



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 317 938**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/20** (2006.01)

**A61K 31/201** (2006.01)

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 17/06** (2006.01)

**A61P 17/08** (2006.01)

**A61P 17/12** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01975050 .4**

(96) Fecha de presentación : **27.09.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1324756**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

(54) Título: **Uso de análogos de ácidos grasos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.**

(30) Prioridad: **27.09.2000 NO 20004844**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2009**

(73) Titular/es: **Thia Medica AS.**  
**Terje Moe, Kalfarveien 57A**  
**5018 Bergen, NO**

(72) Inventor/es: **Berge, Rolf y**  
**Kristiansen, Karsten**

(74) Agente: **Sanz-Bermell Martínez, Alejandro**

ES 2 317 938 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de análogos de ácidos grasos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.

5 La presente invención se refiere al uso de análogos de ácidos grasos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.

## Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades proliferativas de la piel se extienden por todo el mundo y afectan a millones de personas y a sus animales domésticos. Las enfermedades proliferativas de la piel se caracterizan por la proliferación o división de células de queratinocitos y pueden estar asociadas también a la diferenciación epidérmica incompleta. La soriasis es una de las enfermedades proliferativas de la piel más graves a las que se refiere la presente invención.

15 La soriasis es una enfermedad de la piel determinada genéticamente que se caracteriza por dos distintivos biológicos: en primer lugar, se da una hiperproliferación epidérmica profunda relacionada con una diferenciación acelerada e incompleta; por otro lado, hay una marcada inflamación, tanto de la dermis como de la epidermis, con un mayor reclutamiento de linfocitos T y en algunos casos, con formación de microabscesos neutrófilos. Muchas de las características patológicas de la soriasis se pueden atribuir a alteraciones en el crecimiento y madurez de los queratinocitos epidérmicos, con un aumento en la proliferación de las células epidérmicas que se produce a 0,2 mm de la superficie de la piel. Las investigaciones tradicionales de la patogénesis de la soriasis se han concentrado en la mayor proliferación e hiperplasia de la epidermis. En pieles normales, el tiempo necesario para que una célula se desplace de la capa basal a la capa granular es de 4 a 5 semanas. En lesiones de soriasis, el tiempo disminuye de siete a diez veces debido al menor tiempo del ciclo celular, a un aumento del número absoluto de células capaces de proliferar y a un incremento en la proporción de células que se dividen realmente. El fenómeno de la hiperproliferación también se expresa, aunque en un grado sustancialmente menor, en piel clínicamente no afectada de pacientes de soriasis.

20 Una forma común de soriasis, la *Soriasis vulgaris*, se caracteriza por placas eritematosas bien definidas cubiertas por escamas plateadas y gruesas. Una conclusión característica es la respuesta isomórfica (fenómeno de Koebner), en la que aparecen nuevas lesiones soriáticas en zonas de traumas cutáneos. Las lesiones se localizan a menudo en las superficies extensoras de las extremidades, y habitualmente, las uñas y el cuero cabelludo también resultan implicados.

25 Los esfuerzos terapéuticos en la soriasis tienen como objetivo reducir el índice de proliferación de la epidermis, bien por acción directa en la división celular o bien indirectamente reduciendo la respuesta inmunológica. Para los pacientes con soriasis localizada y limitada, el tratamiento ambulatorio más conveniente es la administración de corticoesteroides tópicos. Con este enfoque es posible observar una rápida mejoría, pero la eficacia beneficiosa a corto plazo está limitada y no es aconsejable un tratamiento crónico con corticoesteroides tópicos. Los efectos secundarios de un tratamiento crónico de corticoesteroides tópicos pueden incluir atrofia de la piel, desarrollo de tolerancia al agente utilizado (taquifilaxia) y empeoramiento grave de la enfermedad después de la interrupción. La supresión pituitario-adrenal es una complicación potencial y grave de una terapia potente de corticoesteroides tópicos, especialmente cuando el agente cubre una gran parte de la superficie corporal y se utiliza debajo de ropa ceñida.

