

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 973**

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/FR2014/052546**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052433**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2014 E 14790233 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3065733**

54 Título: **Compuestos y composiciones que comprenden dichos compuestos para la prevención o el tratamiento de dislipidemias**

30 Prioridad:

08.10.2013 FR 1302334

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR;
UNIVERSITE DE POITIERS (33.3%) y
UNIVERSITY OF EXETER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SPANOVA, MIROSLAVA;
FERREIRA, THIERRY;
CLEMENT, ROMAIN;
DHAYAL, SHALINEE y
MORGAN, NOËL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 682 973 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 y composiciones que comprenden dichos compuestos para la prevención o el tratamiento de dislipidemias

5 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 dislipidemia, que sea de origen alimentario o, alternativamente, asociada a una hipoxia celular, estando dicha dislipidemia asociada típicamente a 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, así como sus utilidades para prevenir y/o tratar una dislipidemia. Los compuestos y composiciones según la invención se pueden utilizar en particular ventajosamente para prevenir y/o tratar una patología elegida entre el síndrome metabólico y/o un síntoma o una anomalía característica del síndrome metabólico, preferiblemente para prevenir y/o tratar la diabetes de tipo 2 ("T2DM") o la esteatosis hepática.

Técnica anterior

15 La resistencia a la insulina, la deficiencia de insulina, la hiperglucemia, la hipercolesterolemia, en particular la hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL, la hipertrigliceridemia, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca y la esteatosis hepática son algunos de los síntomas o anomalías característicos del síndrome metabólico.

20 El síndrome metabólico se define, principal y típicamente (en ausencia de tratamiento) como la manifestación de al menos tres de las cinco anomalías siguientes: obesidad abdominal, hipertrigliceridemia ($TG \geq$ aproximadamente 1,7 mM), baja concentración de colesterol HDL ($HDLc <$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertensión ($PA \geq$ aproximadamente 130/85 mm de Hg) y glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM (véase "Syndrome métabolique et diabète chez l'homme. Composition lipidique et oxydation des lipoprotéines de basse densité (DL) plasmatiques en relation avec l'activation des plaquettes sanguines" - manuscrito de la tesis de Romain Colas - defendida el 10 de diciembre de 2010). La implicación de las dislipidemias en el desarrollo del síndrome metabólico se conoce desde hace varias décadas.

25 Una dislipidemia se define típicamente 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). La mayor parte de las dislipidemias consisten en un aumento de la tasa de estos elementos, siendo mucho más rara una disminución.

30 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 forman su cadena hidrocarbonada. De origen endógeno, se forman por biosíntesis en el citoplasma de las células y se utilizan para la síntesis de triglicéridos, en forma de acil-CoA, en el tejido adiposo y en el hígado, u oxidados por las células. Igualmente entran en la composición de los lípidos estructurales que constituyen las membranas biológicas, como los fosfolípidos y esfingolípidos. 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.

35 Un esteroide es un lípido que posee un anillo de esterano 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.

40 Típicamente, a una concentración anormalmente elevada de lípidos en la sangre corresponde una concentración anormalmente elevada de lípidos en las membranas biológicas ("dislipidemia celular"). Por ejemplo, a una concentración anormalmente elevada de ácidos grasos saturados libres (AGNE) en la sangre, corresponde una concentración anormalmente elevada de ácidos grasos saturados esterificados (AGE) en los fosfolípidos de las membranas biológicas.

45 Estos lípidos se encuentran siempre asociados a proteínas específicas para formar lipoproteínas. Las dislipidemias son el resultado de una desregulación de la homeostasis lipídica.

50 Se ha establecido que una alimentación excesivamente rica en materias grasas de origen animal conduce principalmente a una acumulación de ácidos grasos saturados (AGS) en las membranas biológicas ("lipo-intoxicación") y que esto conduce a la perturbación global de la plasticidad membranar a nivel celular y luego a la inactivación metabólica de las células y finalmente a la apoptosis de la célula (Figura 1).

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 marco del tratamiento de las lipo-intoxicaciones instaladas, es decir lipo-intoxicaciones 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, Dgalp, 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 lipo-intoxicación previa de esta última, estado en el que se sobrepasa la capacidad de almacenamiento de los ácidos grasos insaturados en forma de lípidos neutros en la célula (célula lipo-intoxicada 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 lipo-intoxicación. Se sabe en particular que las perturbaciones asociadas a la acumulación de los AGS conducen 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).

En el caso de la diabetes de tipo 2 ("T2DM"), las repercusiones de la acumulación de AGS se manifiestan en diferentes órganos y se traducen en particular en una deficiencia de insulina en el páncreas (relacionada con la apoptosis de las células β -pancreáticas, descrita anteriormente) pero igualmente por una resistencia a la insulina en el hígado y en los músculos.

Hoy en día se estima en 382 millones el número de individuos diabéticos en el mundo. Si desde hace varias décadas se ha establecido la implicación de una desregulación de la homeostasis lipídica, la mayoría de los tratamientos actuales se centran en los niveles de insulina secretada o el nivel de azúcar en la circulación sanguínea. Concretamente, se utilizan varias moléculas para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Estas se ensayan para cada paciente y luego se reemplazan secuencialmente por nuevas (en función de su influencia sobre la masa corporal y otros efectos secundarios potenciales), si se muestran ineficaces. Según las recomendaciones de AFSSAPS de 2006, se usa principalmente la metformina (un tipo de biguanida) para disminuir la resistencia a la insulina sin provocar hipoglucemia. En una segunda etapa, se pueden usar secretores de insulina, tales como sulfamidas hipoglucémicas o glinidas. Además, desde el año 2008, inhibidores de la DPP4 (gliptinas) y otros análogos del GLP1 (incretinomiméticos) han aparecido igualmente en la gama de productos disponibles para rectificar la glucemia sin afectar por otro lado el contexto dislipidémico. Finalmente, como último recurso, se prescriben inyecciones de insulina.

Ninguna de las estrategias mencionadas permite restaurar, en la base, la funcionalidad de las células y de los órganos lipo-intoxicados y, por tanto, no pueden intervenir en etapas tempranas en la cascada de efectos perjudiciales que se encuentran en el síndrome metabólico, o incluso en la diabetes tipo 2, típicamente aguas arriba de cada una de las etapas de los tratamientos existentes. El enfoque terapéutico actual destinado a estimular las funciones fisiológicas de los órganos "enfermos" podría incluso contribuir, de forma contraproducente, a su debilitamiento y explicar la ineficacia de los medicamentos utilizados en numerosos pacientes y, además, la aparición con el tiempo de fenómenos de resistencia.

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

55 Sumario de la invención

La invención se refiere a una nueva clase de moléculas destinada a la prevención o al tratamiento de patologías asociadas a una lipo-intoxicación por ácidos grasos, típicamente por ácidos grasos saturados (AGS) y/o por esteroides, en particular por 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 o entre 14 y 18 átomos de carbono.

5 La lipo-intoxicación se puede manifestar por una inversión de la relación ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados (AGS/AGI) en los fosfolípidos (FL) presentes en el seno de las membranas biológicas, llegando a ser los AGS mayoritarios, incluso sustituyendo completamente a los AGI. Las moléculas de la invención están así destinadas típicamente a la prevención o al tratamiento de una dislipidemia, un síndrome metabólico, un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente a la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2 o de la esteatosis hepática.

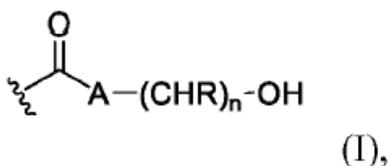
10 Una ventaja considerable que presentan las moléculas (o compuestos) de la invención, con relación a los ácidos grasos insaturados (AGI), en particular al ácido oleico, utilizados en la técnica anterior para compensar un exceso de ácidos grasos saturados (AGS), es que contrariamente a estos últimos,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

15 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 dislipidemia instalada, es decir una dislipidemia responsable de un disfuncionamiento celular detectable, típicamente una alteración de la capacidad o incluso una incapacidad (inactivación metabólica) de la célula para ejercer su función natural.

