteroides liposolubles.

20 Típicamente, en su sentido más amplio, una dislipidemia, a nivel celular, corresponde a una concentración anormalmente elevada de lípidos en las membranas biológicas, y principalmente a una acumulación de ácidos grasos saturados (AGS) en las membranas biológicas. Igualmente se habla de dislipidemia celular. Dicha acumulación de AGS en las membranas biológicas conduce a la perturbación global de la plasticidad membranar a nivel celular. Estos fenómenos se denominan lipointoxicaciones. Las lipointoxicaciones instaladas son responsables de una perturbación del conjunto de mecanismos membranales (detectable en todas las etapas de la vía de secreción de proteínas). En el hombre, con la excepción de los adipocitos (solo capaces de sintetizar lípidos neutros y almacenarlos), el conjunto de tipos celulares es por tanto susceptible de verse afectado por la lipointoxicación.

Hasta ahora, solo los ácidos grasos insaturados (AGI), en particular el ácido oleico (aceite de oliva), eran conocidos para contrarrestar los efectos nocivos de una intoxicación relacionada con la acumulación de AGS (Cunha *et al.*, 2008; Diakogiannaki *et al.*, 2008; Katsoulis *et al.*, 2009; Pineau *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2006; Deguil *et al.*, 2011). Sin embargo, su uso como alicamento y/o medicamento encuentra dos limitaciones importantes. Por una parte, los AGI presentan propiedades esencialmente preventivas y por tanto tienen un interés limitado en el tratamiento de las lipointoxicaciones instaladas, es decir lipointoxicaciones responsables de una perturbación del conjunto de mecanismos membranales (detectable en todas las etapas de la vía de secreción de proteínas). De hecho, los AGI actúan entrando en competición directa con los AGS, durante la ingesta de alimentos, en la síntesis de los fosfolípidos (FL) membranales. Por otra parte, la toxicidad de los AGI se ha demostrado en células incapaces de transformar ("tamponar") y luego almacenar el exceso de ácidos grasos libres, principalmente AGI, en lípidos neutros, típicamente en triglicéridos (TG) y/o esteroides esterificados. Es el caso por ejemplo de una cepa de levadura en la que, debido a la ausencia de las cuatro enzimas aciltransferasas Lro1p, Dga1p, Are1p y Are2p, se observa una desregulación de la síntesis de los lípidos neutros. Durante una exposición de esta cepa mutante a una fuente de AGI exógenos, la desregulación lipídica se traduce en una proliferación masiva de las membranas intracelulares y posterior muerte de las células, por un proceso independiente de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por la expresión inglesa *Unfolded Protein Response*; véase a continuación) (Kohlwein & Petschnigg, 2007; Petschnigg *et al.*, 2011). Curiosamente, se han podido observar fenómenos idénticos en células de mamíferos (Listenberger *et al.*, 2003). Esto explica por qué los ácidos grasos insaturados llegan a ser tóxicos para la célula en condiciones de lipointoxicación previa de esta última, estado en el que en la célula se sobrepasa la capacidad de almacenamiento de los ácidos grasos insaturados en forma de lípidos neutros (célula lipointoxicada calificada como "metabólicamente inactiva") o, alternativamente, en condiciones normales, en células que presentan una capacidad muy baja de síntesis de TG, tales como las células pancreáticas no beta (Cnop M. *et al.*, 2001). En el hombre, con la excepción de los adipocitos (solo capaces de sintetizar lípidos neutros y almacenarlos), el conjunto de tipos celulares es también susceptible de verse afectado por la lipointoxicación. Se sabe en particular que las perturbaciones asociadas a la acumulación de los AGS conduce a la apoptosis de las células β -pancreáticas responsables de la síntesis de la insulina (Butler *et al.*, 2003) o la de los hepatocitos (Egnatchik *et al.*, 2014).

55 Como se mencionó anteriormente, ninguna estrategia terapéutica actual tiene como objetivo restaurar, en un principio, la funcionalidad de células y órganos lipointoxicados y, por tanto, no puede intervenir en las etapas precoces en la cascada de efectos perjudiciales encontrados en patologías pulmonares que ocasionan principalmente una insuficiencia respiratoria particular, típicamente con antelación a cada una de las etapas objetivo de los tratamientos existentes. Además, los trabajos de los inventores indican que no tener en cuenta el contexto de lipointoxicación, en el marco principalmente de las patologías pulmonares, y de la mucoviscidosis en particular, podría ser responsable de un obstáculo tecnológico y explicar la ausencia de tratamiento curativo, hasta el momento.

Los inventores describen ahora moléculas o compuestos, y composiciones que comprenden dichas moléculas o compuestos, que permiten prevenir la aparición de una lipointoxicación en el seno de las membranas biológicas, típicamente la acumulación celular de ácidos grasos, en particular de ácidos grasos saturados, o tratar una lipointoxicación instalada actuando sobre el fenómeno comúnmente alterado en el conjunto de los tejidos lipointoxicados: la plasticidad membranal.

3. Objetivos de la invención

La presente invención tiene como objetivo paliar los inconvenientes de la técnica anterior, expuestos principalmente antes.

En particular, la invención tiene por objetivo prevenir y/o tratar en un sujeto una lipointoxicación por hipoxia asociada a la presencia en exceso en las membranas biológicas de células no adipocitarias, de ácidos grasos saturados y/o esteroides, estando asociada dicha lipointoxicación por hipoxia en dicho sujeto a una patología pulmonar. El objetivo de la invención, es por tanto prevenir y/o tratar en un sujeto una patología pulmonar, particularmente una patología pulmonar que ocasiona una insuficiencia respiratoria, más particularmente una patología pulmonar que es la mucoviscidosis o una broncopneumopatía obstructiva crónica. La invención tiene así en particular como objetivo prevenir y/o tratar las bronconeumopatías obstructivas crónicas. La invención permite limitar, o incluso prevenir, los disfuncionamientos o la apoptosis de células no adipocitarias lipointoxicadas por hipoxia, asociados principalmente a la disminución o supresión de la fluidez de sus membranas plasmáticas y/o de la membrana de sus orgánulos. El objetivo de la invención, según al menos un modo de realización, es proporcionar un compuesto capaz de prevenir y/o tratar en un sujeto una lipointoxicación por hipoxia, tal como se ha definido anteriormente en el apartado 2, siendo no tóxico para las células incapaces de sintetizar lípidos neutros, típicamente triglicéridos y/o esteroides esterificados. La invención tiene principalmente como objetivo proporcionar un compuesto capaz de prevenir y/o tratar en un sujeto dicha lipointoxicación por hipoxia, siendo alternativo, o incluso superior al ácido oleico en sus propiedades, no siendo además tóxico. La invención tiene por tanto en particular como objetivo proporcionar un compuesto capaz de prevenir y/o tratar en un sujeto esta lipointoxicación por hipoxia, no siendo además tóxico para las células epiteliales bronquiales.

4. Sumario de la invención

Estos objetivos, así como otros que se harán más evidentes a continuación, se consiguen con ayuda de los compuestos, composiciones y utilizaciones correspondientes, según la presente invención.

La invención se refiere a una nueva clase de moléculas destinadas a la prevención y/o al tratamiento de patologías asociadas a una lipointoxicación por ácidos grasos, típicamente ácidos grasos de cadena larga saturada y/o *trans*. Por ácidos grasos de cadenas largas se entiende típicamente ácidos grasos cuya cadena carbonada comprende al menos 14 átomos de carbono, típicamente entre 14 y 24 átomos de carbono, por ejemplo al menos 16 o al menos 18 átomos de carbono, típicamente entre 14 y 22 átomos de carbono o entre 14 y 18 átomos de carbono.

La lipointoxicación se puede manifestar por una inversión de la relación AGS/ácidos grasos insaturados (AGI) en los fosfolípidos presentes en el seno de las membranas biológicas, llegando a ser los AGS mayoritarios, incluso sustituyendo completamente a los AGI. Estas moléculas se pueden destinar a la prevención y/o al tratamiento de una dislipidemia, un síndrome metabólico, un síndrome o una anomalía característica del síndrome metabólico, preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de la diabetes tipo 2.

Las moléculas de la invención se pueden destinar a la prevención o al tratamiento de una lipointoxicación de origen endógeno (o lipointoxicación "endógena"), en particular una lipointoxicación por hipoxia (o lipointoxicación "hipóxica"). Por "hipoxia" se entiende una inadecuación entre las necesidades tisulares y los aportes de oxígeno, que ocasiona un estado de oxigenación insuficiente de ciertas células, ciertos tejidos y/u órganos. En estado de normoxia, la proporción de O₂ y N₂ es típicamente del 95% y 5%. Por tanto, las moléculas de la invención están destinadas a la prevención o al tratamiento de una patología pulmonar, particularmente una patología pulmonar asociada a una insuficiencia respiratoria, más particularmente a una patología pulmonar asociada a una insuficiencia respiratoria seleccionada entre la mucoviscidosis o las BNOC.

De hecho, se pueden distinguir lipointoxicaciones de origen exógeno (o lipointoxicaciones "exógenas") y lipointoxicaciones de origen endógeno (o lipointoxicaciones "endógenas"). Las lipointoxicaciones exógenas son inducidas por una sobreexposición de las células a una fuente medioambiental de AGS. Las lipointoxicaciones endógenas son inducidas, a su vez, por una desregulación del equilibrio endógeno entre los AGI y los AGS. Estas lipointoxicaciones aparecen principalmente cuando una célula ya no puede controlar, o regular, su contenido de ácidos grasos, de manera espacial o temporal, en función de las necesidades de equilibrio entre los AGS y los AGI, y las tensiones de plasticidad membranal específicas de un compartimento endomembranal considerado. Con ayuda de un modelo celular de levadura cultivado en condiciones que imitan la hipoxia, los inventores han demostrado que las levaduras acumulan AGS (por ejemplo, debido a la no conversión de los AGS endógenos en AGI) y que la lipointoxicación inducida provoca un cierto número de efectos perjudiciales, tales como un estrés del retículo

endoplásmico, un desencadenamiento de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), un defecto de vesiculación y un defecto de tráfico vesicular en las fases distales de la vía de secreción de proteínas.

Los inventores partieron de la observación de que los cuadros clínicos de pacientes afectados de mucoviscidosis o BNOC compartían cierto número de similitudes. Entre estos puntos comunes figuran: (1) una exacerbación de la inflamación en los tejidos pulmonares, (2) una congestión de las vías respiratorias asociada a la alteración de las propiedades reológicas de la mucosidad, (3) una fuerte predisposición al desencadenamiento de la apoptosis y (4) una hipertensión de los bronquios. Se asociaron a estos diferentes puntos la presencia de una lipointoxicación a los AGS y, en relación con la bibliografía, se propusieron que esta característica podría constituir el elemento clave a partir del cual derivaría el conjunto de síntomas. Con el fin de confirmar esta hipótesis, y con el fin de identificar una posible solución terapéutica, los inventores realizaron cierto número de investigaciones experimentales.

En un primer momento, la lipointoxicación de tejidos bronquiales recientemente disociados, principalmente por el ácido palmítico, se puso de manifiesto, por análisis del contenido de ácidos grasos de los fosfolípidos purificados, a partir de biopsias bronquiales sanas u obtenidas de pacientes afectados de mucoviscidosis o de BNOC. Además, se propuso que este estado estaba correlacionado con las condiciones de insuficiencia respiratoria, y con la hipoxia, basándose en el modo de acción de las desaturasas intracelulares, enzimas implicadas en la conversión de los AGS endógenos en AGI y dependientes del oxígeno.

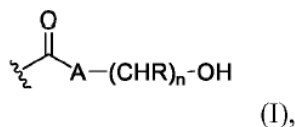
En un segundo momento, estas conclusiones se validaron con ayuda de un modelo *in vitro* que reconstituye artificialmente las lipointoxicaciones observadas en las biopsias de pacientes. Este modelo permitió validar la implicación de la insuficiencia respiratoria y, con mayor motivo, de la hipoxia en la inducción de formas de lipointoxicaciones por los AGS en los epitelios bronquiales.

En un tercer momento, se observó que la lipointoxicación de las células epiteliales bronquiales por el ácido palmítico desencadena la vía UPR y finalmente la apoptosis. Los inventores demostraron igualmente que los compuestos y composiciones según la presente invención inhiben significativamente el desencadenamiento de la apoptosis, y que estos compuestos son en consecuencia útiles para prevenir y/o tratar las lipointoxicaciones, principalmente una lipointoxicación por hipoxia. Por esta razón, estos compuestos y composiciones según la invención se pueden usar en particular ventajosamente para prevenir y/o tratar una patología seleccionada entre patologías pulmonares, principalmente la mucoviscidosis o las bronconeumopatías obstructivas crónicas.