30 Los retinoides, en particular el etretinato, ya sea en solitario o en combinación con fotoquimioterapia, también son un tratamiento eficaz para la soriasis. El etretinato es especialmente útil para las variedades de soriasis exfoliativa y pustular. Sin embargo, es necesario vigilar diversas complicaciones potenciales de importancia en los pacientes tratados con retinoides. Como clase, los retinoides son unos potentes teratógenos y no deberían administrarse a mujeres en edad fértil que no utilicen unos medios anticonceptivos adecuados. El etretinato, como otros retinoides, puede producir aumentos en los niveles de colesterol y triglicéridos, por lo que es necesario controlar de la dieta. Además, como el etretinato puede inducir hepatotoxicidad, se deberían realizar pruebas de la función hepática antes y a intervalos regulares durante el uso del medicamento.

35 Si consideramos las complicaciones y los efectos secundarios que produce el uso de los diferentes medicamentos y la fotoquimioterapia utilizada actualmente para el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel como la soriasis, es necesario un nuevo método y una nueva composición para inhibir la proliferación de los queratinocitos y aliviar así los síntomas de las enfermedades proliferativas de la piel.

## Descripción detallada de la invención

40 La epidermis es un epitelio escamoso y estratificado en el que la capa basal se compone de células progenitoras que sufren un programa de diferenciación de alta secuencia cuando migran a través de las capas suprabasales. Cada paso de la diferenciación se caracteriza por la expresión de genes marcadores específicos. Las células basales de proliferación expresan genes de queratina como el K5 y el K14, mientras que la transición de las células basales desde la capa basal hasta la capa espinosa se asocia a la desinhibición de los primeros marcadores de diferenciación, queratina 1 (K1) y queratina 10 (K10). La transición desde la capa espinosa hasta la capa granulosa va acompañada por la desinhibición de los genes que codifican proteínas estructurales de envoltura córnea como la involucrina (IVL) y la posterior transglutaminasa (TGM1).

## ES 2 317 938 T3

La epidermis representa un tejido con niveles altos de metabolismo de ácidos grasos y colesterol donde la acumulación y sedimentación de colesterol, ácidos grasos y esfingolípidos constituye parte integral del programa de diferenciación epidérmica terminal que culmina en la formación de una barrera epidérmica competente.

5 Se especula que la familia PPAR juega un papel importante en la diferenciación de los queratinocitos y en el presente estudio hemos comparado el efecto de los conocidos ligandos de PPAR con el efecto obtenido con TTA, un compuesto de la presente invención.

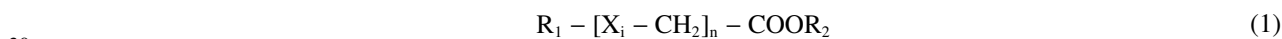
10 En el presente estudio hemos analizado en detalle la expresión de los PPAR durante la diferenciación *ex vivo* de queratinocitos humanos, en células basales y suprabasales aisladas y en secciones de piel humana. Utilizando concentraciones de ligandos selectivos de subtipo PPAR que se dirigían exclusivamente al subtipo PPAR adecuado hemos descubierto que los ligandos selectivos PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  tienen un efecto negativo en la expresión del gen marcador de los queratinocitos (no se muestran los datos). Curiosamente, el ligando selectivo PPAR $\delta$  L165041 produjo una expresión de involucrina dependiente de la dosis. Los tres ligandos selectivos subtipo PPAR, bien en solitario o 15 combinados, sólo lograron una modesta proliferación de los queratinocitos.

Sin embargo, la aplicación de la presente patente revela que un componente de la invención, es decir, el ácido tetradeciltioacético (TTA), un ácido graso tio sustituido, induce con potencia la expresión de los genes del marcador de diferenciación de los queratinocitos y ejerce una marcada acción antiproliferativa en dichos queratinocitos.

20 Así, es posible que el TTA se conforme como un interesante componente para el tratamiento de diversas enfermedades de la epidermis caracterizadas por una diferenciación aberrante.

Por lo tanto, la presente invención revela que los análogos de ácidos grasos a concentraciones que no sean citotóxicas se pueden utilizar para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.