20 La descripción se refiere así a 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 o tratar una dislipidemia, en un sujeto. La dislipidemia afecta típicamente a las membranas biológicas, incluidas las membranas biológicas de las células no adipocitarias. La dislipidemia se asocia generalmente a la presencia en exceso en dichas membranas biológicas de ácidos grasos saturados, más particularmente ácidos grasos de cadenas largas saturadas y/o de esteroides. La cantidad de ácidos grasos saturados y/o esteroides se considera en particular excesiva, por ejemplo, cuando al alterar la plasticidad membranal provoca un disfuncionamiento celular.

30 En un modo de realización preferido de la invención, dicho compuesto: i) no permite la producción o introducción de fosfolípidos di-insaturados en la membrana de las células tratadas, típicamente no restaura, en la célula tratada, una composición de ácidos grasos de los fosfolípidos membranales comparable a la de los fosfolípidos membranales de una célula correspondiente no lipo-intoxicada, ii) no constituye una fuente de ácido oleico para la célula tratada, típicamente una fuente de ácido oleico capaz de restaurar la plasticidad membranal de la célula tratada, y preferiblemente iii) no induce la movilización cálcica intracelular y/o no es degradado por las lipasas.

35 La descripción se refiere a un compuesto cuya cabeza polar es de fórmula (I):



en la que:

A es un átomo de nitrógeno o de oxígeno, preferiblemente un átomo de oxígeno,

n es 2 o 3, preferiblemente n es 2, y

40 R es cualquier grupo químico,

para uso en prevenir o tratar una dislipidemia en un sujeto, típicamente una dislipidemia tal como se ha definido anteriormente.

Dichos compuestos para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de una dislipidemia están descritos en los documentos WO 2012/054527, WO 2010/149170 y EP0104043.

45 Los compuestos según la invención: i) que no permiten la producción de fosfolípidos di-insaturados, o que no provocan la introducción de dichos fosfolípidos en la membrana de las células tratadas, típicamente que no restauran, en la célula tratada, una composición de ácidos grasos de los fosfolípidos membranales comparable a la

de los fosfolípidos membranales de una célula correspondiente no lipo-intoxicada, y ii) que no constituyen una fuente de ácido oleico para la célula tratada, típicamente una fuente de ácido oleico capaz de restaurar la plasticidad membranal de la célula tratada, se seleccionan entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y N,N-dietanololeamida (por ejemplo, contrariamente al ácido 1-oleoil-lisofosfatídico o LPA).

5 Los compuestos según la invención que no inducen la movilización cálcica intracelular son monooleato de manida y oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo. Contrariamente al OAG, que es una molécula de referencia que induce una movilización cálcica celular (Marin & Cooper, 2006) o alternativamente, al 1-oleoilglicerol y al 2-oleoilglicerol (Iwasaki *et al.*, 2008), estos compuestos son particularmente ventajosos porque presentan un riesgo de toxicidad menor por procesos perjudiciales que dependen del nivel de calcio intracelular, tales como la proliferación o la apoptosis (Stutzmann GE *et al.*, 2011).

El compuesto según la realización preferido en el sentido que resiste la acción de degradación por las lipasas es N,N-dietanololeamida.

15 La invención se refiere además a un compuesto, tal como se describe en la presente memoria, para uso en la prevención o tratamiento del síndrome metabólico, típicamente al menos un síntoma o anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente al menos dos o tres síntomas, seleccionándose dichos síntomas entre resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática, preferiblemente entre resistencia a la insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática. Un objeto particular se refiere a un compuesto según la invención para usar en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Un compuesto según la invención particularmente preferido es el monooleato de manida, del que los inventores han demostrado, con ayuda de células beta-pancreáticas de mamíferos lipo-intoxicadas por ácidos grasos saturados, que es ventajosamente capaz de aumentar la secreción de insulina, en sujetos que padecen lipo-intoxicación y/o diabetes tipo 2 favoreciendo en ellos la maduración de la proinsulina en insulina.

La invención se refiere además a 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. Un objeto particular se refiere típicamente a 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).

La invención se refiere igualmente al uso de dicha composición para prevenir o tratar, en un sujeto, una dislipidemia, típicamente una dislipidemia en las membranas biológicas, incluyendo las membranas biológicas de las células no-adipocitarias, en particular una dislipidemia asociada a la presencia en exceso en dichas membranas biológicas de ácidos grasos, más particularmente de ácidos grasos de cadenas largas saturadas y/o *trans*, y/o esteroides. También se refiere al uso de dicha composición para prevenir o tratar, en un sujeto, el síndrome metabólico, típicamente al menos un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente varios síntomas (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5); preferiblemente para prevenir o tratar la diabetes tipo 2. Los usos descritos también se pueden llevar a cabo ventajosamente en combinación con al menos otro compuesto terapéuticamente activo (reconocido como tal por los expertos en la técnica y diferente de los compuestos según la invención), en particular en el tratamiento del síndrome metabólico, típicamente de al menos un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico y/o de la diabetes tipo 2.

Descripción detallada

Los inventores han demostrado que los AGS que provienen de una fuente exógena (alimentación) o endógena (hipoxia o alteración, por mutación, de las etapas de desaturación de los ácidos grasos) se acumulaban 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.

5 La cepa QM (Petschingg *et al.*, 2009), en la que han sido delecionados 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 C 18:1, 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
10 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) y de colesterol en las membranas de orgánulos intracelulares, sobre la formación de vesículas secretoras. Esta lipo-intoxicación (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 de 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
15 observaron una alteración del conjunto de la vía de secreción debida a la lipo-intoxicación. 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 respuesta 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.
25

Schneider *et al.*, (1999) observaron que las membranas del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi están constituidas muy 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 membranal 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 deleción del gen GCS1 provoca una fragmentación del aparato de Golgi y una perturbación del tráfico vesicular pos-Golgi (Poon *et al.*, 2001), fenómenos que los inventores han podido observar ellos mismos en el modelo de levadura *hem1Δ*, es decir, en condiciones de acumulación de AGS (véase Payet *et al.*, 2013).
35

Las proteínas de la familia Arf-GAP1 responden a la curvatura membranal siendo adsorbidas en la superficie membranal por medio de un resto específico denominado Arf-GAP1 *Lipid Packing Sensor* (ALPS; (Bigay *et al.*, 2005)). Concretamente, el resto ALPS no reconoce la curvatura membranal *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 membranal (Bigay *et al.*, 2005). Los inventores fueron capaces de demostrar que los elevados niveles de FL saturados en condiciones de lipo-intoxicación están asociados a un aumento del empaquetamiento de lípidos en las membranas (Deguil *et al.*, 2011) y que este aumento altera el reclutamiento por el 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.
40
45
50
55

Las lipo-intoxicaciones celulares provocadas por los inventores dieron como resultado, *in vitro*, una exposición a una fuente exógena de ácidos grasos exclusivamente en forma saturada (lipo-intoxicación “exógena”) o, alternativamente, una incapacidad intrínseca de la célula para producir formas insaturadas de ácidos grasos (lipo-intoxicación “endógena”).
60

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 lipo-intoxicadas 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 presentes en exceso y/o mal metabolizados (es decir, esterificados) tóxicos y de corregir el conjunto de fenómenos perturbados. Así descubrieron moléculas capaces, en particular, de restaurar una funcionalidad celular (restaurando, por ejemplo, la fluidez membranal) 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 mamífero, en particular en las células β -pancreáticas de rata (linaje BRIN-BD11). Además, los inventores han podido demostrar que los compuestos de interés presentan una influencia muy limitada sobre los fenómenos celulares, tales como la movilización cálcica responsable de la inducción de fenómenos de proliferación celular y apoptosis. Presentan así una toxicidad menor en comparación con los compuestos, tal como el OAG, induciendo o favoreciendo, por el contrario, dicha movilización cálcica celular. Asimismo, ciertos compuestos han demostrado ser particularmente eficaces en restaurar la conversión de la pro-insulina en insulina en células β -pancreáticas de mamífero, en particular en células β -pancreáticas de ratón (linaje MIN6).

La invención se refiere así a 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 20, típicamente 18, átomos de carbono y que tiene 1 a 6, por ejemplo 3, insaturaciones en configuración *cis* (identificado en la presente memoria como "compuesto de interés") para su uso en la prevención o el tratamiento de una dislipidemia en un sujeto.