Como anexo, los inventores demostraron que los compuestos y composiciones de la presente invención ejercen un efecto sobre los bronquios de pacientes afectados de mucoviscidosis o BNOC. Por esta razón, los compuestos y composiciones según la invención pueden en particular ser utilizados ventajosamente para prevenir y/o tratar la hipertensión bronquial asociada a patologías pulmonares, principalmente la mucoviscidosis o bronconeumopatías obstructivas crónicas.

Una ventaja considerable que presentan las moléculas (o compuestos) de la invención, con relación a los AGI, en particular al ácido oleico, utilizados en la técnica anterior para compensar un exceso de AGS, es que contrariamente a estos últimos, no causan ninguna toxicidad celular, especialmente ninguna toxicidad sobre las células incapaces de sintetizar lípidos neutros, típicamente células no adipocitarias, por ejemplo, las células pancreáticas y las células epiteliales bronquiales.

Las moléculas de la invención presentan otra ventaja importante que, a diferencia de los AGI usados de manera preventiva en la técnica anterior, se pueden usar igualmente de manera terapéutica debido a su aptitud para restablecer la funcionalidad celular, por ejemplo, actuando sobre la plasticidad membranal. Se pueden por tanto utilizar ventajosamente para tratar una lipointoxicación instalada, es decir una lipointoxicación responsable de un disfuncionamiento celular detectable, típicamente una alteración de la capacidad o incluso una incapacidad de la célula para ejercer sus funciones de vesiculación membranal y de tráfico vesicular, mecanismos fundamentales de comunicación intracelular entre compartimentos e indispensables para la vida de las células. La invención describe así un compuesto que comprende una cabeza polar, que comprende al menos un residuo de hidroxilo, sobre el que está injertado un único ácido graso insaturado que comprende entre 16 y 24, por ejemplo entre 16 y 22 o entre 16 y 20, átomos de carbono y que tienen de 1 a 6, por ejemplo 3, insaturaciones en configuración *cis* para uso en prevenir y/o tratar, en un sujeto, una lipointoxicación por hipoxia, estando asociada dicha lipointoxicación por hipoxia, en dicho sujeto, a una patología pulmonar. La dislipidemia – o lipointoxicación - afecta típicamente a las membranas biológicas, incluidas las membranas biológicas de las células no adipocitarias. En la presente solicitud, el término “dislipidemia” en su sentido más amplio y el término “lipointoxicación” se usan indistintamente. La dislipidemia - o lipointoxicación - se asocia generalmente a la presencia en exceso en dichas membranas biológicas de ácidos grasos y/o esteroides. Los ácidos grasos son en particular ácidos grasos de cadenas largas saturadas. La cantidad de AGS y/o esteroides se considera en particular excesiva cuando, por ejemplo, al alterar la plasticidad membranal provoca un disfuncionamiento celular. La invención describe un compuesto cuya cabeza polar es de fórmula (I):



en la que:

- A es un átomo de nitrógeno u oxígeno, preferiblemente un átomo de oxígeno,
- n es 2 o 3, preferiblemente n es 2, y
- R es cualquier grupo químico,

para uso en prevenir y/o tratar una lipointoxicación en un sujeto, típicamente una lipointoxicación tal como se ha definido anteriormente. Dichos compuestos se pueden seleccionar entre 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol, 1-oleoil-sn-glicerol-3-fosfato, 2-araquidonoilglicerol, monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, N,N-dietanololeamida, monooleato de propilenglicol, 1-oleoil-glicerol, 2-oleoil-glicerol, monoéster del ácido oleico con triglicerol, éster (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metílico del ácido (Z)-9-octadecenoico, monooleato de dietilenglicol y sus mezclas. Los compuestos según la invención se seleccionan entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, N,N-dietanololeamida y sus mezclas; alternativamente N,N-dietanololeamida; alternativamente monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y sus mezclas.

La invención se refiere por tanto a un compuesto tal como se describe en el presente texto para uso en prevenir y/o tratar en un sujeto una patología pulmonar, particularmente una patología pulmonar que provoca una insuficiencia respiratoria, más particularmente una patología pulmonar que es la mucoviscidosis o una bronconeumopatía obstructiva crónica.

La invención describe además una composición, que se presenta en forma de una composición farmacéutica, un alicamento o un suplemento alimenticio, que comprende al menos un compuesto según la invención. La invención describe igualmente una composición farmacéutica que comprende, además de dicho al menos un compuesto según la invención, al menos otro compuesto (diferente de los compuestos según la invención) activo en el plano terapéutico (y reconocido como tal por el experto en la técnica).

5. Descripción detallada

Los inventores han demostrado que los AGS que provienen de una fuente exógena (alimentación) o endógena (hipoxia o alteración, por mutación, de etapas de desaturación de los ácidos grasos) se acumulan en el seno de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares, perturbando por tanto numerosos procesos, alterando la funcionalidad de los orgánulos intracelulares que intervienen en la vía de secreción de las proteínas (véase la Figura 1).

Para realizar esta demostración, los inventores desarrollaron un modelo unicelular simple (cepa *hem1Δ* elaborada a partir de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*) que reproducía el conjunto de impactos de los AGS y del colesterol observados en células de mamífero, en particular el conjunto de anomalías implicadas en el desarrollo del síndrome metabólico (Pineau *et al.*, 2008 y Pineau *et al.*, 2009).

En un medio YPG (es decir, medio que no contiene ni ergosterol (Erg) ni ácido oleico (Ole)), la cepa *hem1Δ* acumula ácidos grasos saturados (principalmente ácido palmítico, C16:0) en sus fosfolípidos, en particular en la fosfatidilcolina (FC). Cabe señalar que el ergosterol es el esteroide presente mayoritariamente en las levaduras y constituye, por tanto, en las levaduras, el equivalente al colesterol para el hombre.

La cepa QM (Petschingg *et al.*, 2009), en la que han sido deletados los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis de triglicéridos y ésteres de esteroide, es por sí misma incapaz de transformar un aporte exógeno de ácidos grasos libres, tipo ácido oleico C18:1, en lípidos neutros, de manera que este aporte causa un estrés perjudicial debido a la perturbación del equilibrio de la plasticidad membranal que genera. El uso de la cepa QM ha permitido en particular a los inventores realizar ensayos de toxicidad que han permitido demostrar claramente la toxicidad del ácido oleico en tales circunstancias (véase la Figura 4).

Más precisamente, los inventores observaron en las cepas *hem1Δ* los efectos negativos de la acumulación de fosfolípidos que llevan cadenas saturadas (FL saturados) en las membranas de orgánulos intracelulares, sobre la formación de vesículas secretoras. Esta lipointoxicación (endógena pues el sistema celular de las cepas *hem1Δ* no sintetiza más que los AGS) perturba el ambiente lipídico de la membrana del retículo endoplásmico (RE), altera el proceso de plegamiento ("misfolding") de las proteínas y desencadena una respuesta compleja en dicho RE, respuesta conocida con el nombre "Unfolded Protein Response" (UPR). Una saturación de este sistema de protección causa la muerte celular por apoptosis. Paralelamente, los inventores pudieron observar perturbaciones en la vesiculación del aparato de Golgi, así como una alteración del tráfico de las proteínas de referencia (por ejemplo, Fur4p) entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática. Concretamente, los inventores observaron una

alteración, debida a la lipointoxicación, del conjunto de la vía de secreción. En otras palabras, la cepa *hem1Δ* de levadura les permitió confirmar tanto los impactos de los AGS sobre el estrés del RE como igualmente sobre el tráfico de las proteínas hacia la membrana plasmática.

El retículo endoplásmico (RE) está implicado en varios procesos celulares fundamentales, incluyendo la síntesis lipídica, la regulación de la homeostasis cálcica y la síntesis de las proteínas destinadas a los diferentes orgánulos y a la superficie celular (por ejemplo, las proteínas membranales tales como los canales iónicos y los transportadores). El RE es igualmente el sitio donde las proteínas membranales o secretadas se ensamblan y se pliegan. En consecuencia, la UPR desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad del RE, permitiendo a este orgánulo gestionar la acumulación de proteínas mal plegadas (Kincaid & Cooper, 2007; Zhang & Kaufman, 2006). Téngase en cuenta que la toxicidad de los AGS está asociada, en las células β -pancreáticas (responsables de la síntesis de la insulina en los mamíferos) a la inducción de la UPR (Cunha *et al.*, 2008; Diakogiannaki & Morgan, 2008; Laybutt *et al.*, 2007). Alkhateeb *et al.*, (2007) y Kato *et al.*, (2008) observaron además que la acumulación de los AGS altera el direccionamiento del receptor a la insulina y del transportador de glucosa Glut4 a la superficie de las células musculares.

Schneider *et al.*, (1999) observaron que las membranas del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi están constituidas mayoritariamente por fosfolípidos (FL) insaturados, mientras que la proporción de FL saturados aumenta gradualmente en los compartimentos más distales en la vía de secreción para alcanzar su máximo en la membrana plasmática. Las proporciones importantes de FL insaturados se traducen en una fluidez membranar elevada, un parámetro crucial para el reclutamiento de ciertas proteínas esenciales en la formación de vesículas. Un ejemplo típico lo proporcionan las proteínas de la familia Arf-GAP1, siendo una de entre ellas Gcs1p en la levadura. Se ha demostrado que Gcs1p es un mediador del transporte vesicular tanto entre el aparato de Golgi y el RE como entre el RE y la membrana plasmática (Robinson *et al.*, 2006). Curiosamente, la delección del gen GCS1 provoca una fragmentación del aparato de Golgi y una perturbación del tráfico vesicular pos-Golgiano (Poon *et al.*, 2001), fenómenos que los inventores han podido observar ellos mismo en el modelo de levadura *hem1Δ*, es decir, en condiciones de acumulación de AGS (véase Payet *et al.*, 2013).

Las proteínas de la familia Arf-GAP1 responden a la curvatura membranar siendo adsorbidas en la superficie membranar por medio de un resto específico denominado ArfGAP1 *Lipid Packing Sensor* (ALPS; (Bigay *et al.*, 2005)). Concretamente, el resto ALPS no reconoce la curvatura membranar *per se*, es decir, una geometría curva, pero reconoce un pequeño apilamiento de las cabezas polares de los fosfolípidos ("Loose Lipid Packing") que es una consecuencia de la curvatura membranar (Bigay *et al.*, 2005). Los inventores fueron capaces de demostrar que los elevados niveles de FL saturados en condiciones de lipointoxicación están asociados a un aumento del embalaje de lípidos en las membranas (Deguil *et al.*, 2011) y que este aumento altera el reclutamiento del aparato de Golgi del Gcs1p proveniente del citoplasma (Payet *et al.*, 2013). Más en general, demostraron que la acumulación de ácidos grasos, en particular AGS, en las membranas biológicas provocaba la desregulación funcional de los orgánulos intracelulares, incluyendo el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (RE), y en particular una disminución del índice de vesiculación responsable de una disminución de la translocación de ciertos transportadores y receptores membranales en la superficie celular.

Las lipointoxicaciones celulares provocadas por los inventores dieron como resultado, *in vitro*, una exposición a una fuente exógena de ácidos grasos exclusivamente en forma saturada (lipointoxicación "exógena") o, alternativamente, una incapacidad intrínseca de la célula para producir formas insaturadas de ácidos grasos (lipointoxicación "endógena").

Con ayuda de su modelo de levadura *hem1Δ*, los inventores mostraron que el ácido oleico (Ole), estando metabolizado en los fosfolípidos (FL) (véase la figura 1 - pérdida de FL con AGS a favor de FL con AGI), permite restaurar la plasticidad de las membranas previamente lipointoxicadas por los AGS. Igualmente demostraron con ayuda de la cepa de levadura QM que el efecto beneficioso observado se limitaba a las células que tenían la capacidad de tamponar un exceso de AGI exógenos en forma de lípidos neutros. En las células que no tenían esta capacidad, el excedente de ácido oleico exógeno ocasionaba, finalmente, una proliferación anormal de las membranas intracelulares que, al estresarse las células, desencadenarán su apoptosis.

Los inventores usaron su modelo de levadura *hem1Δ* y la cepa QM para cribar las moléculas de interés susceptibles de impedir o limitar este fenómeno, idealmente contrarrestar el efecto tóxico de los ácidos grasos saturados presentes en exceso y/o mal metabolizados (es decir, esterificados) y corregir el conjunto de fenómenos perturbados. También descubrieron moléculas capaces, en particular, de restaurar una funcionalidad celular (restaurando, por ejemplo, la fluidez membranar) comparable a la encontrada en condiciones no patológicas.

A continuación, estos mismos inventores analizaron y demostraron la eficacia de las moléculas preseleccionadas por ellos, es decir, su capacidad para restaurar una funcionalidad celular comparable a la encontrada en condiciones no patológicas, incluso en el caso de dislipidemias instaladas, en las células β -pancreáticas de mamíferos, en particular en las células β -pancreáticas de rata (linaje BRIN-BD11).