La presente invención está relacionada con el uso de análogos de ácidos grasos de fórmula general (1):



- donde  $R_1$  es:

- 35 - un alquenilo  $C_1-C_{24}$  con uno o más enlaces dobles y/o con uno o más enlaces triples, y/o
- un alquino  $C_1-C_{24}$ , y/o
- 40 - un alquilo  $C_1-C_{24}$ , o un alquilo  $C_1-C_{24}$  sustituido en una o varias posiciones por uno o más compuestos seleccionados del grupo formado por fluoruro, cloruro, hidroxilo, alcoxilo  $C_1-C_4$ , alquiltio  $C_1-C_4$ , aciloxi  $C_2-C_5$  o alquilo  $C_1-C_4$ , y

- donde  $R_2$  representa hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ , y

45 - donde  $n$  es un número entero del 1 al 12, y

- donde  $i$  es un número impar que indica la posición relativa a  $COOR_2$ , y

- donde las  $X_i$ , independientes entre sí, se seleccionan del grupo formado por O, S, SO, SO<sub>2</sub>, Se y CH<sub>2</sub>,

50 - y con la condición de que como mínimo, una de las  $X_i$  no sea CH<sub>2</sub>;

- con la condición de que si  $R_1$  es un alquino o alquenilo, entonces el enlace triple o doble carbono-carbono se posicione entre el carbono ( $\omega-1$ ) y el carbono ( $\omega-2$ ), o entre el carbono ( $\omega-2$ ) y el carbono ( $\omega-3$ ), o entre el carbono ( $\omega-3$ ) y el carbono ( $\omega-4$ ); y

55 - con la condición de que

si  $R_1$  es alquenilo  $C_1-C_{24}$  con más de un enlace doble, entonces  $X_i$  no sea O ni S; y

60 si  $R_1$  es alquilo  $C_1-C_{24}$  e  $i$  es 3 o 5, entonces  $X_i$  no sea S;

o una sal, profármaco o combinación de éstos, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel.

65 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de análogos de ácidos grasos de fórmula general (1a):



- donde  $R_1$  es;
  - un alqueno  $C_1-C_{24}$  con uno o más enlaces dobles y/o con uno o más enlaces triples, y/o
  - un alquino  $C_1-C_{24}$ , y/o
  - un alquilo  $C_1-C_{24}$ , o un alquilo  $C_1-C_{24}$  sustituido en una o varias posiciones por uno o más compuestos seleccionados del grupo formado por fluoruro, cloruro, hidroxilo, alcoxilo  $C_1-C_4$ , alquiltio  $C_1-C_4$ , aciloxi  $C_2-C_5$  o alquilo  $C_1-C_4$ , y
- donde  $R_2$  representa hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ , y
- donde  $n$  es un número entero entre 1 y 12, y
- donde  $i$  es un número impar que indica la posición relativa a  $COOR_2$ , y
- donde las  $X_i$ , independientes entre sí, se seleccionan del grupo formado por O, S, SO,  $SO_2$ , Se y  $CH_2$ , y
- con la condición de que como mínimo, una de las  $X_i$  no sea  $CH_2$ ; y
- con la condición de que si  $R_1$  sea un alqueno o alquino, el enlace triple o doble de carbono-carbono se posicione entre el carbono ( $\omega-1$ ) y el carbono ( $\omega-2$ ), o entre el carbono ( $\omega-2$ ) y el carbono ( $\omega-3$ ), o entre el carbono ( $\omega-3$ ) y el carbono ( $\omega-4$ ).

o una sal, profármaco o combinación de éstos, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de análogos de ácidos grasos de fórmula general (1a):