El sujeto implicado es un animal, típicamente un mamífero, por ejemplo, un mamífero seleccionado entre 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 cuya prevención 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 es típicamente responsable de la intoxicación (lipo-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.

En un modo de realización particular de la invención, la dislipidemia está asociada a la presencia en el sujeto de un síndrome metabólico, típicamente al menos un síntoma del síndrome metabólico, preferiblemente al menos dos o tres síntomas, seleccionándose dichos síntomas entre resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática, preferiblemente entre resistencia a la insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática.

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 "lipo-intoxicación", por ejemplo de lipo-intoxicación de origen exógeno o, alternativamente, de lipo-intoxicación de origen endógeno (por ejemplo, hipóxica), 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.

Una lipo-intoxicación renal se manifiesta, por ejemplo, cuando ácidos grasos saturados, en particular de cadena larga, se almacenan en las células del riñón y las células del túbulo contorneado proximal. Dicho almacenamiento

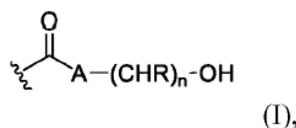
conduce a una inflamación del túbulo intersticial y a una fibrosis, incluso a una insuficiencia renal y a la muerte del sujeto afectado en los casos más graves. A modo de ejemplo, una lipo-intoxicación del páncreas se diagnostica típicamente por el almacenamiento en el seno de los fosfolípidos membranales de ácidos grasos saturados, en particular de cadena larga, en las células β -pancreáticas.

5 A nivel celular, una lipo-intoxicación se diagnostica típicamente por la detección de una modificación del contenido de ácidos grasos de los fosfolípidos (FL) de las membranas biológicas (principalmente a nivel de las especies fosfolípicas 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
10 purificación de sus fosfolípidos y del análisis de estos últimos por espectrometría de masas (Deguil *et al.*, 2011).

Además, esta lipo-intoxicación celular se puede manifestar por la inducción de la respuesta UPR (“*Unfolded Protein Response*”). Tal como lo demuestra la parte experimental, es posible, *in vitro*, detectar y medir esta respuesta 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,
15 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 lipo-intoxicación se puede detectar y medir cuantificando la proporción de formas activas de ciertas proteínas claves en esta cascada de episodios celulares. Este es el caso de la proteína eIF2 α cuya abundancia de la forma activa fosforilada es
20 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 & Morgan, 2011).

En el contexto de la presente invención, la respuesta 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 respuesta “UPR”, como se explicó anteriormente.
25

Un compuesto descrito en la presente memoria es un compuesto tal como se ha definido anteriormente, cuya cabeza polar es de fórmula (I):



en la que:

30 A es típicamente un átomo de oxígeno o un grupo NR₁, siendo R₁ = H o un alquilo de C₁-C₆ opcionalmente sustituido con un OH, y A es preferiblemente un átomo de oxígeno o NH o NCH₃ o NCH₂CH₂OH e incluso más preferiblemente A es un átomo de oxígeno,

n = 2 o 3, preferiblemente n = 2, y

R es cualquier grupo químico y puede ser diferente de un grupo (CHR) a otro.

35 En la fórmula (I), el enlace interrumpido por zigzags representa el enlace entre la cabeza polar y la cadena de carbonos del ácido graso insaturado, siendo el grupo C=O de fórmula (I) el C=O del ácido graso insaturado.

Preferiblemente, R es un grupo que comprende únicamente átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno.

Preferiblemente, R es un grupo saturado que comprende únicamente átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno.

40 Preferiblemente, el radical (CHR)_n-OH es un derivado de glicerol, de eritritol o de un monosacárido, tal como manosa.

En la presente descripción, cada residuo de hidroxilo puede estar independientemente fosfatado.

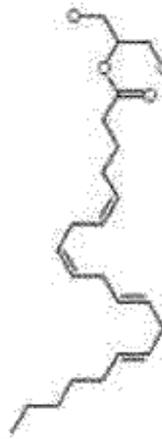
Ejemplos de compuestos descritos en la presente memoria como utilizables para prevenir o tratar una dislipidemia se identifican a continuación:



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



5 1-oleoil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido 1-oleoil-lisofosfatídico o **LPA**),



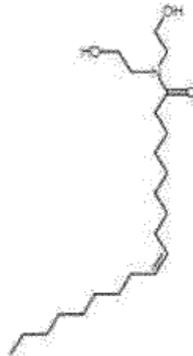
2-araquidonoilglicerol (**2-AG**),



monooleato de manida

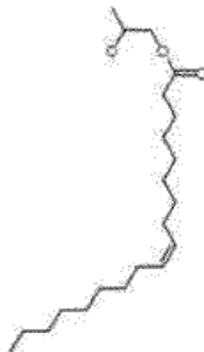


oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo,

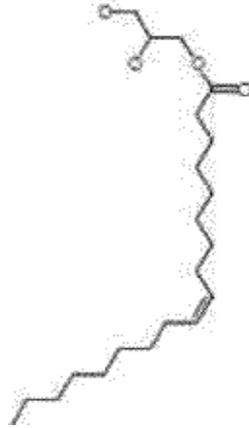


5

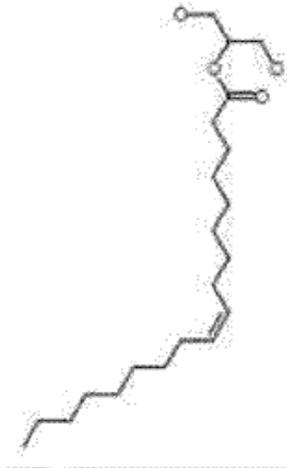
N.N-dietanololeamida,



monooleato de propilenglicol,



1-oleoil-glicerol,



2-oleoil-glicerol,

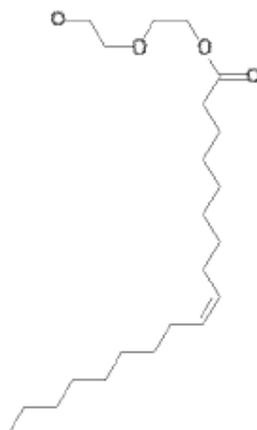


5

monoéster del ácido oleico con triglicerol,



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



monooleato de dietilenglicol.

5 Los compuestos descritos como utilizables para prevenir o tratar una dislipidemia se seleccionan, por ejemplo, entre 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG), 1-oleoil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido 1-oleoil-lisofosfatídico o LPA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, N,N-dietanololeamida, monooleato de propilenglicol, monoéster del ácido oleico con triglicerol y éster (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metílico del ácido (Z)-9-octadecenoico.

10 Los compuestos usados según la invención para prevenir o tratar una dislipidemia, en particular una lipo-intoxicación asociada a una enfermedad metabólica, tal como la diabetes tipo II y/o una lipo-intoxicación hipóxica, se eligen entre monooleato de manida, oleato de 3 hidroxil-2,2-bis(hidroximetil)propilo y N,N-dietanololeamida.

15 Un compuesto de interés particularmente preferido para prevenir o tratar una dislipidemia, en particular en el contexto de la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad metabólica, y/o un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente de la diabetes tipo 2, es el monooleato de manida.

20 Los compuestos de interés se usan en el contexto de la invención para prevenir o tratar las dislipidemias, típicamente restaurando la fluidez de las membranas biológicas. Una característica ventajosa de estos compuestos es que, a diferencia de los ácidos grasos insaturados 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. Además, son con preferencia ventajosamente capaces de restaurar la funcionalidad de una célula lipo-intoxicada así como, si fuera necesario, la del órgano implicado.

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

25 (i) restaura el crecimiento de un mutante *hem1Δ* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* lipo-intoxicado,

(ii) reduce o suprime la respuesta UPR (“*Unfolded Protein Response*”),

(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 lipo-intoxicada.

5 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* lipo-intoxicado y/o reducir o suprimir la respuesta UPR (“*Unfolded Protein Response*”), típicamente la respuesta UPR inducida por una lipo-intoxicación (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.

10 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 lipo-intoxicadas.