El sujeto citado por la invención es un animal, típicamente un mamífero, por ejemplo, un mamífero seleccionado de un ratón, una rata, un cerdo y un ser humano. El sujeto implicado es preferiblemente un ser humano.

En el contexto de la presente descripción, la dislipidemia - o lipointoxicación - cuya prevención y/o tratamiento se busca afecta típicamente a las membranas biológicas, en particular a las membranas biológicas de células no adipocitarias. En general, se asocia a la presencia en exceso en dichas membranas biológicas de ácidos grasos, más particularmente ácidos grasos de cadenas largas saturadas y/o *trans* y/o esteroides. La dislipidemia - o lipointoxicación - es típicamente responsable de la intoxicación de células no adipocitarias dando origen al disfuncionamiento o la apoptosis de dichas células por la disminución o incluso supresión de la fluidez de su membrana plasmática y/o la membrana de sus orgánulos. Según la invención, la lipointoxicación está asociada a la presencia en el sujeto de una patología pulmonar, particularmente de una patología pulmonar que ocasiona una insuficiencia respiratoria, más particularmente una patología pulmonar que ocasiona una insuficiencia respiratoria como la mucoviscidosis o una BNO.

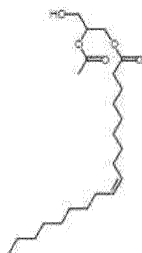
Por tanto, como se desprende de la presente descripción, la expresión "presencia en exceso" de ácidos grasos, en particular AGS, y/o esteroides, es sinónima de "lipointoxicación" y designa la presencia, en una célula no adipocitaria, en particular de ácidos grasos saturados y/o *trans* y/o esteroides en una cantidad suficiente para perturbar la vía de secreción descrita anteriormente y por tanto alterar el funcionamiento celular (típicamente la vía de secreción de las proteínas y en consecuencia la función de dichas proteínas), o incluso, a un nivel superior, alterar en consecuencia el funcionamiento del órgano correspondiente.

A nivel celular, una lipointoxicación se diagnostica típicamente por la detección de una modificación del contenido de ácidos grasos de los FL de las membranas biológicas (principalmente a nivel de las especies fosfolipídicas de la fosfatidilcolina (FC)) y, en particular, por la disminución de las formas de FL en AGI para beneficio de FL en AGS. Al igual que el modo de funcionamiento descrito en la parte experimental de la presente descripción, dicha firma lipídica se puede demostrar como consecuencia de la extracción de los lípidos celulares totales, de la purificación de sus fosfolípidos y del análisis de estos últimos por espectrometría de masas (Deguil *et al.*, 2011).

Además, esta lipointoxicación celular se puede manifestar por la inducción de la UPR ("*Unfolded Protein Response*"). Tal como lo demuestra la parte experimental, es posible, *in vitro*, detectar y medir esta UPR por el análisis de la expresión de un gen indicador (tal como el gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa cuya actividad enzimática puede ser cuantificada) que contiene en su secuencia promotora uno o más, por ejemplo 4, elementos de respuesta a la UPR ("UPRE") específicos de un gen característicamente inducido durante el desencadenamiento de dicha respuesta, por ejemplo, de un gen seleccionado entre CHOP, BiP, GRP78 y ATF4 (Laybutt *et al.*, 2007). Alternativamente, el desencadenamiento de la UPR en respuesta a una lipointoxicación se puede detectar y medir cuantificando la proporción de formas activas de ciertas proteínas claves en esta cascada de eventos celulares. Este es el caso de la proteína eIF2 α cuya abundancia de la forma activa fosforilada es proporcional al estado de activación de la UPR. Como se explica en la parte experimental, la cantidad de la forma activa fosforilada se puede evaluar por densitometría de las imágenes obtenidas después de la transferencia de Western (Dhayal and Morgan, 2011).

En el contexto de la presente invención, la UPR se puede detectar o medir ventajosamente por detección o medida de la expresión de un gen o de la actividad de una proteína implicada en la "UPR", como se explicó anteriormente.

Ejemplos de compuestos utilizables para prevenir y/o tratar una lipointoxicación se identifican a continuación:



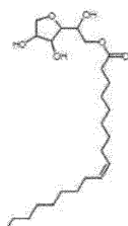
1-oleoil-2-acetil-sn-glicerilo (OAG)



1-oleoil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido 1-oleoil-lisofosfatídico o **LPA**),



2-araquidonoilglicerol (2-AG),



5 monooleato de manida



oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo,



N.N-dietanololeamida,



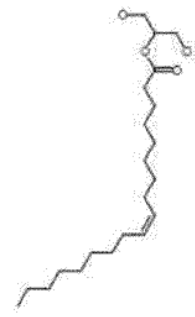
10

monooleato de propilenglicol,

1-oleoilglicerol,



2-oleoilglicerol,

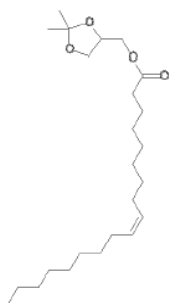


5

monoéster del ácido oleico con triglicerol,



éster (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metílico del ácido (Z)-9-octadecenoico,



10 monooleato de dietilenglicol.



Los compuestos según la invención se seleccionan entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, N,N-dietanololeamida; alternativamente N,N-dietanooleamida; alternativamente, monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y sus mezclas.

5 Un compuesto de interés particularmente preferido para prevenir y/o tratar una lipointoxicación es el monooleato de manida.

10 Los compuestos de interés se usan en el contexto de la invención para prevenir y/o tratar lipointoxicaciones, tales como la lipointoxicación hipóxica, típicamente restaurando la fluidez de las membranas biológicas. Una característica ventajosa de estos compuestos es que, a diferencia de los AGI utilizados en la técnica anterior, no son tóxicos para las células incapaces de sintetizar los lípidos neutros, típicamente triglicéridos y/o esteroides esterificados. Estos compuestos son en particular no tóxicos para las células pancreáticas (células β -pancreáticas y células α -pancreáticas). Igualmente son preferiblemente no tóxicos para las células renales, hepáticas, cardíacas y musculares. Igualmente son preferiblemente no tóxicos para las células epiteliales bronquiales. Además, son con preferencia ventajosamente capaces de restaurar la funcionalidad de una célula lipointoxicada así como, si fuera necesario, la de los órganos implicados, tales como las vías respiratorias, y principalmente los bronquios.

15 Un compuesto de interés típico de la invención presenta ventajosamente las siguientes propiedades:

- restaura el crecimiento de un mutante *hem1Δ* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* lipointoxicado,
- reduce o suprime la UPR ("*Unfolded Protein Response*"),
- no es tóxico para un mutante QM de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y/o
- reduce o suprime la muerte celular por apoptosis de una célula de mamífero lipointoxicada.

20 Los compuestos particulares utilizados en el contexto de la invención son capaces de restaurar el crecimiento de un mutante *hem1Δ* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* lipointoxicado y/o reducir o suprimir la UPR ("*Unfolded Protein Response*"), típicamente la UPR inducida por una lipointoxicación (ya sea ésta última de naturaleza endógena o exógena).

Los compuestos particulares usados en el contexto de la invención no son tóxicos para las levaduras de la cepa QM.

25 Los compuestos particulares usados en el contexto de la invención son capaces de reducir o suprimir la muerte celular por apoptosis de células de mamíferos lipointoxicadas.

30 En un modo de realización preferido de la invención, los compuestos de interés se utilizan para prevenir y/o tratar una patología pulmonar, particularmente una patología pulmonar que ocasiona una insuficiencia respiratoria, más particularmente una patología pulmonar que ocasiona una insuficiencia respiratoria que es la mucoviscidosis o una BNOC.

En un modo de realización preferido de la invención, al menos un compuesto de interés, tal como se describe en la presente memoria, se usa para prevenir y/o tratar la mucoviscidosis o una BNOC. El monooleato de manida es un ejemplo de un compuesto de interés utilizado de una manera preferida para prevenir y/o tratar la mucoviscidosis o una BNOC.

35 Este al menos un compuesto de interés se puede usar, en un modo de realización particular de la invención, en combinación con un compuesto distinto conocido por los expertos en la técnica y utilizado convencionalmente en la prevención y/o el tratamiento de la mucoviscidosis o una BNOC, seleccionándose dicho compuesto distinto preferiblemente entre compuestos mucolíticos, antibióticos y correctores de la proteína CFTR. La invención se refiere además a una composición que se presenta en forma de una composición farmacéutica, un alicamento, un suplemento o un complemento alimenticio, que comprende al menos un compuesto de interés según la invención. La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que comprende al menos dicho compuesto de interés según la invención, al menos otro compuesto (diferente de los compuestos de interés utilizados en el contexto de la invención para prevenir o tratar una lipointoxicación por hipoxia sin inducir toxicidad en las células no adipocitarias) activo terapéuticamente (y reconocido como tal por los expertos en la técnica), en particular un compuesto activo en la prevención o tratamiento de un síntoma o de una anomalía característico de una patología pulmonar, asociada principalmente a una insuficiencia respiratoria.

La invención se refiere igualmente a una composición, tal como se describe en el presente texto, para uso en prevenir y/o tratar una lipointoxicación por hipoxia, típicamente una patología elegida entre las patologías pulmonares, preferiblemente para prevenir y/o tratar la mucoviscidosis o las BNOC.

50 El término "tratamiento" designa el tratamiento curativo, sintomático o preventivo. Los compuestos de la presente invención se pueden usar así en sujetos (como mamíferos, en particular seres humanos) afectados de una enfermedad declarada. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar para retardar o ralentizar la progresión o prevenir una progresión según avance la enfermedad, mejorando de este modo el estado de los sujetos. Los compuestos de la presente invención pueden finalmente administrarse "preventivamente" a los sujetos

no enfermos, pero que normalmente podrían desarrollar la enfermedad o que tienen un riesgo importante de desarrollar la enfermedad.

El o los compuestos de interés o las composiciones según la invención se pueden administrar de diferentes maneras y en diferentes formas.

5 Así, en un modo de realización típico, el o los compuestos de interés se administran al sujeto, juntos o por separado, y el o los compuestos de interés o composiciones según la invención se administran de forma continua o secuencial, una o varias veces al día (administración diaria), una o varias veces por semana (administración semanal), o una o varias veces al mes (administración mensual), durante todo el tiempo del tratamiento, es decir, hasta la mejora de los síntomas de la patología tratada, preferiblemente la desaparición de todos o parte de dichos síntomas.

10 Si es necesario, la dosis diaria se puede administrar por ejemplo en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tomas al día o en sub-dosis múltiples administradas a intervalos apropiados durante el día.

Estos compuestos o composiciones se pueden administrar por ejemplo de manera sistémica, por vía oral, parenteral, por inhalación o por inyección, como por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarterial, etc. Tratándose de un tratamiento a largo plazo, la vía de administración preferida será sublingual, oral, intraperitoneal o transcutánea.

15 Las composiciones se pueden formular en forma de suspensiones inyectables, aceites, supositorios, cápsulas de gelatina, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente por medio de formas galénicas o de dispositivos que aseguren una liberación prolongada y/o retardada. Para las inyecciones, los compuestos se acondicionan generalmente en forma de suspensiones líquidas, que pueden ser inyectadas, por ejemplo, por medio de jeringas o perfusiones.

Las composiciones se pueden formular en forma de suspensiones inyectables, aceites, supositorios, cápsulas de gelatina, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente por medio de formas galénicas o de dispositivos que aseguren una liberación prolongada y/o retardada. Para las inyecciones, los compuestos se acondicionan generalmente en forma de suspensiones líquidas, que pueden ser inyectadas, por ejemplo, por medio de jeringas o perfusiones.

20 Se entiende que el caudal y/o la dosis inyectada pueden ser adaptados por los expertos en la técnica en función del paciente, la patología, el modo de administración, etc. En general, la dosis diaria del compuesto será la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico.

La cantidad de compuesto presente en la composición terapéutica se puede modular de forma que se obtenga una tasa circulante de principio activo necesaria para la obtención del efecto terapéutico deseado para un paciente particular, una composición, un modo de administración y preferiblemente sin toxicidad para el paciente. La cantidad seleccionada dependerá de múltiples factores, en particular de la vía de administración, la duración de la administración, el momento de la administración, la velocidad de eliminación del compuesto, del o los diferentes productos utilizados en combinación con el compuesto, la edad, el peso y el estado físico del paciente, así como su historial médico y otras informaciones conocidas en medicina.

25 Típicamente, los compuestos se administran a dosis que pueden variar entre 1 µg y 2 g por administración, preferiblemente de 0,1 mg a 1 g por administración. Por otra parte, las composiciones según la invención pueden comprender, además, otros agentes o principios activos como se ha explicado anteriormente. Las composiciones según la invención también pueden comprender uno o varios excipientes o vehículos, farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden citar soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc., compatibles con un uso farmacéutico y conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones pueden contener uno o varios agentes o vehículos seleccionados entre dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc.