15 Entre los compuestos descritos en la presente memoria, algunos actúan directamente sobre el contenido lipídico, es decir, sobre la composición de ácidos grasos, de los fosfolípidos presentes en el seno de las membranas celulares. Ejemplos de tales compuestos son 1-oleoil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido 1-oleoil-lisofosfatídico o LPA) y monooleato de propilenglicol. Los compuestos descritos restauran la fluidez y, por tanto, la funcionalidad membranal sin restablecer una composición normal de fosfolípidos di-insaturados en el seno de las membranas celulares. Un ejemplo preferido de dicho compuesto es 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG). Ejemplos incluso más preferidos son monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y N,N-dietilanololeamida.

20 En un modo de realización preferido de la invención, los compuestos se utilizan para prevenir y/o tratar una patología elegida entre el síndrome metabólico y/o un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente para prevenir o tratar la diabetes tipo 2.

25 En un modo de realización particular de la invención, los compuestos se utilizan para prevenir y/o tratar el síndrome metabólico, típicamente al menos un síntoma del síndrome metabólico, preferiblemente al menos dos o tres síntomas, seleccionándose dichos síntomas entre resistencia a la insulina, deficiencia de insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática, preferiblemente entre resistencia a la insulina, hiperglucemia (típicamente glucemia en ayunas \geq aproximadamente 5,5 mM), hipercolesterolemia, en particular hipercolesterolemia caracterizada por una
30 baja concentración de colesterol HDL (típicamente $<$ aproximadamente 1 mM para los hombres y $<$ aproximadamente 1,3 mM para las mujeres), hipertrigliceridemia (típicamente TG \geq aproximadamente 1,7 mM), hipertensión (típicamente presión arterial (PA) \geq aproximadamente 130/820 mm de Hg), insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática.

35 Como se explicó anteriormente, para la diabetes tipo 2, los enfoques terapéuticos actuales se dirigen a los parámetros que intervienen aguas abajo de las dislipidemias iniciales. Aunque validados en contextos fisiológicos en el laboratorio, estos tratamientos adolecen de una falta de eficacia asociada a la perturbación global de los mecanismos membranales observados en el caso de lipo-intoxicación instalados que se manifiestan en particular por una fluidez membranal alterada o ineficaz (en cuanto a la célula considerada ya no es funcional). En particular, actualmente no existe ninguna molécula o compuesto que permita tratar las dislipidemias que afectan a las células incapaces de sintetizar lípidos neutros, en particular las células no adipocitarias.

40 En un modo de realización preferido de la invención, al menos un compuesto, tal como se describe en la presente memoria, se usa para prevenir y/o tratar la diabetes tipo 2. El monooleato de manida es un ejemplo de un compuesto utilizado de manera preferida para prevenir y/o tratar la diabetes tipo 2.

45 Este al menos un compuesto 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 o el tratamiento de la diabetes tipo 2, seleccionándose dicho compuesto distinto preferiblemente entre biguanida, glitazona, sulfamida hipoglucemiante, glinida, inhibidor de DPP4, incretinomimético e inhibidor de la α -glucosidasa.

50 Otro objeto de 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 según la invención.

Un objeto particular se refiere típicamente a una composición farmacéutica que comprende al menos otro dicho compuesto según la invención, al menos otro compuesto (diferente de los compuestos utilizados en el contexto de la invención para prevenir o tratar una dislipidemia sin inducir toxicidad en las células no adipocitarias) terapéuticamente activo (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 del síndrome metabólico y/o de la diabetes tipo 2 (por ejemplo, tales como los descritos en la presente memoria).

5 La invención se refiere igualmente a una composición, tal como se describe en la presente memoria, para uso en prevenir o tratar una dislipidemia, típicamente una patología elegida entre síndrome metabólico y/o un síntoma o una anomalía característico del síndrome metabólico, preferiblemente para prevenir o tratar la diabetes tipo 2.

10 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 ser administrados "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 o las composiciones según la invención se pueden administrar de diferentes maneras y en diferentes formas.

15 Así, en un modo de realización típico, el o los compuestos se administran al sujeto, juntos o por separado, y el o los compuestos 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.

20 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.

25 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.

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.

30 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.

35 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.

40 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
45 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.

50 También se describen en la presente memoria métodos de prevención o tratamiento de una dislipidemia en un sujeto, que comprenden la administración a un sujeto que padece una dislipidemia o susceptible de desarrollar una dislipidemia, de un compuesto o de una composición de interés, tales como los descritos en la presente memoria para prevenir o tratar dicha dislipidemia.

55 La descripción se refiere además a los métodos de prevención o tratamiento en un sujeto que padece una patología seleccionada entre síndrome metabólico, síntoma o anomalía característico del síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Todos estos métodos incluyen una etapa de administración a un sujeto que padece dicha patología, o que es susceptible de desarrollar dicha patología, de un compuesto o de una composición de interés, tales como lo descritos en la presente memoria para prevenir o tratar dicha patología.

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

Leyendas de las figuras

Figura 1: Vía de secreción y plasticidad membranar.

5 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 ácidos grasos saturados (AGS) en los FL disminuye la fluidez membranar, mientras que los FL que contienen ácidos grasos insaturados (AGI) forman membranas más fluidas.

15 El efecto beneficioso 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 oleato 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 lipo-intoxicadas.

20 A) Estructuras moleculares del ácido oleico, del OAG y del LPA. B) Restauración del crecimiento (después de 3 días) de levaduras *hem1Δ* cultivadas en condiciones de acumulación de AGS, en presencia de concentraciones crecientes de ácido oleico, OAG y LPA.

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

25 Se depositaron gotitas de 5 μ L 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.

Figura 5: El OAG y el LPA reducen la respuesta UPR en levaduras lipointoxicadas.

30 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 levadura como ha sido descrito por Pineau *et al.*, (2009). Durante una inducción de la respuesta 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 levadura se cultivó en un medio líquido que inducía la acumulación de AGS sin otra adición (\emptyset), o en el mismo medio suplementado con 200 μ M de ácido oleico, de OAG o de LPA, como se ha indicado.

Figura 6: El OAG previene la apoptosis de las células β -pancreáticas en presencia de ácidos grasos saturados, reduciendo la proporción de inducción de la UPR.

40 Las células β -pancreáticas BRIN-BD11 se cultivaron en condiciones de control o en presencia de una fuente exógena de ácido graso saturado (ácido palmítico, 200 μ M), como ha sido descrito por Dhayal & Morgan (2011), con el fin de generar condiciones de lipo-intoxicación con o sin adición de OAG. A) La proporción de células muertas se estimó en ausencia (control) o en presencia de ácido palmítico, para concentraciones crecientes de OAG. B) Las tasas de fosforilación de eIF2 α se analizaron igualmente en las diferentes condiciones por transferencia de Western, en presencia o ausencia (\emptyset) de OAG, y se normalizaron a las cantidades de eIF2 α totales. Estando correlacionada la proporción de fosforilación con la intensidad de la respuesta UPR, este experimento demuestra que el OAG reduce la UPR inducida por la acumulación de ácido palmítico.

Figura 7: El oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y el monooleato de manida no inducen la movilización cálcica.

50 Las células epiteliales humanas, CFBE, se cargaron con una sonda cálcica fluorescente y luego se expusieron a 100 μ M de OAG, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, monooleato de manida o N,N-dietanololeamida. A continuación, se registraron las evoluciones de la intensidad de fluorescencia, asociadas a los movimientos cálcicos

intracelulares (véase Vachel *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos indican que el oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y el monooleato de manida ejercen una influencia muy débil sobre el vaciado de las reservas cálcicas celulares (en otras palabras, no inducen la movilización cálcica celular) con relación al OAG, y que por tanto estos compuestos presentan riesgos muy limitados de toxicidad celular.

5 **Figura 8: Los oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, monooleato de manida y N,N-dietanololeamida previenen la apoptosis de las células β -pancreáticas en presencia de ácidos grasos saturados.**

10 Las células β -pancreáticas BRIN-BD11 se cultivaron en presencia de una fuente exógena de ácido graso saturado (ácido palmítico, 200 μ M), como han descrito Dhayal & Morgan (2011), con el fin de generar condiciones de lipo-intoxicación, antes de la adición de oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo, monooleato de manida o N,N-dietanololeamida. Completando los datos de la figura 6, estos resultados indican que los tres compuestos de interés previenen la muerte de las células β -pancreáticas inducidas por lipo-intoxicación.

15 **Figura 9: El monooleato de manida restaura la maduración de la pro-insulina en condiciones de lipo-intoxicación de células β -pancreáticas de mamífero.**

15 Se cultivaron células β -pancreáticas MIN6 en condiciones de control (\emptyset) o, alternativamente, en presencia de una fuente exógena de ácido palmítico a 400 μ M (P), durante 48 horas, como han descrito Boslem *et al.* (2011), con el fin de generar condiciones de lipo-intoxicación. Durante las últimas 24 horas de cultivo, se añadieron o no 200 μ M de OAG, de LPA o de monooleato de manida, como se había mencionado. En estas condiciones, las muestras de proteína se sometieron a una transferencia de Western y los resultados obtenidos indican que solo el monooleato de manida restaura la maduración de la pro-insulina en insulina en condiciones de lipo-intoxicación.

20 **Figura 10: La N,N-dietanololeamida resiste la actividad hidrolítica de las lipasas.**

Se sometieron 15 μ mol de OAG y de N,N-dietanololeamida (+), o no (-), a una exposición de 10 U de de lipasas durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, las especies lipídicas se extrajeron de las muestras antes de separarlas por cromatografía en capa fina. Se anotan las especies moleculares de interés y los resultados indican que, contrariamente al OAG, la N,N-dietanololeamida resiste la hidrólisis por lipasas.

25 **Ejemplos**

A/ Cepas de levaduras y linajes de células de mamíferos

30 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 “*Unfolded Protein Response*” (UPR).

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

Además, los ensayos de movilización cálcica se realizaron en células epiteliales humanas, CFBE, y los experimentos de maduración de la insulina se realizaron en un linaje β -pancreático de muridos, MIN6.

35 **Tabla 1: Cepas de levaduras utilizadas**

Cepa	Genotipo	Origen
<i>hem1Δ</i>	<i>MATα trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	FY1679α x FYHO4
QM (H1246 W303)	<i>MATα are1::HIS3 are2::LEU2 dga1::KanMX4 lro1::TRP1 ADE2 met ura3</i>	ScanBi Ltd., Alnarp, Suecia
WT (G175 W303)	<i>MATα ADE2 MET his3 leu2 ura3 trp1</i>	ScanBi Ltd., Alnarp, Suecia

B/ Lipo-intoxicaciones de levaduras *hem1Δ*

40 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 μ g/mL). La lipo-intoxicación por ácidos grasos saturados (AGS) es provocada 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

5 suplementado con ergosterol a 80 µg/mL para compensar la disminución de esteroles obtenida en esta condición). La lipo-intoxicación puede ser inducida en medio sólido YPG⁺ + agar-agar al 2% (m/v) transfiriendo 3500 células (*hem1Δ* procedentes de un precultivo en YPG⁺)/cm² o, alternativamente, en medio líquido inoculando 2.10⁶ células/mL de YPG⁺. Clásicamente, los efectos de la lipo-intoxicación 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 lipo-intoxicación 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/ Lipo-intoxicaciones de células β-pancreáticas de rata por ácido palmítico

1) Preparación de los reactivos lipídicos:

10 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 ácido palmítico 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:

20 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 ternero fetal (STF), L-glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. 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 del 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:

35 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 luego 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-fosfoeIF2α (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-eIF2α 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 eIF2α se efectúa con el sistema de análisis *Fluor-S Multi-imager* combinado con el programa informático Quantify One (Biorad UK Ltd).

45 D/ Seguimiento de la maduración de la insulina (véase la Figura 9)

De la misma manera que se ha descrito anteriormente para la lipo-intoxicación de células BRIN-BD11, el linaje MIN6 se cultiva en un medio de DMEM-alto contenido de glucosa (6 mM) completo, suplementado con 10% (v/v) de suero de ternero fetal (STF), HEPES 15 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, y la lipo-intoxicación se induce por exposición a ácido palmítico 400 µM, acoplado a la BSA (0,92% (p/v) final), durante 48 horas, con o sin adición de compuesto de interés (véase Boslem *et al.*, 2011). A continuación, se recogen las células y se realiza una transferencia de Western como se ha indicado anteriormente, usando anticuerpos anti-insulina con el fin de seguir la maduración de la pro-insulina en insulina.

E/ Ensayo de movilización cálcica (véase la Figura 7)

55 El linaje de células epiteliales humanas, CFBE, se cultiva en una caja con fondo de vidrio en un medio MEM + GlutaMAX™ -1 (αMEM; Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (STF), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0,5 µg/mL de puromicina. Las células se cargaron inicialmente con 3 µM de sonda

cálcica fluorescente éster fluo-4-acetoximetílico (FluoProbes®) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se registra la movilización cálcica por la adquisición de las evoluciones de intensidad de fluorescencia, para una zona de interés, gracias a un microscopio invertido Zeiss Axio observer Z1, para las secuencias de estimulación de láser de 250 ms, durante 4 minutos. Los datos recogidos se interpretan entonces utilizando el programa informático Carl Zeiss AxioVision Release 4.8.2 y el módulo de adquisición fisiológica asociado. Finalmente se normalizan los perfiles de intensidad dividiendo la intensidad en cada píxel en un momento t (F) por la intensidad de fluorescencia en ese píxel antes de la estimulación (F_0). Las imágenes $((F-F_0)/F_0)$ así obtenidas permiten obtener un perfil de intensidad/movilización cálcica, sobre el conjunto del registro (véase Vachel *et al.*, 2013).

10 F/ Restauración(es) del crecimiento

1) **Cribado de compuestos:** Después de la inducción de una lipo-intoxicación por AGS (para *hem1Δ* cultivadas en un medio sólido) se depositan en la superficie del agar-agar gotas de 5 μ L 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 lipo-intoxicación por AGS (para *hem1Δ* en medio líquido) se añaden diferentes compuestos a los cultivos a una concentración inicial de 200 μ M. 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 ($DO_{600\text{ nm}}$) corresponde a $2 \cdot 10^7$ células/mL.

G/ 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 cm^2 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 μ L 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.

35 H/ Extracción de lípidos totales

La cepa *hem1Δ* se cultiva en medio líquido YPG^A, YPG⁺ o YPG⁺ + 200 μ M del compuesto de ensayo, en condiciones aerobias, bajo agitación y a 28°C durante 7 horas, a partir de una concentración celular inicial de $2 \cdot 10^6$ células/mL. Al final del cultivo, se recogen 10^8 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 μ L de bolas de vidrio (\varnothing 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.

I/ 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 μ L de mezcla Mix⁻ (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.

J/ Ensayo de desencadenamiento de la UPR

- 10 La cepa *hem1 Δ* transformada por el plásmido pPW344 [2 μ URA3 4xUPRE-*LacZ* (Patil et al., 2004)] se cultiva en medio líquido YPG^A, YPG o YPG + 200 μ M 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
- 15 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 μ L de dodecil-sulfato sódico (SDS) al 0,1% (v/v) y 200 μ L de cloroformo, y después se agita con vórtice en dos secuencias sucesivas de 30 segundos. Después de decantación, 400 μ L (volumen V) de la solución así obtenida se transfieren a un tubo de vidrio para hemolisis y
- 20 después se completan con 600 μ L de tampón Z. Se añaden entonces 200 μ L 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 μ L de Na₂CO₃ 1 M. Finalmente, después de haber centrifugado las muestras durante 5 minutos a 800 g y recogidos los líquidos
- 25 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

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.
- 5 - 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 Apr 1;435(1):267-76.
- 10 - 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.
- 15 - 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.
- 20 - 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.
- 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.
- 25 - 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.
- 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 May 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.
- 30 - Iwasaki Y, Saito O, Tanabe M, Inayoshi K, Kobata K, Uno S, Morita A, Watanabe T. Monoacylglycerols activate capsaicin receptor, TRPV1. *Lipids.* 2008 Jun; 43(6):471-83.
- 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.
- 35 - 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.
- Kincaid MM, Cooper AA (2007) Eradicate ER Stress or Die Trying. *Antioxid Redox Signal.*
- 40 - 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.
- 45 - 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.
- Martin AC, Cooper DM. Capacitative and 1-oleyl-2-acetyl-sn-glycerol-activated Ca²⁺ entry distinguished using adenyllyl cyclase type 8. *Mol Pharmacol.* 2006 Aug; 70(2):769-77.