Las figuras y ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

6. Presentación de las figuras

A continuación, se describen las figuras de los dibujos:

40 **Figura 1: Vía de secreción y plasticidad membranal.**

Después de su síntesis, las proteínas membranales o secretadas ("herramientas" moleculares de las células) deben experimentar etapas de maduración en el interior de las células. Cada una de las etapas de este proceso denominado "vía de secreción" tiene lugar en un compartimento subcelular específico (principalmente el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi). La obtención de proteínas maduras necesita por tanto un transporte intracelular funcional entre los diferentes sistemas endomembranales. Este flujo está influenciado, entre otros, por la plasticidad de las membranas de los compartimentos intracelulares lo que está, a su vez, directamente correlacionado con la naturaleza de los fosfolípidos (FL) que componen las membranas. En particular, se admite que la presencia de los AGS en los FL disminuye la fluidez membranal mientras que los FL que contienen AGI forman membranas más fluidas.

50 El efecto benéfico del ácido oleico (Ole) se observa en las células que tienen la capacidad de tamponar un exceso de AGI exógenos en forma de lípidos neutros (triglicéridos (TG) o esteroides esterificados (EE) acumulados en forma de gotitas lipídicas (GL)). En las células que no tienen esta capacidad, el exceso de ácido oleico exógeno produce al final una proliferación de las membranas intracelulares, la cual provocando un estrés celular va a desencadenar la apoptosis.

Figura 2: Las vías de la UPR en los eucariotas superiores (Pineau & Ferreira, 2010)

Figura 3: El ácido oleico, OAG y LPA restauran el crecimiento de levaduras lipointoxicadas.

Figura 3A - Estructuras del ácido oleico del OAG y del LPA.

Figura 3B - Las levaduras *hem1Δ* se cultivaron en condiciones de acumulación de AGS, como se ha indicado. A continuación, se depositaron en la superficie del medio de agar-agar gotas de 5 μL de OAG, de LPA o de ácido oleico, en las concentraciones indicadas. La restauración del crecimiento de las levaduras *hem1Δ* se comprobó por la formación de colonias, después de 3 días.

Figuras 4: El OAG y el LPA no son tóxicos para las células que no sintetizan triglicéridos

Se depositaron gotitas de 5 μL de OAG, de LPA o de ácido oleico a partir de soluciones madre en las concentraciones indicadas, en la superficie de un medio de agar-agar sobre el cual había sido previamente extendida la cepa QM. Después de tres días se pudieron observar halos de inhibición del crecimiento (ausencia de colonias) en el caso del ácido oleico. Por el contrario, dichos halos no se observaron en presencia de LPA o de OAG.

Figuras 5: El OAG y el LPA reducen la UPR en levaduras lipointoxicadas

Una construcción plasmídica que lleva un gen de fusión, correspondiente a la secuencia codificadora del gen *LacZ* colocada bajo la dependencia de un promotor artificial que contenía 4 elementos UPR (UPRE), se introdujo en una cepa *hem1Δ* de levaduras como se ha descrito en Pineau *et al.*, (2009). Durante una inducción de la UPR, se activó el factor de transcripción Hac1p/XBP1p y se fijó sobre los elementos UPR del gen de fusión, produciendo la transcripción del gen *LacZ*. Como el gen *LacZ* codifica la β-galactosidasa, el nivel de inducción de la UPR se mide por tanto por detección de la actividad enzimática correspondiente. La cepa *hem1Δ* de levaduras se cultivó en un medio líquido que inducía la acumulación de AGS sin otra adición (Ø), o en el mismo medio suplementado con 200 μM de ácido oleico, de OAG o de LPA, como se ha indicado. U.A.: unidades arbitrarias.

Figuras 6: El OAG no restaura la producción de fosfolípidos di-insaturados, contrariamente al ácido oleico y al LPA, en las levaduras lipointoxicadas

Las levaduras *hem1Δ* se cultivaron en condiciones estándares (Control) o en condiciones de acumulación de AGS, sin (Ø) o con adición de ácido oleico, de LPA o de OAG a 100 μM, como se ha indicado.

Figura 6A – Después de 7 horas de incubación se extrajeron los fosfolípidos (FL) y las diferentes especies de fosfatidilcolina (FC), que constituyen los FL mayoritarios se analizaron por espectrometría de masas en modo positivo, según Pineau *et al.*, (2008). La especie 36:2, correspondiente a una FC que contenía 2 cadenas de ácido oleico, está enmarcada. Como se puede ver, la adición de ácido oleico o de LPA da como resultado un aumento de la proporción de esta especie lo que no sucede con el OAG.

Figura 6B – El conjunto de las especies de FL detectables en estas condiciones de espectrometría de masas se analizó para cuantificar de manera global el contenido de formas de AGS. El índice de saturación así obtenido permitió poner de manifiesto que el OAG, contrariamente al ácido oleico y al LPA, no restaura un índice de saturación comparable al observado en la condición de control.

Figuras 7: El OAG y el LPA previenen la apoptosis de las células β-pancreáticas en presencia de ácidos grasos saturados, reduciendo la proporción de inducción de la UPR.

Las células β-pancreáticas BRIN-BD11 se cultivaron en condiciones de control o en presencia de una fuente exógena de ácidos grasos saturados (ácido palmítico, 200 μM), como ha sido descrito por Dhayal & Morgan (2011) con el fin de generar condiciones de lipointoxicación con o sin adición de OAG o de LPA.

Figura 7A - La proporción de células muertas se estimó en ausencia (Control) o en presencia de ácido palmítico (Palm), para concentraciones crecientes de OAG o de LPA.

Figura 7B - Las tasas de fosforilación de eIF2α se analizaron igualmente en las diferentes condiciones por transferencia de Western, en ausencia (Ø) o en presencia de OAG o de LPA, y se normalizaron a las cantidades de eIF2α totales. Estando correlacionada la proporción de fosforilación con la intensidad de la UPR, este experimento demuestra que el OAG reduce la UPR inducida por la acumulación de palmitato. U. A.: unidades arbitrarias.

Figuras 8: Los tejidos bronquiales de pacientes afectados por mucoviscidosis o BNOC están lipointoxicados por AGS

Figura 8A – Se disociaron las biopsias pulmonares con el fin de no conservar más que el componente bronquial (secuencia de izquierda a derecha).

Figura 8B – Se extrajeron los lípidos totales de las células epiteliales bronquiales, los fosfolípidos se purificaron y después las diferentes especies de fosfatidilcolina (FC), que constituyen los FL mayoritarios, se analizaron por espectrometría de masas en modo positivo, según Pineau *et al.*, (2008). Las especies 32:0 y 36:2, corresponden a las FC que contienen 2 cadenas de ácido palmítico y 2 cadenas de ácido oleico. Como es posible ver, la relación AGS/AGI se invierte cuando se comparan las FC de las biopsias de control con las FC de biopsias de pacientes afectados de mucoviscidosis o de BNOC.

Figuras 9: Inducción de la lipointoxicación por AGS en los linajes celulares de epitelios bronquiales, 16HBE y CFBE

Figura 9A – Los linajes de células epiteliales bronquiales humanos 16HBE y CFBE se utilizaron para analizar el contenido de ácidos grasos de sus fosfolípidos, en condiciones de cultivo *in vitro*. Contrariamente al perfil lipídico observado para biopsias pulmonares de pacientes con mucoviscidosis o afectados por BNOC (véase la Figura 7B), la relación AGS/AGI en las FC de los linajes 16HBE y CFBE indica una ausencia de lipointoxicación.

Figura 9B – Los linajes CFBE se cultivaron durante 16 horas con cantidades crecientes de ácido palmítico. El análisis del perfil lipídico de las células en tales condiciones revela que aportes exógenos de AGS mimetizan las lipointoxicaciones observadas en pacientes afectados por mucoviscidosis (Palm 100 μ M) o por BNOC (Palm 250 μ M).

Figuras 10: Las condiciones de hipoxia inducen, *in vitro*, la lipointoxicación de los linajes celulares 16HBE y CFBE, reconstituyendo artificialmente las lipointoxicaciones hipóxicas observadas en las biopsias de pacientes

Los linajes 16HBE y CFBE se cultivaron durante 24 horas en condiciones estándares (normoxia: 95 % de O₂ + 5 % de CO₂) o en un ambiente anóxico (hipoxia: 95 % de N₂ + 5 % de CO₂). Después de haber extraído los lípidos totales y purificado los fosfolípidos se analizó el contenido global de ácidos grasos. Se calcularon las relaciones AGS/AGI con el fin de determinar las tasas de saturación de los fosfolípidos en cada una de las condiciones. Los resultados indican que se puede inducir, *in vitro*, la lipointoxicación por una hipoxia artificial.

Figura 11: Los compuestos anti-AGS contra la influencia pro-apoptótica de la lipointoxicación en las células epiteliales bronquiales

Los linajes CFBE se cultivaron en condiciones estándares (Control) o se sometieron a una fuente exógena de AGS (ácido palmítico 250 μ M), durante 16 horas, sin (Ø) o con la adición de 100 μ M de los compuestos de interés, como se ha indicado. Las células se lisaron luego entonces y se cuantificó la apoptosis como se indica en los Ejemplos.

Figuras 12: El monooleato de manida disipa la hipertensión bronquial en tejidos patológicos

Figura 12A – Se diseccionaron anillos bronquiales de pacientes sanos (Control), afectados de mucoviscidosis (muco) o de bronconeumopatía crónica obstructiva (BNOC) y después se midieron sus tonos de base. Los resultados indican que las dos patologías respiratorias están correlacionadas con una hipertensión de los bronquios.

Figura 12B - La misma operación se realizó después de una pre-incubación de los anillos durante 4 horas a 37°C en una solución fisiológica suplementada (+) o no con 100 μ M de monooleato de manida como se ha indicado.

Para cada histograma se fija una relación N/n. N corresponde al número de anillos analizados y n al número de pacientes analizados.

7. Ejemplos

La invención se comprenderá mejor con la lectura de los ejemplos siguientes:

A/ Cepas de levaduras, linajes de células de mamíferos y muestras biológicas

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recogidas en la Tabla 1 se utilizan para los diferentes ensayos de restauración del crecimiento, para la puesta de manifiesto de las toxicidades, para el análisis del contenido de ácidos grasos de los fosfolípidos celulares, así como para los ensayos de desencadenamiento de la “respuesta de las proteínas no plegadas” (UPR).

El estado de activación de la UPR y la inducción de la muerte celular por lipointoxicación se analizaron igualmente en los linajes β -pancreáticos de rata, BRIN-BD11.

Por otra parte, se analizaron igualmente la inducción de la apoptosis, la secreción de IL-8 y el perfil lipídico, en repuesta a la lipointoxicación por AGS, en linajes de células epiteliales bronquiales humanas 16HBE (homocigoto natural para el gen CFTR) y/o CFBE (homocigoto F508del-CFTR).

Además, se realizaron experimentos *ex vivo*, en biopsias de pacientes sanos, afectados de mucoviscidosis o de BNOC con el fin de determinar los perfiles lipídicos correspondientes, así como la influencia de los compuestos de interés sobre el fenómeno de hipertensión pulmonar. Las utilizaciones de las biopsias respetan una normativa ética definida por el *Comité de Protection des Personnes (CPP) Ouest III* de Francia.

5

Tabla 1: Cepas de levaduras utilizadas

Cepa	Genotipo	Origen
<i>hem1Δ</i>	<i>MATα trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	FY1679α xFYHO4
QM (H1246 W303)	<i>MATα are1::HIS3 are2::LEU2 dgal::KanMX4 lro1::TRP1 ADE2 ura3</i>	ScanBi Ltd., Alnarp, Suecia
WT (G175 W303)	<i>MATα ADE2 MET his3 leu2 ura3 trp1</i>	ScanBi Ltd., Alnarp, Suecia

B/ Lipointoxicaciones de levaduras *hem1Δ*

La cepa que lleva la mutación *hem1Δ* se cultiva, en condiciones aerobias, bajo agitación y a 28°C, en un medio líquido YPG^A (YPG (extracto de levadura al 1 % (m/v), peptona al 1 % (m/v) y glucosa al 2 % (m/v)) suplementado con ácido δ-aminolevulínico (ALA) a 80 µg/mL). La lipointoxicación por ácidos grasos saturados (AGS) se provoca por disminución de los ácidos grasos insaturados (AGI) – cuya síntesis es dependiente de la presencia de hemo (principalmente el agrupamiento prostético de la enzima Ole1p) – por transferencia en medio YPG⁺ (YPG suplementado con ergosterol a 80 µg/mL para compensar la disminución de esterol obtenida en esta condición). La lipointoxicación puede ser inducida en medio sólido YPG⁺ + agar-agar al 2 % (m/v) transfiriendo 3500 células (*hem1Δ* procedentes de un precultivo en YPG^A)/cm² o, alternativamente, en medio líquido inoculando 2.10⁶ células/mL de YPG⁺. Clásicamente, los efectos de la lipointoxicación por AGS se analizan 7 horas después de la transferencia en medio YPG⁺. La capacidad de un compuesto en contrarrestar los efectos perjudiciales de una lipointoxicación por AGS se evalúa sucesivamente a la adición de este compuesto sobre (o en) el medio de transferencia YPG⁺, después de la siembra con las células.

C/ Lipointoxicaciones de células β-pancreáticas de rata por ácido palmítico

1) Preparación de los reactivos lipídicos:

Las especies lipídicas se preparan en etanol antes de ser complejadas con seroalbúmina bovina (BSA, inicialmente desprovista de ácidos grasos) por una incubación de 1 hora a 37°C. La reserva de palmitato se obtiene por adición de un volumen de etanol antes de que el conjunto sea calentado a 70°C para su homogeneización. Las soluciones de OAG y de LPA se preparan en etanol al 100% a temperatura ambiente. Para las incubaciones de células de mamíferos, las concentraciones finales de BSA y de etanol en el medio de cultivo se mantienen respectivamente en 1 y 0,5 % (m/v).

2) Ensayos de viabilidad celular

El linaje de células β-pancreáticas (BRIN-BD11) de rata se cultiva en medio RPMI-1640 completo que contiene glucosa 11 mM y suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (STF), L-glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Para cada experimento las células se siembran inicialmente a una densidad de 0,5 x 10⁵ células/mL en placas de 6 pocillos durante 24 horas. A continuación, el medio completo se reemplaza por un equivalente desprovisto de STF pero conteniendo los reactivos lipídicos de interés, en las concentraciones deseadas, complejados con BSA. En el caso de las condiciones de control se utilizan entonces cantidades idénticas de BSA y etanol. Al final de las incubaciones se recoge el conjunto de células (muertas y vivas) y se centrifuga a 300 g durante 5 minutos. El sedimento celular se vuelve a poner en suspensión en 200 µL de medio, y después el ADN de las células muertas (que han perdido la integridad de su membrana plasmática) se marca con yoduro de propidio (YP) añadiendo 200 µL de una solución de YP a 20 µg/mL de un tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato (PBS), 2% (v/v) de STF, nitrato de sodio 10 mM). Después de una incubación de 10 minutos sobre hielo, las muestras así obtenidas se analizan por citometría de flujo. Para la cuantificación se utiliza un aparato Beckman Coulter EPICS XL MCL, un canal FL3 sirve para la detección de las emisiones de YP intercalado en el ADN y el análisis se realiza con ayuda del programa informático EXPO32 ADC (Applied Cytometry Systems V 1.1, versión 207).

3) Transferencia de Western:

Las células BRIN-BD11 se siembran a una densidad de 0,5 x 10⁵ células/mL en frascos T25 durante 24 horas. Como se ha indicado precedentemente, el medio completo se reemplaza entonces por un equivalente desprovisto de STF pero que contiene los reactivos lipídicos de interés. Después de 6 horas de incubación se realiza la extracción de las

proteínas totales con ayuda de un tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y Triton-X al 1 % (v/v) que contiene inhibidores de proteasas y de fosfatasa. Estas proteínas se someten entonces a una electroforesis en gel de acrilamida al 12% NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gels (Invitrogen) antes de ser transferidas a una membrana de PVDF y después sondadas con ayuda de los anticuerpos anti-fosfoelF2α (Cell Signalling (New England Biolabs)) diluidos 1/1000. En un segundo momento las membranas son decapadas con el tampón Re-Blot Plus-Strong (Millipore) antes de ser sondadas una segunda vez con anticuerpos anti-elF2α total (Cell Signalling (New England Biolabs)) diluidos 1/1000. El análisis por densitometría de la abundancia relativa de las formas fosforiladas o no fosforiladas de la proteína elF2α se efectúa con el sistema de análisis *Fluor-S Multi-imager* combinado con el programa informático Quantify One (Biorad UK Ltd).

D/ Restauración del crecimiento

1) Cribado de compuestos: Después de la inducción de una lipointoxicación por AGS (para *hem1Δ* cultivadas en un medio sólido) se depositan en la superficie del agar-agar gotas de 5 µL de soluciones de diferentes compuestos a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) o en etanol (EtOH). La capacidad de un compuesto en contrarrestar la detención del crecimiento celular inducido por lípidos se estima por la aparición de un halo de colonias de *hem1Δ* en el emplazamiento del depósito de dicho compuesto después de 3 días de cultivo a 28°C (véase Deguil *et al.*, 2011).

2) Cinética de proliferación: Conjuntamente con la inducción de una lipointoxicación por AGS (para *hem1Δ* en medio líquido) se añaden diferentes compuestos a los cultivos a una concentración inicial de 200 µM. El seguimiento de la proliferación se realiza midiendo la densidad celular por espectrometría, a intervalos de tiempo regulares (todas las horas de la duración de la observación). A una longitud de onda de 600 nm, una unidad de densidad óptica (DO_{600 nm}) corresponde a 2.10⁷ células/mL.

E/ Ensayo de toxicidad

Paralelamente, las cepas naturales (WT) y QM se cultivan, en condición aerobia, bajo agitación y a 28°C, en un medio líquido YPG antes de sembrar 3500 células por cm² de YPG + agar-agar al 2 % (m/v). Después de esta transferencia sobre medio sólido, se depositan en la superficie del agar-agar gotas de 1 µL, de soluciones de diferentes compuestos a 1, 10 y 100 mM en DMSO o EtOH. Separadamente, se realizan igualmente depósitos de DMSO y de EtOH con el fin de evaluar la toxicidad intrínseca de estos dos disolventes. Después de 3 días de cultivo a 28°C, se evalúa la toxicidad de los compuestos ensayados comparando los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento obtenidos para los depósitos de los disolventes en bruto con los de los depósitos de las diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Contrariamente a la cepa WT, la cepa QM es incapaz de tamponar un exceso de ácido oleico exógeno bajo la forma de lípidos neutros (triglicéridos (TG) o ésteres de esteroides (EE)) en las gotitas lipídicas. Así, en el caso de una ausencia de toxicidad frente a la cepa WT, la observación de una toxicidad de un compuesto frente a la cepa QM indica que este compuesto es percibido como una fuente de ácido graso libre por las levaduras.

F/ Extracción de lípidos totales

La cepa *hem1Δ* se cultiva en medio líquido YPG^A, YPG⁺ o YPG⁺ + 200 µM del compuesto de ensayo, en condiciones aerobias, bajo agitación y a 28°C durante 7 horas, a partir de una concentración celular inicial de 2.10⁶ células/mL. Al final del cultivo, se recogen 10⁸ células con el fin de realizar la extracción de los lípidos totales. Después de haber puesto las células en suspensión en 1 mL de agua destilada a 4°C, se añaden 500 µL de bolas de vidrio (Ø 0,6 mm) y el conjunto se somete luego a 3 secuencias de 20 segundos a 5000 revoluciones/minuto en un agitador (los tubos se mantienen sobre hielo entre cada una de las 3 secuencias). El lisado celular así obtenido, completado con el agua de lavado de las bolas (1 mL), se transfiere luego a un tubo de vidrio de 40 mL (Corex™) antes de realizar la extracción de los lípidos utilizando una relación metanol:cloroformo 2:1 (v/v). Inicialmente, se añaden 6 mL de metanol y el conjunto se agita con vórtice durante 30 segundos y luego se incuba durante 15 minutos a 65°C. Una vez que la mezcla se ha enfriado a la temperatura ambiente, se añaden 3 mL de cloroformo y después el conjunto se agita de nuevo con vórtice durante 30 segundos antes de dejar que se desarrolle la extracción durante 16 horas. Posteriormente, la muestra se centrifuga durante 12 minutos a 10.000 g antes de transferir el líquido sobrenadante a un nuevo tubo Corex™. Después de la adición de 2 mL de cloroformo y luego de 4 mL de agua destilada, el conjunto se agita con vórtice durante 30 segundos y luego se centrifuga durante 8 minutos a 3000 g. Después de eliminación de la fase superior resultante, la fase orgánica inferior se recoge en un tubo de vidrio para hemólisis. Finalmente, se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno a 80°C para obtener las muestras de lípidos celulares totales.

En el caso de biopsias de pacientes, después de la disección de los lóbulos pulmonares y extracción de los bronquios, las células epiteliales bronquiales se lavaron tres veces en PBS antes de proceder a la preparación de los lípidos totales como se ha indicado precedentemente a partir de 10⁵ células.

G/ Purificación de fosfolípidos y análisis por espectrometría de masas

Las muestras de lípidos celulares totales se vuelven a poner en suspensión en 1 mL de diclorometano siendo agitadas con vórtice durante 30 segundos. El conjunto se deposita sobre una columna de sílice (BOND ELUT-SI, 100 mg, 1 mL) pre-acondicionada con 3 mL de metanol y luego 2 mL de diclorometano sucesivamente. La fracción

retenida por la columna se lava a continuación con 2 mL de diclorometano y luego con 3 mL de acetona sucesivamente. Finalmente, se depositan sobre la columna 2 mL de una mezcla de cloroformo/metanol/agua 50:45:5 (v/v/v) y los fosfolípidos así eluidos se recogen en un tubo de vidrio para hemolisis. El disolvente se evapora bajo nitrógeno a 80°C para obtener las muestras de fosfolípidos celulares.

- 5 Una vez puesta de nuevo en suspensión en 100 µL de mezcla Mlx⁻ (isopropanol/acetonitrilo/agua 2:1:1 (v/v/v) + trietilamina al 1 % (v/v)) o de mezcla Mix⁺ (isopropanol/acetonitrilo/agua 2:1:1 (v/v/v) + ácido fórmico al 1 % (v/v)), se analizan las muestras por espectrometría de masas (*ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry* (ESI-MS)), en modo negativo o positivo respectivamente, y los resultados obtenidos sirven para analizar el contenido de ácidos grasos de las diferentes especies de fosfolípidos.

10 H/ Ensayo de desencadenamiento de la UPR

- La cepa *hem1Δ* transformada por el plásmido pPW344 [2µ URA3 4xUPRE-*LacZ* (Patil et al., 2004)] se cultiva en medio líquido YPG^A, YPG o YPG + 200 µM del compuesto de ensayo, en condición aerobia, bajo agitación y a 28°C durante 7 horas, a partir de una concentración celular inicial de 2.10⁶ células/mL. Al final del cultivo se recogen 10⁸ células con el fin de cuantificar la actividad de la beta-galactosidasa (β-gal) resultante de la expresión del transgén *LacZ* (en el caso de una activación de la UPR). En un primer momento las células se ponen de nuevo en suspensión en 1,5 mL de tampón Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM; solución a pH 7), y después una dilución 1/15 de esta suspensión se utiliza para realizar una medida de DO_{600 nm}. En un segundo momento, la suspensión se completa con 100 µL de dodecil-sulfato sódico (SDS) al 0,1 % (v/v) y 200 µL de cloroformo, y después se agita con vórtice en dos secuencias sucesivas de 30 segundos. Después de decantación, 400 µL (volumen V) de la solución así obtenida se transfieren a un tubo de vidrio para hemolisis y después se completan con 600 µL de tampón Z. Se añaden entonces 200 µL del sustrato orto-nitrofenil-β-galactósido (ONPG) a 4 mg/mL de tampón Z antes de que el conjunto sea homogeneizado por agitación con vórtice y luego se incuba al baño maría a 30°C para iniciar la reacción. Cuando el conjunto presenta una ligera tonalidad amarilla se interrumpe la reacción (en el tiempo t), a temperatura ambiente, por adición de 500 µL de Na₂CO₃ 1 M. Finalmente, después de haber centrifugado las muestras durante 5 minutos a 800 g y recogidos los líquidos sobrenadantes en nuevos tubos de vidrio para hemolisis, los productos de la reacción (o-nitrofenol, así como los residuos celulares se valoran por espectrometría a longitudes de onda 420 y 550 nm respectivamente. Para cada muestra la actividad de β-gal (U) se calcula por la fórmula $U = (1000 \times [DO_{420 \text{ nm}} - (1,75 \times DO_{550 \text{ nm}})]) / (t \times V \times DO_{600 \text{ nm}})$, expresada en unidades arbitrarias.