- Patil CK, Li H, Walter P. Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 2004 Aug;2(8):E246.
- Payet LA, Pineau L, Snyder EC, Colas J, Moussa A, Vannier B, Bigay J, Clarhaut J, Becq F, Berjeaud JM, Vandebrouck C, Ferreira T. Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties. *Traffic.* 2013 Sep 6.
- 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.
- 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.*
- Pineau L, Ferreira T (2010) Lipid-induced ER stress in yeast and β cells: parallel trails to a common fate. *FEMS Yeast Research.*
- 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 Dec 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 Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Mol Biol Cell.* 2006 Apr; 17(4): 1845-58.
- 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 U S A.* 1999 Dec 7;96(25): 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.
- Stutzmann GE, Mattson MP. Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2011 Sep; 63(3):700-27.
- 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.
- 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 Ca²⁺ influx and CFTR activity in G551D and F508del-CFTR expressing cells. *J. Cyst. Fibros.* 2013 Dec;12(6):584-91.

35

REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y N,N-dietanololeamida para un uso en la prevención o el tratamiento en un sujeto de síndrome metabólico, diabetes tipo II o esteatosis hepática.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, para un uso en la prevención o tratamiento del síndrome metabólico, típicamente al menos un síntoma del síndrome metabólico seleccionado entre resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, insuficiencia cardíaca y esteatosis hepática.
- 10 3. Compuesto según la reivindicación 1, para un uso en la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2 en combinación con un compuesto distinto utilizado convencionalmente en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 2, seleccionándose preferiblemente dicho compuesto distinto entre biguanida, glitazona, sulfamida hipoglucemiante, glinida, inhibidor de DPP4, incretinomimético e inhibidor de α -glucosidasa.
4. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto es un animal, típicamente un mamífero, preferentemente un ser humano.
- 15 5. Composición que comprende un compuesto seleccionado entre monooleato de manida, oleato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo y N,N-dietanololeamida para un uso en la prevención o el tratamiento en un sujeto de síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y/o esteatosis hepática.
6. Composición para uso según la reivindicación 5, seleccionándose dicha composición entre una composición farmacéutica, un alicamento y un suplemento alimenticio.