30 I/ Lipointoxicaciones *in vitro* de los linajes celulares de los epitelios bronquiales, 16HBE y CFBE.

- 1) Lipointoxicación por ácido palmítico exógeno.** Como ha sido presentado precedentemente para las BRIN-BD11, los 16HBE y los CFBE se cultivan en MEM suplementado con 5 µg/mL de plasmocina y 10 % (v/v) de suero de caballo a 37°C antes de ser expuestos a concentraciones de ácido palmítico de 50, 100 o 250 µM durante 16 horas y de analizar las consecuencias de la lipointoxicación exógena.
- 35 **2) Lipointoxicación hipóxica.** De manera estándar los 16HBE y los CFBE se cultivan en condición de normoxia. De esta manera las células se mantienen en un recinto alimentado por una mezcla compuesta de 95 % de O₂ y de 5 % de CO₂. En las condiciones de inducción de la hipoxia, las células se someten a una mezcla gaseosa anóxica compuesta de 95 % de N₂ y de 5 % de CO₂ durante 48 horas antes de analizar las consecuencias de la lipointoxicación denominada hipóxica.
- 40 **3) Ensayo de la apoptosis.** En las condiciones de lipointoxicación exógena, la inducción de la apoptosis se analizó por utilización del kit de detección de muerte celular ELISA^{PLUS} (ROCHE). Los CFBE se siembran en una placa de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células por pocillo. Al final de las 16 horas de lipointoxicación, las células se lisan y se mide la apoptosis según las instrucciones proporcionadas, por cuantificación de los oligonucleosomas citoplásmicos que son reveladores de la degradación del ADN asociada a la apoptosis.

J) Medida del tono basal bronquial

- Después de la disección de los lóbulos pulmonares se aíslan anillos bronquiales y se montan en un dispositivo de análisis por la técnica de los órganos aislados, en la cual se sumergen en un tampón fisiológico KREBS. Después de la estabilización del tono de los anillos se mide el tono basal. Alternativamente, los anillos se incuban durante 4 horas en un tampón KREBS suplementado con 100 µM de monooleato de manida.

REFERENCIAS

- Alkhateeb H, Chabowski A, Glatz JFC, Luiken JFP, Bonen A (2007). Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 293: E783-E793.
- 55 - Bigay J, Casella JF, Drin G, Mesmin B, Antonny B. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* 2005 Jul 6;24(13):2244-53.

- Boslem E, Macintosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, Laybutt DR, Meikle PJ, Biden TJ. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 β -cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J.* 2011 Abril 1;435(1):267-76.
- 5 - Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. (2003) β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. Vol. 52, pp. 102-110.
- Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG (2001) Inverse Relationship Between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation. *Diabetes* 50: 1771-1777.
- 10 - Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. (2008) Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. Vol. 121, pp. 2308-2318.
- Deguil J, Pineau L, Rowland Snyder EC, Dupont S, Beney L, Gil A, Frapper G, Ferreira T (2011) Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape. *Traffic* 12: 349-362.
- Dhayal S, Morgan NG (2011) Structure-activity relationships influencing lipid-induced changes in eIF2 α phosphorylation and cell viability in BRIN-BD11 cells. *FEBS Lett* 585: 2243-2248.
- 15 - Diakogiannaki E, Morgan NG. (2008) Differential regulation of the ER stress response by long-chain fatty acids in the pancreatic β -cell. Vol. 036, pp. 959-962.
- Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG. (2008) Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. Vol. 197, pp. 553-563.
- 20 - Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, Shiota M, Young JD. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Mol Metab.* 2014 Mayo 22; 3(5):544-53.
- Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z. (2007) Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. Vol. 293, pp. E576-586.
- 25 - Kato T, Shimano H, Yamamoto T, Ishikawa M, Kumadaki S, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Nakakuki M, Hasty AH, Takeuchi Y, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yamada N. (2008) Palmitate Impairs and Eicosapentaenoate Restores Insulin Secretion Through Regulation of SREBP-1c in Pancreatic Islets. Vol. 57, pp. 2382-2392.
- Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK (2009) α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology* 623: 107-112.
- 30 - Kincaid MM, Cooper AA (2007) Eradicate ER Stress or Die Trying. *Antioxid Redox Signal.*
- Kirby EF, Heard AS, Wang XR. Enhancing the Potency of F508del Correction: A Multi- Layer Combinational Approach to Drug Discovery for Cystic Fibrosis. *J Pharmacol Clin Toxicol.* 2013 Agosto 28;1(1): 1007.
- 35 - Kohlwein SD, Petschnigg J (2007) Lipid-induced cell dysfunction and cell death: lessons from yeast. *Current hypertension reports* 9: 455-461.
- Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden TJ (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 752-763.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, et al. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *PNAS* 100: 3077-3082.
- 40 - Patil CK, Li H, Walter P. Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 2004 Agosto;2(8):E246.
- Payet LA, Pineau L, Snyder EC, Colas J, Moussa A, Vannier B, Bigay J, Clarhaut J, Becq F, Berjeaud JM, Vandebrout C, Ferreira T. Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties. *Traffic.* 2013 Septiembre 6.
- 45 - Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegar-Moran O, Galletta LJ, Verkman AS. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest.* Sep;115(9):2564-71. 2005.
- Petschnigg J, Moe OW, Stagljar I (2011) Using yeast as a model to study membrane proteins. *Current opinion in nephrology and hypertension* 20: 425-432.

- Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, Zellnig Gn, Kurat CF, Natter K, Kohlwein SD (2009) Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast. *J Biol Chem* 284: 30981-30993.
- 5 - Pineau L, Bonifait L, Berjeaud J-M, Alimardani-Theuil P, Berges T, Ferreira T (2008) A Lipid-mediated Quality Control Process in the Golgi Apparatus in Yeast. *Mol Biol Cell* 19:807-821.
- Pineau L, Colas J, Dupont S, Beney L, Fleurât-Lessard P, Berjeaud JM, Berges T, Ferreira T (2009) Lipid-Induced ER Stress: Synergistic Effects of Sterols and Saturated Fatty Acids. *Traffic* 2009 Junio;10(6):673-90.
- Pineau L, Ferreira T (2010) Lipid-induced ER stress in yeast and β cells: parallel trails to a common fate. *FEMS Yeast Research*.
- 10 - Poon PP, Nothwehr SF, Singer RA, Johnston GC. The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. *J Cell Biol*. 2001 Diciembre 24;155(7): 1239-50.
- Robinson M, Poon PP, Schindler C, Murray LE, Kama R, Gabriely G, Singer RA, Spang A, Johnston GC, Gerst JE. The Gcs1 Arf-GAP mediates Sncl,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Mol Biol Cell*. 2006 Abril; 17(4): 15 1845-58.
- Sampson HM, Robert R, Liao J, Matthes E, Carlile GW, Hanrahan JW, Thomas DY. Identification of a NBD1-binding pharmacological chaperone that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR. *Chem Biol*. Febrero 25;18(2):231-42. 2011.
- Schneider MF, Marsh D, Jahn W, Kloesgen B, Heimburg T. Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Diciembre 7;96(25): 20 14312-7.
- Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD (1997) The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 398-403.
- 25 - Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Oison E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuis PD, Negulescu P. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Junio;290(6):L1117-30. 2006.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Oison ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 15; 30 108(46): 18843-8. 2011.
- Wang Y, Bartlett MC, Loo TW, Clarke DM. Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol*. Julio;70(1):297-302. 2006.
- Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. (2006) Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. Vol. 291, pp. E275-281.
- 35 - Zhang K, Kaufman RJ. (2006) The unfolded protein response: A stress signaling pathway critical for health and disease. Vol. 66, pp. S102-109.
- Vachel L, Norez C, Becq F, Vandebrouck C. Effect of VX-770 (ivacaftor) and OAG on Ca^{2+} influx and CFTR activity in G551D and F508del-CFTR expressing cells. *J. Cyst. Fibros*. 2013 Diciembre;12(6):584-91.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende una cabeza polar, que comprende al menos un residuo de hidroxilo, sobre el cual está injertado un único ácido graso insaturado que comprende entre 16 y 24 átomos de carbono y que tiene 1 a 6 insaturaciones en configuración *cis* para una utilización en prevenir y/o tratar, en un sujeto, una lipointoxicación por hipoxia asociada a la presencia en exceso en las membranas biológicas de las células no adipocitarias, de ácidos grasos, en particular de ácidos grasos de cadenas largas saturadas y/o esteroides; eligiéndose dicho compuesto entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, N,N-dietanololeamida y sus mezclas; estando asociada dicha lipointoxicación por hipoxia en dicho sujeto a una patología pulmonar.
2. Compuesto para utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque la lipointoxicación por hipoxia es el origen del disfuncionamiento o de la apoptosis de dichas células no adipocitarias por disminución o supresión de la fluidez de su membrana plasmática y/o de la membrana de sus orgánulos.
3. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque no es tóxico para las células capaces de sintetizar lípidos neutros, típicamente triglicéridos y/o esteroides esterificados, en particular para las células epiteliales bronquiales.
4. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se elige entre N,N-dietanololeamida; alternativamente monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y sus mezclas.
5. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque al restaurar la fluidez de las membranas biológicas previene y/o trata la lipointoxicación por hipoxia.
6. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque: (i) es capaz de restaurar el crecimiento de un mutante *hem1Δ* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lipointoxicado, (ii) es capaz de reducir o suprimir la respuesta a proteínas desplegadas ("*Unfolded Protein Response*" (UPR)), (iii) no es tóxico para un mutante QM de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y/o (iv) reduce o suprime la muerte celular por apoptosis de una célula de mamífero lipointoxicada.
7. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la patología pulmonar es una patología pulmonar que produce una insuficiencia respiratoria, más particularmente mucoviscidosis o una bronconeumopatía obstructiva crónica.
8. Compuesto para utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto es un animal, típicamente un mamífero, preferentemente un ser humano.

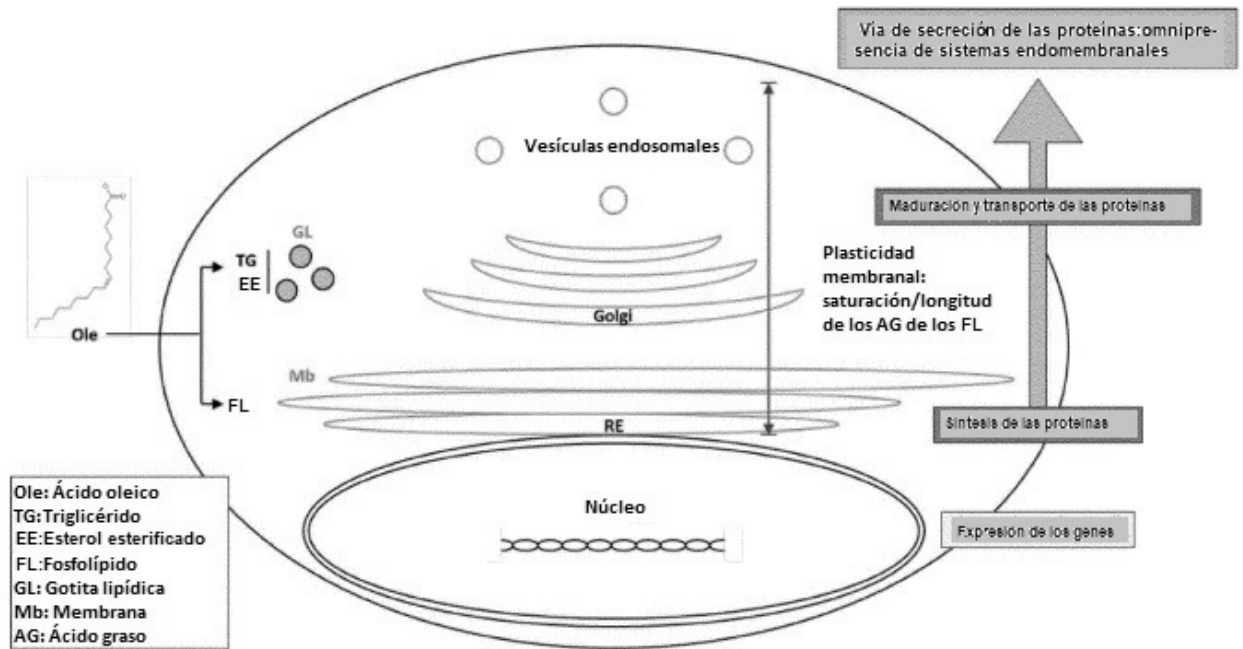


Fig. 1

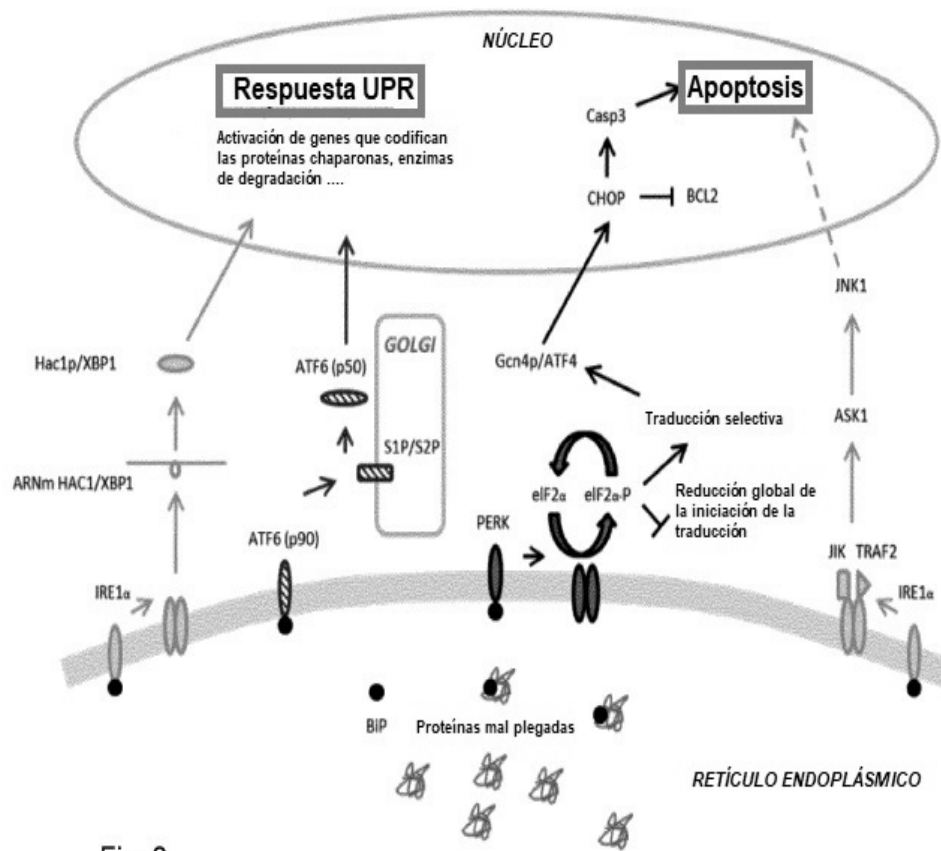


Fig. 2

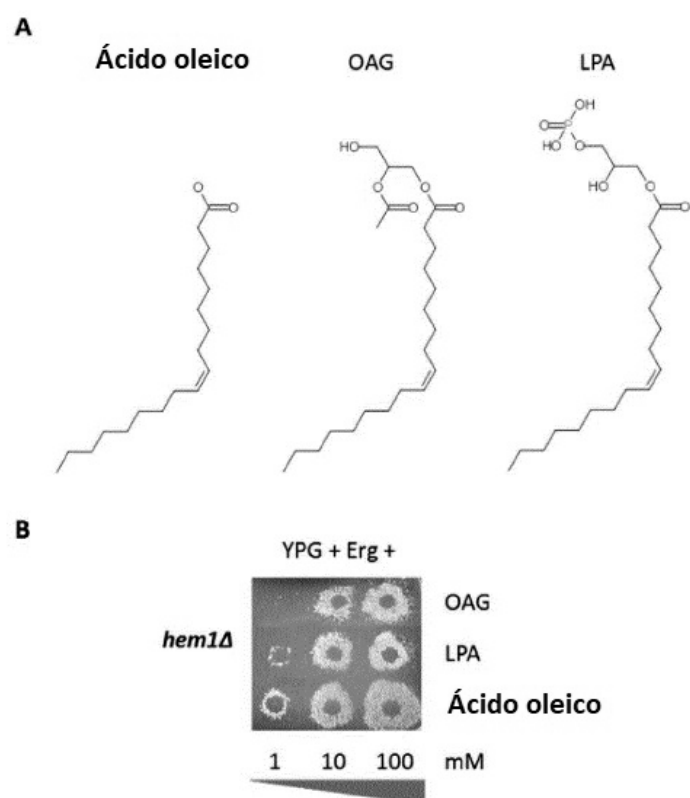


Fig. 3

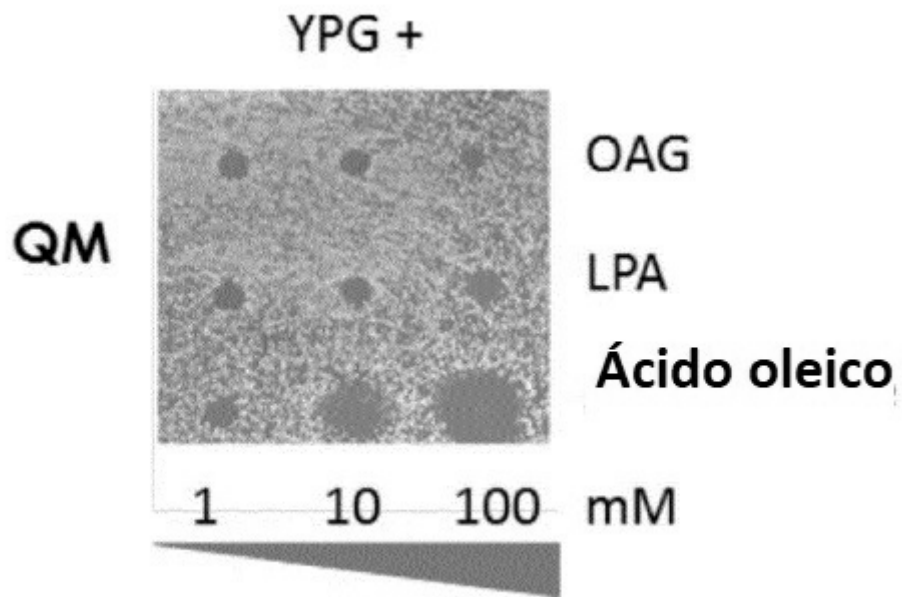


Fig. 4

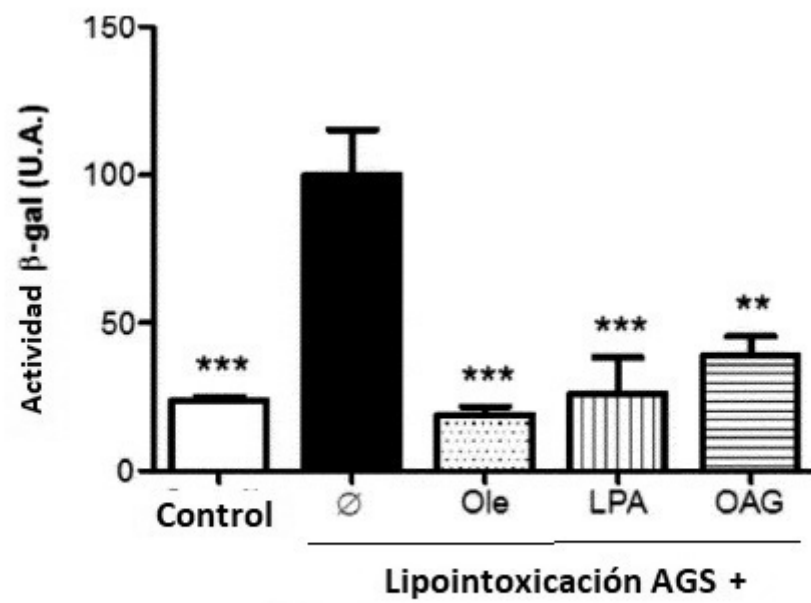


Fig. 5

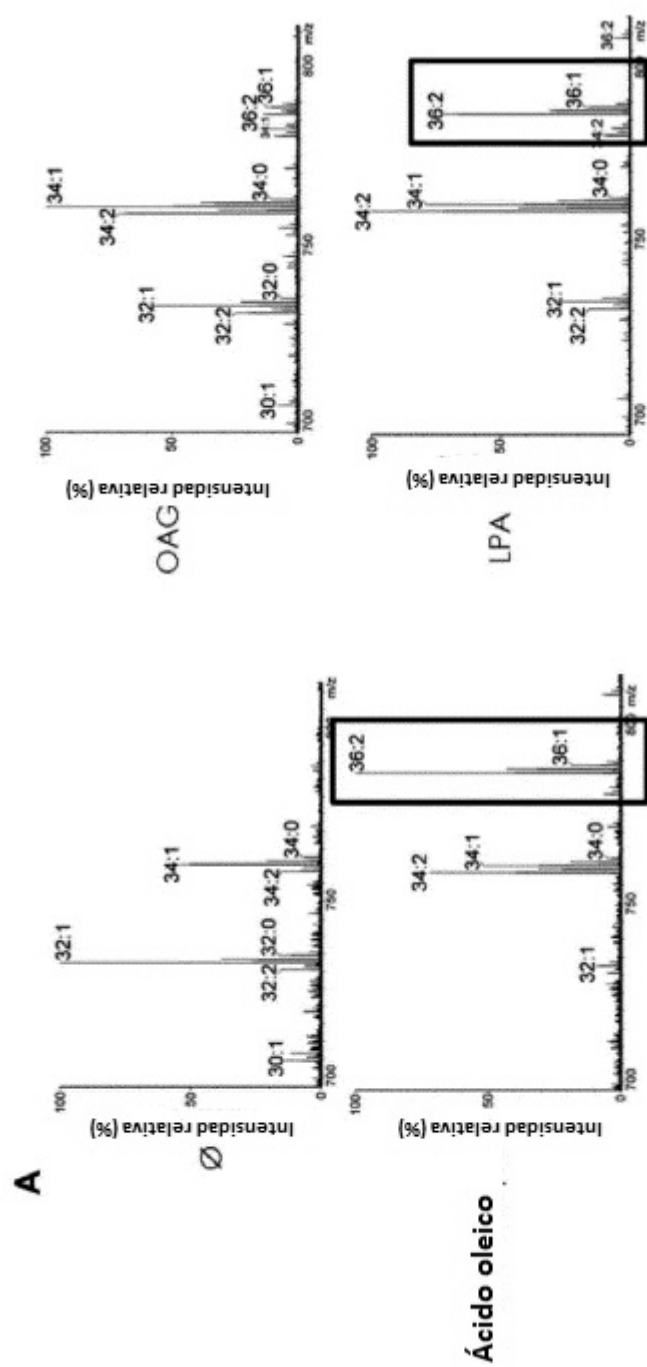


Fig. 6A

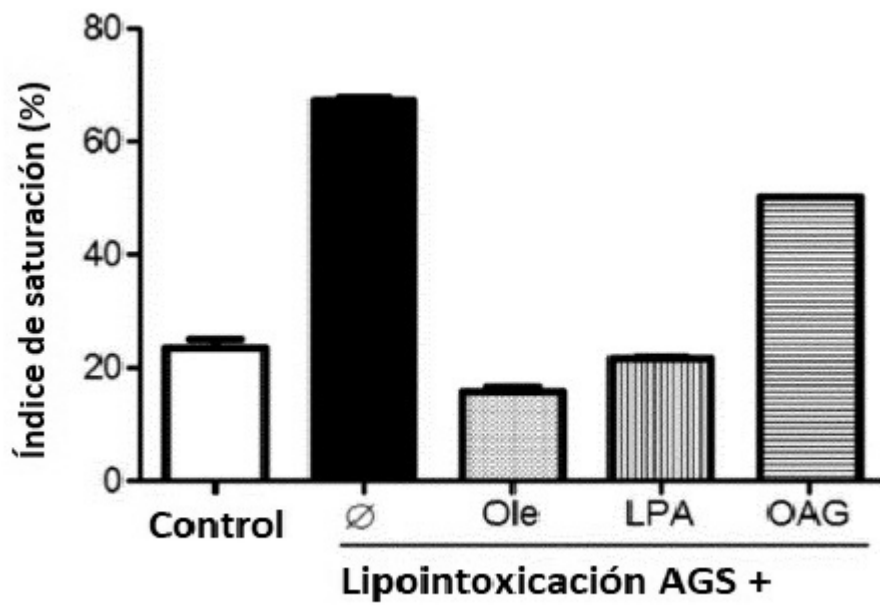


Fig. 6B

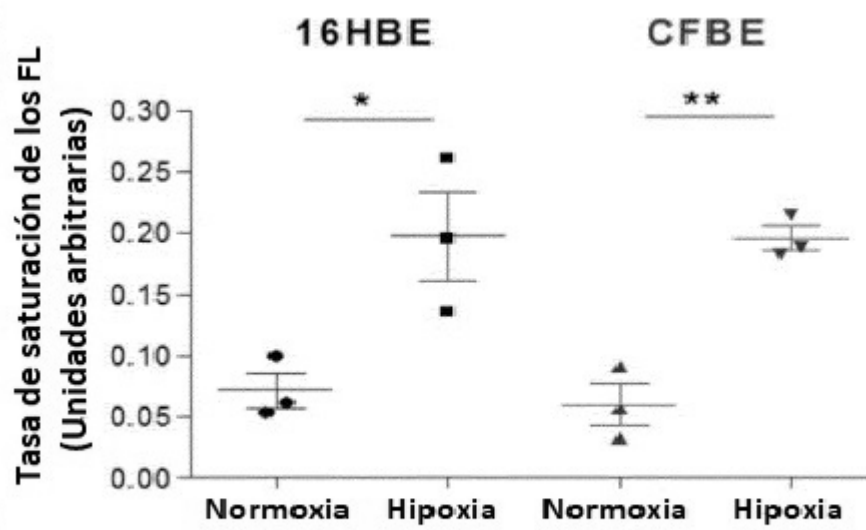


Fig. 10