20

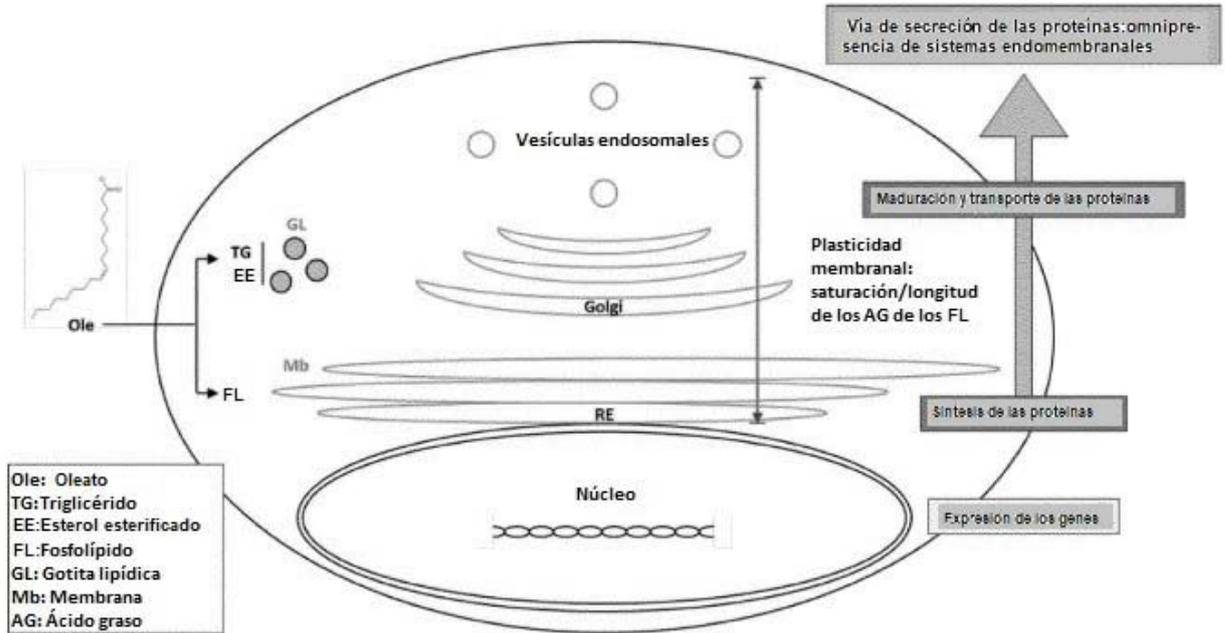


FIGURA 1

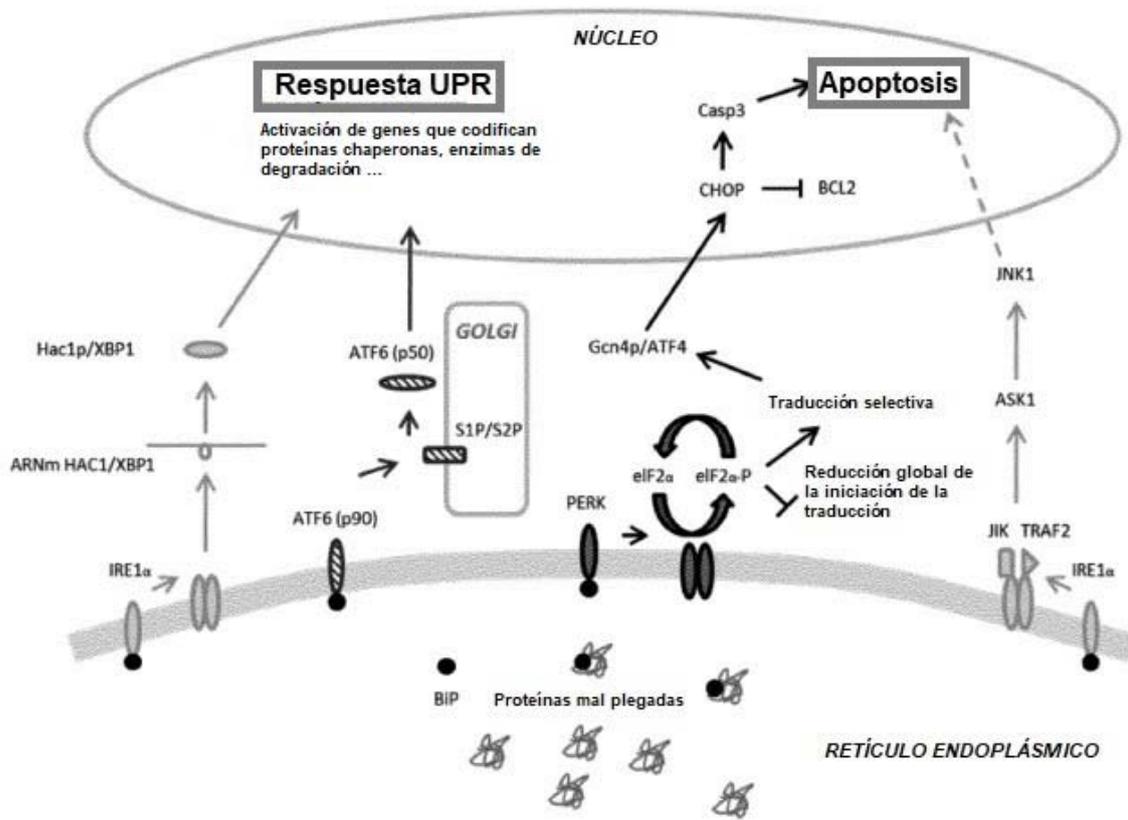


FIGURA 2

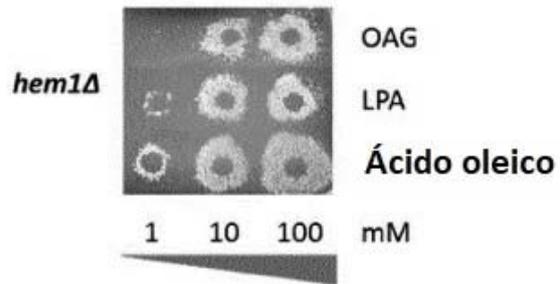
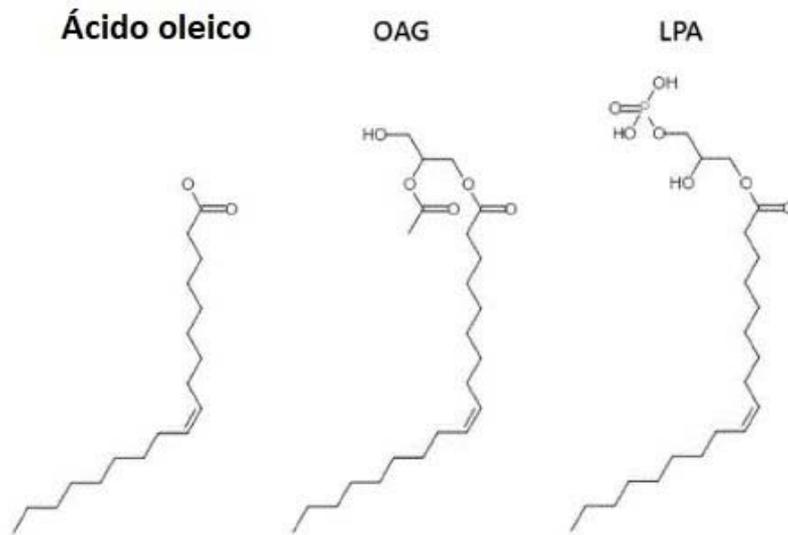