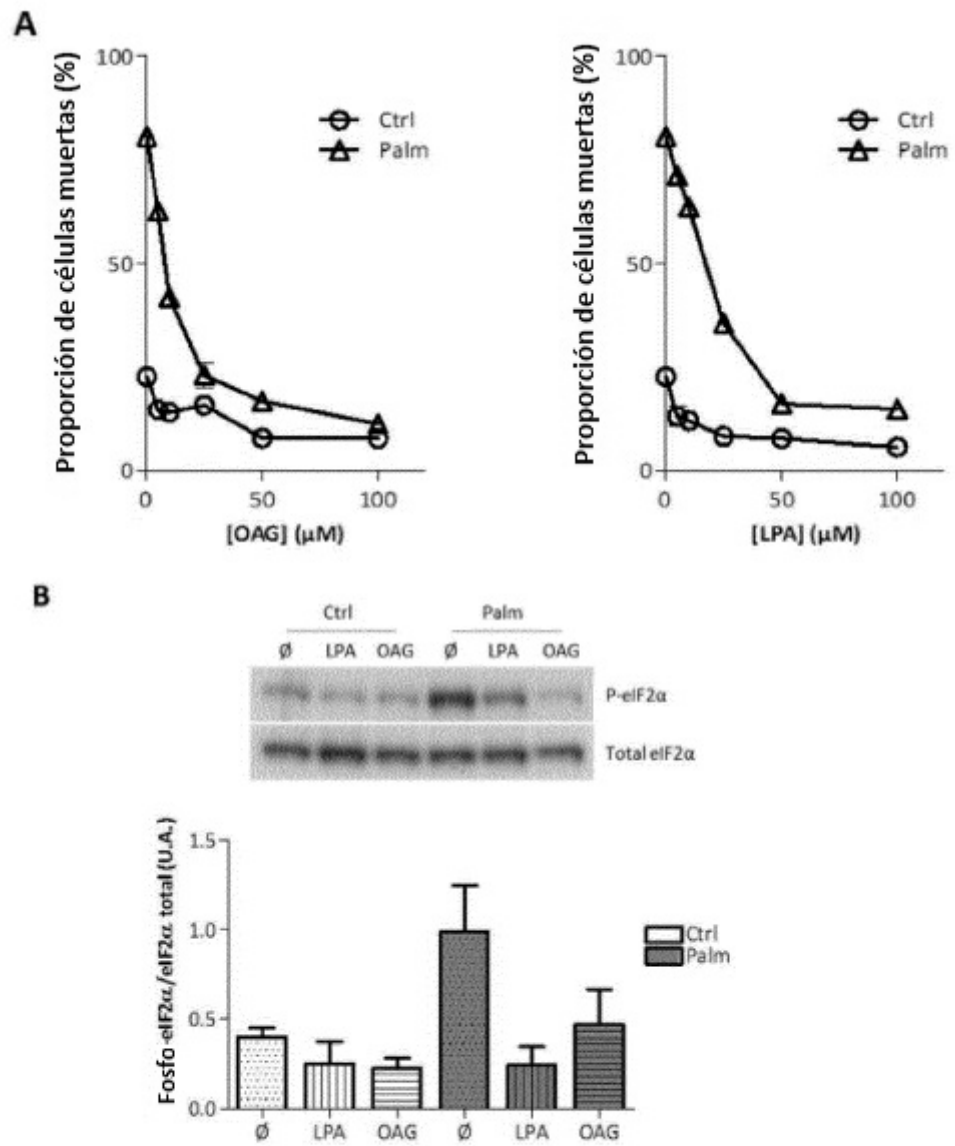


Fig. 7

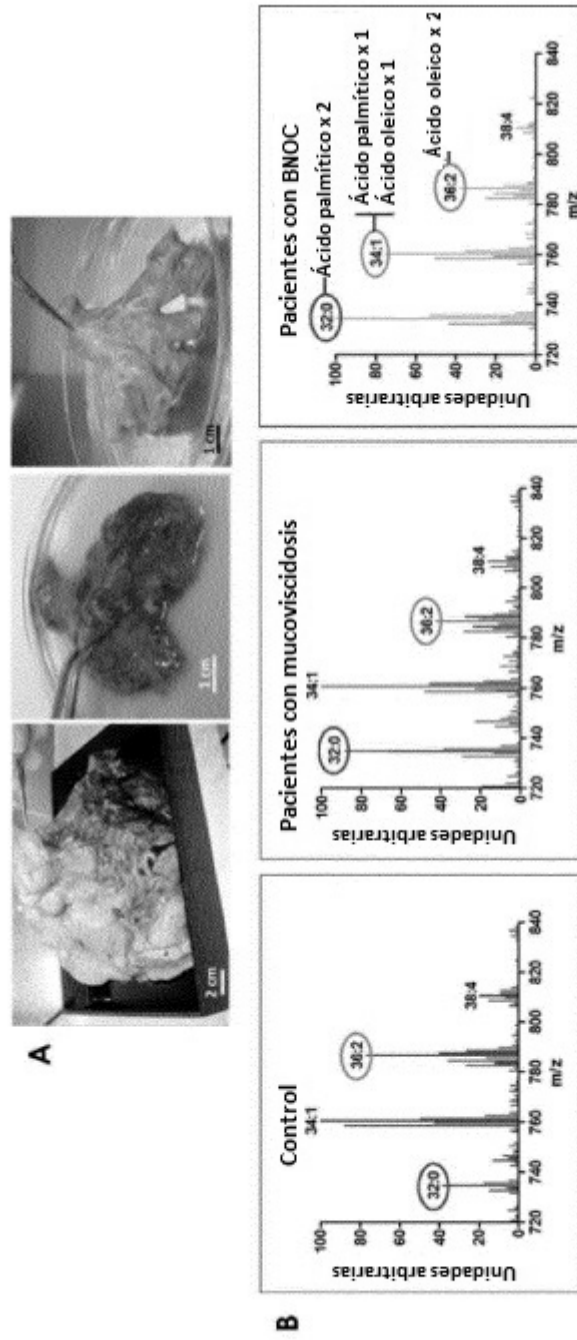
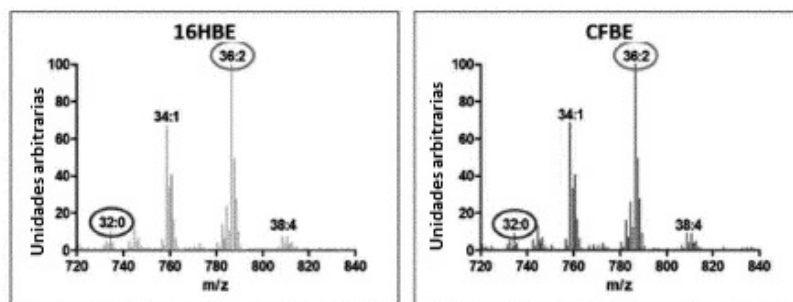


Fig. 8

A



B

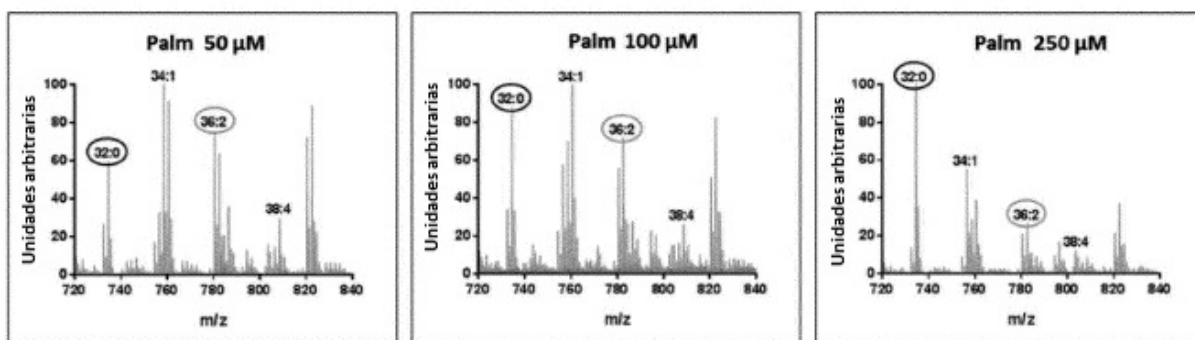
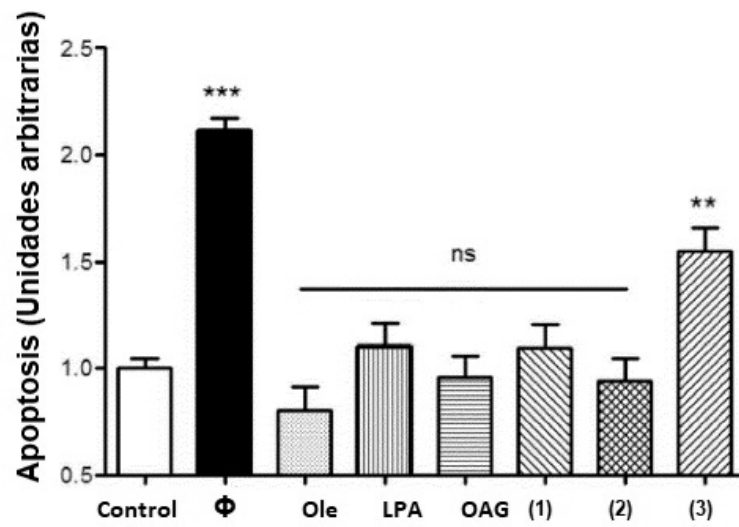


Fig. 9



(1) = Oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo

(2) = Monooleato de manida

(3) = N,N-dietanololeamida

Lipointoxicación AGS +

Fig. 11

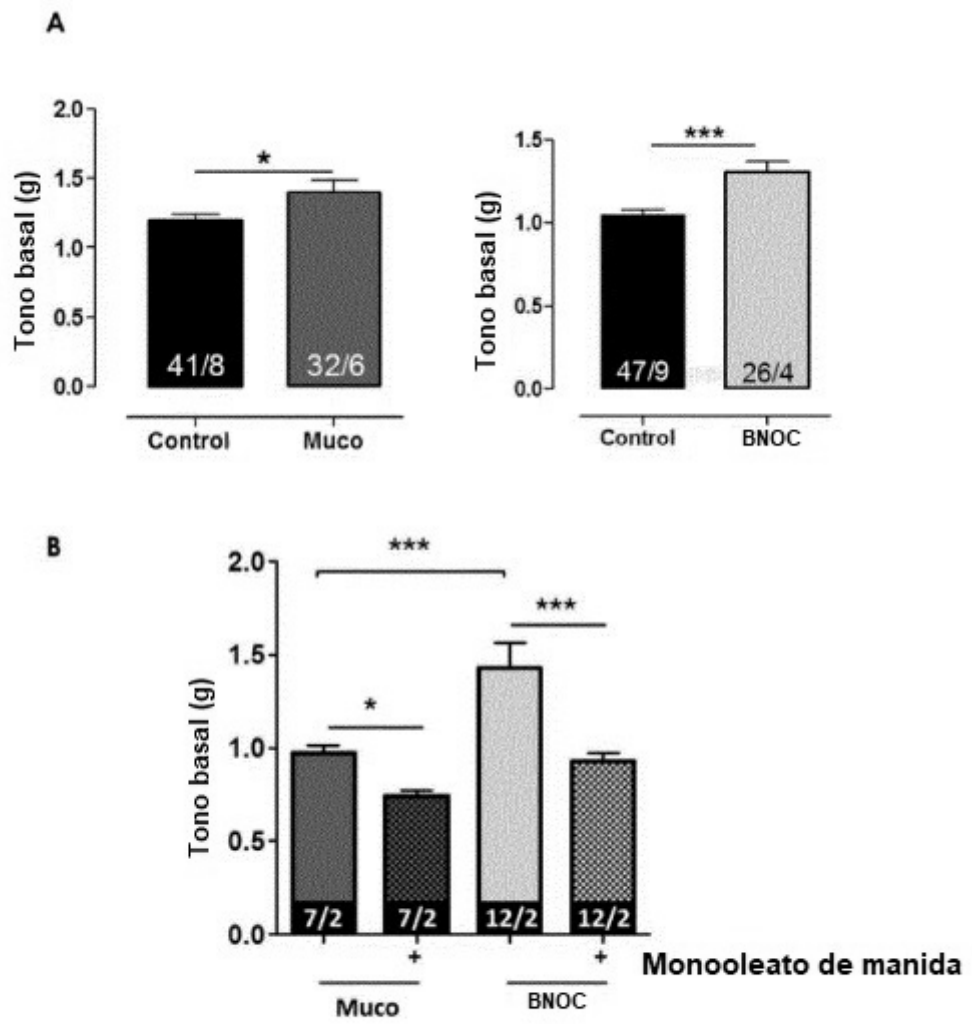


Fig. 12