FIGURA 3

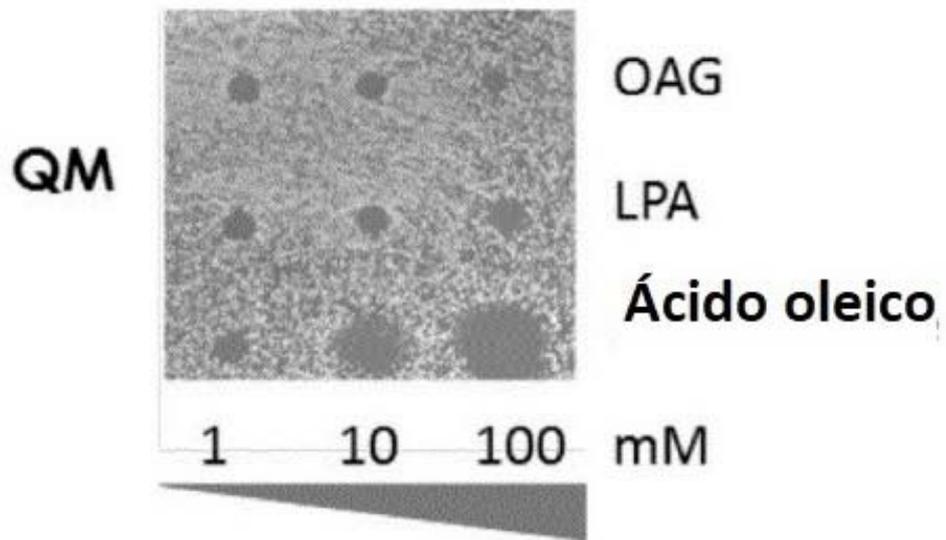


FIGURA 4

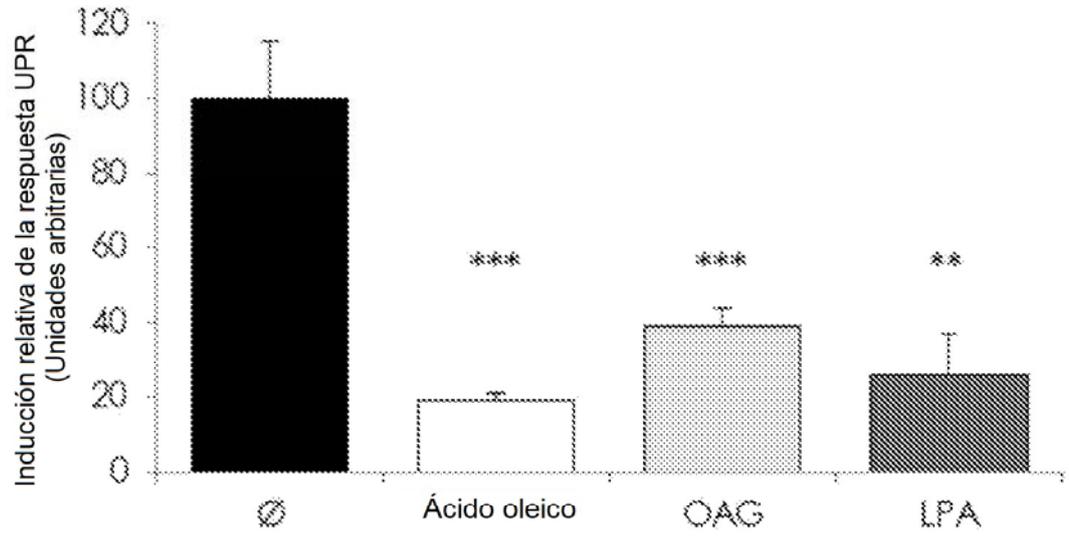


FIGURA 5

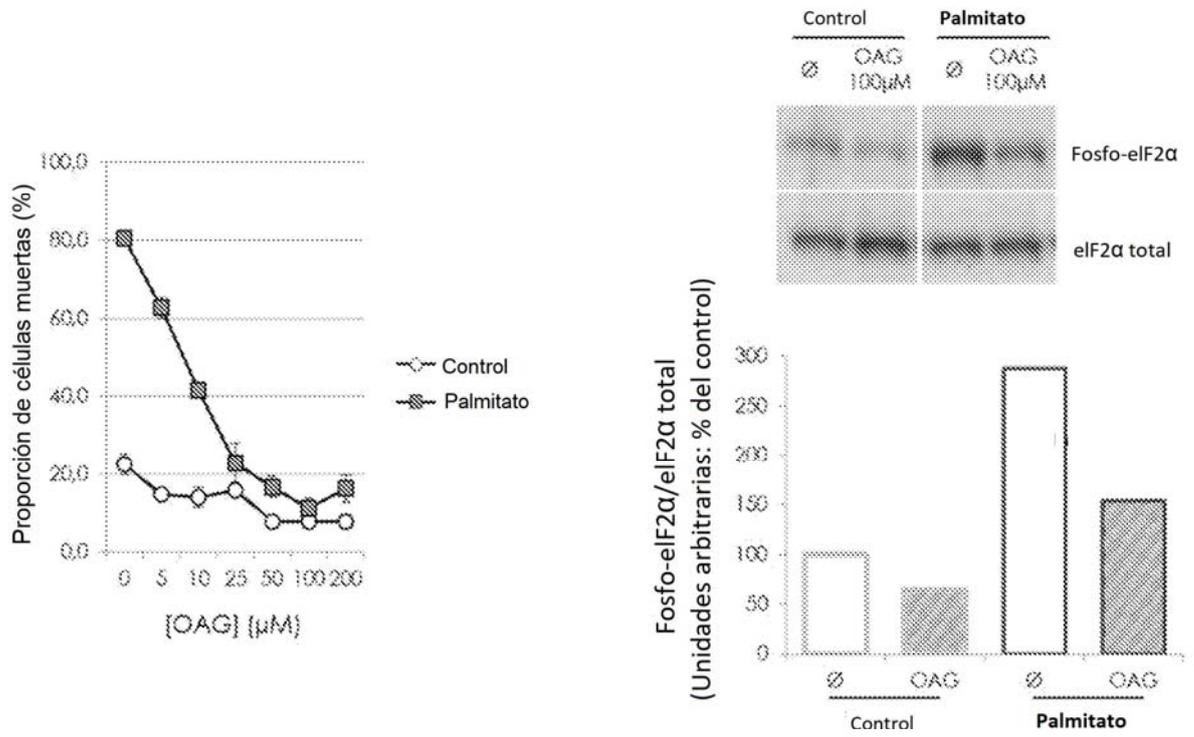


FIGURA 6

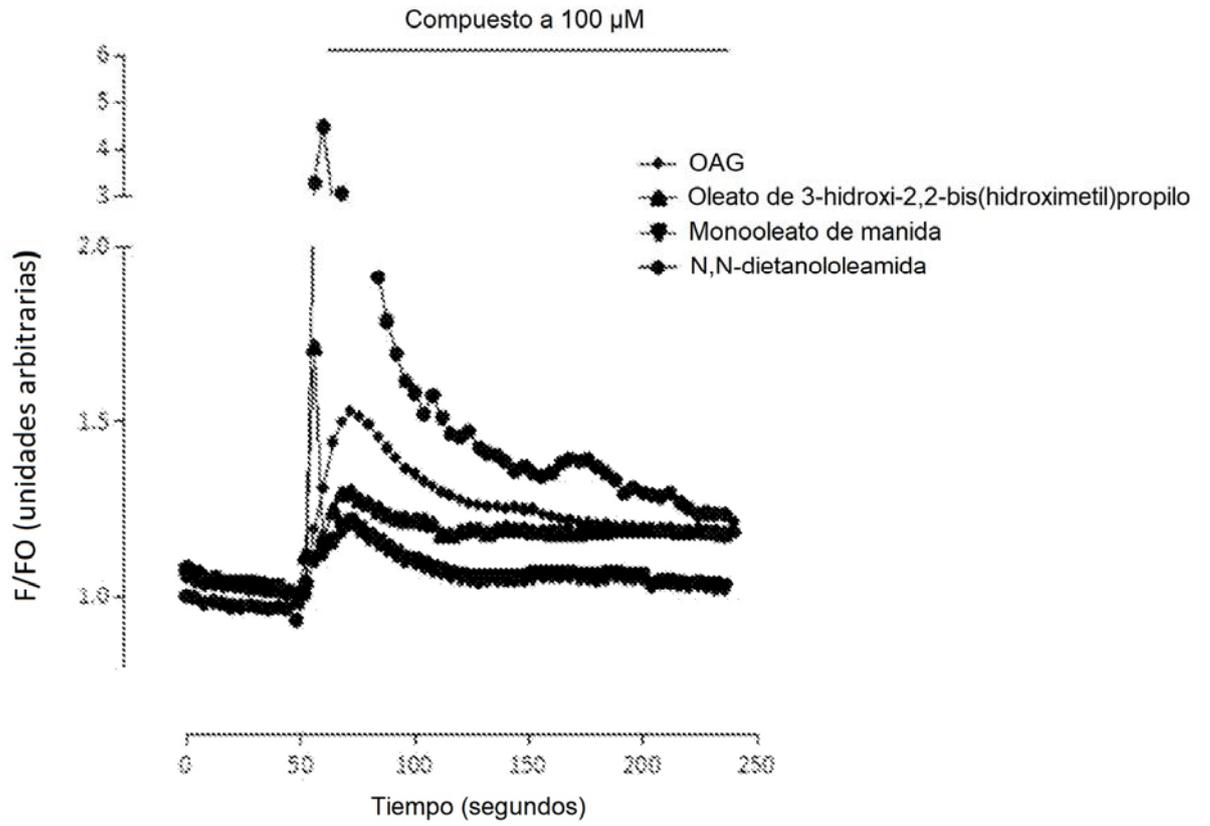


FIGURA 7

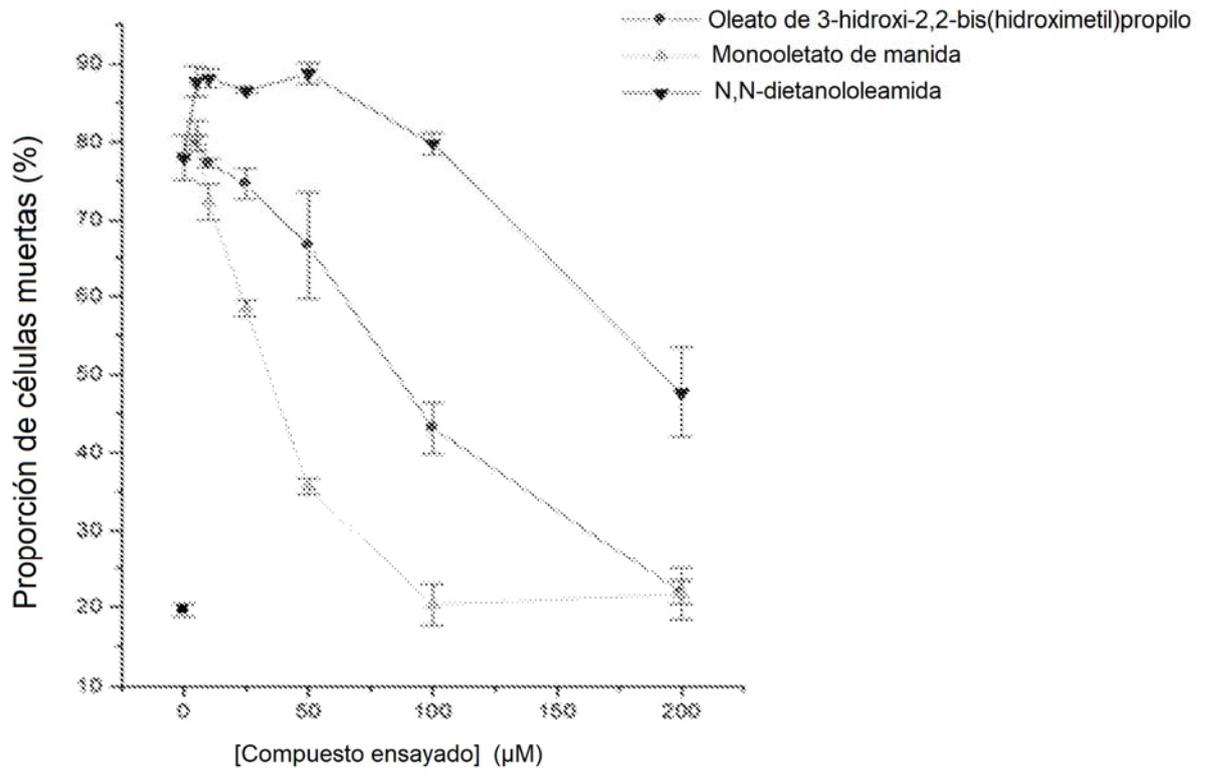


FIGURA 8

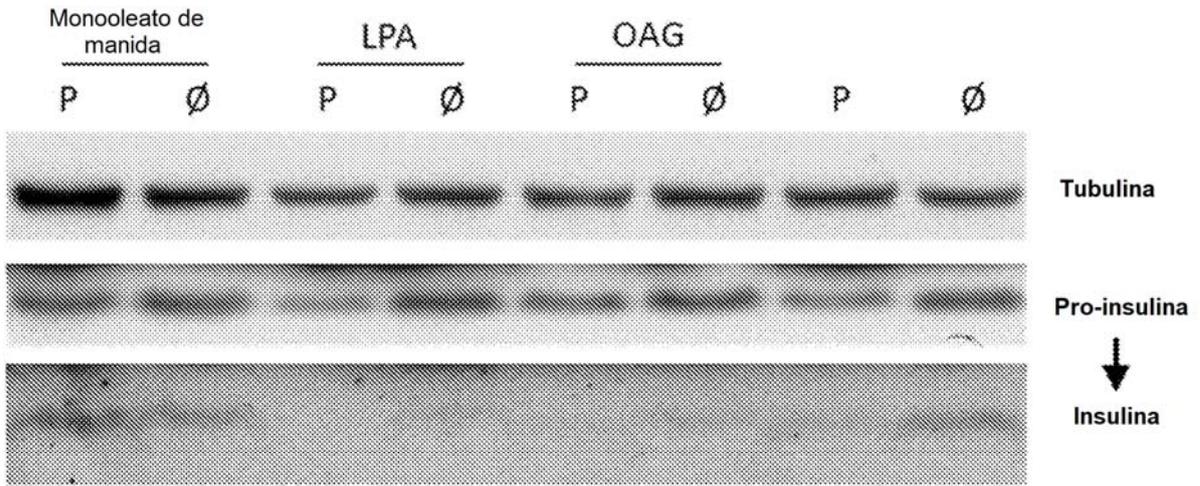


FIGURA 9