- donde  $R_1$  es;
  - un alqueno  $C_1-C_{24}$  con uno o más enlaces dobles y/o con uno o más enlaces triples, y/o
  - un alquino  $C_1-C_{24}$ , y/o
  - un alquilo  $C_1-C_{24}$ , o un alquilo  $C_1-C_{24}$  sustituido en una o varias posiciones por uno o más compuestos seleccionados del grupo formado por fluoruro, cloro, hidroxilo, alcoxilo  $C_1-C_4$ , alquiltio  $C_1-C_4$ , aciloxi  $C_2-C_5$  o alquilo  $C_1-C_4$ , y donde  $R_2$  representa hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ , y
- donde  $n$  es un número entero entre 1 y 12, y
- donde  $i$  es un número impar que indica la posición relativa a  $COOR_2$ , y
- donde  $X_i$ , independientes entre sí, se selecciona del grupo formado por O, S, SO,  $SO_2$ , Se y  $CH_2$ , y
- con la condición de que como mínimo, una de las  $X_i$  no sea  $CH_2$ ; y
- con la condición de que si  $R_1$  es un alqueno o alquino, entonces el enlace triple o doble de carbono-carbono se posicione entre el carbono ( $\omega-1$ ) y el carbono ( $\omega-2$ ), o entre el carbono ( $\omega-2$ ) y el carbono ( $\omega-3$ ), o entre el carbono ( $\omega-3$ ) y el carbono ( $\omega-4$ ).

o una sal, profármaco o combinación de éstos, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel.

#### Leyendas de las figuras

La Figura 1 muestra la inducción de genes específicos de diferenciación epidérmica y CD36.

La Figura 2 muestra la morfología y la expresión de genes específicos de diferenciación de queratinocitos tratados con TTA y con ligandos selectivos de PPAR.

La Figura 3 muestra que el TTA induce el marcador de diferenciación epidérmica tardío Tg-1 e inhibe la proliferación de queratinocitos.

*Administración de los compuestos de la presente invención*

Igual que un medicamento farmacéutico, los compuestos de la presente invención se deben administrar directamente al mamífero mediante cualquier técnica adecuada, entre las que se incluyen la vía parenteral, intranasal y oral o por absorción a través de la piel. Se pueden administrar local o sistemáticamente. La ruta de administración específica de cada agente dependerá, por ejemplo, del historial médico del mamífero.

Los compuestos de la presente invención se administran preferentemente por vía tópica.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en dispersiones preparadas en cremas, ungüentos, aceites u otros vehículos adecuados y/o diluyentes como glicerol, polietilenglicoles líquidos y/o mezclas de los mismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso tópico incluyen soluciones acuosas estériles (donde el agua es soluble) o dispersiones y polvos para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones tópicas. En todos los casos, la forma será preferentemente estéril, aunque no es un requisito imprescindible, y será estable en condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo puede ser un medio de dispersión o disolvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada utilizando, por ejemplo, un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes surfactantes. La prevención de la acción del microorganismo se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, sería preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico.

Las soluciones tópicas se preparan incorporando los compuestos de la presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización de filtro cuando sea necesario.

En la forma utilizada en este documento, "vehículos y/o diluyentes aceptables farmacéuticamente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que alguno de los medios o agentes convencionales sea incompatible con el ingrediente activo, está contemplado su uso en las composiciones farmacéuticas.

Además, los compuestos de la presente invención se administran de la forma adecuada en combinación con otros tratamientos para combatir o prevenir enfermedades proliferativas de la piel.

La invención se entenderá de forma más completa con los siguientes ejemplos.

**Sección experimental****Ejemplo 1***Preparación y caracterización de los compuestos**Síntesis de análogos de ácidos grasos 3-sustituido*

Los compuestos utilizados de acuerdo con la presente invención, donde el sustituyente Xi=3 es un átomo de azufre o un átomo de selenio, se pueden preparar mediante el siguiente procedimiento general:

X es un átomo de azufre:

El compuesto tio sustituido utilizado de acuerdo con la presente invención se puede preparar según el procedimiento general que se indica a continuación:

**Base**

El compuesto de azufre, concretamente el ácido tetradeciltioacético (TTA),  $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}\text{-S-CH}_2\text{-COOH})$  se preparó como se muestra en EP-345.038.

X es un átomo de selenio:

El compuesto de selenio utilizado de acuerdo con la presente invención se puede preparar mediante el procedimiento general que se indica a continuación:

1.

Alquilo-Hal + KSeCN Alquilo-SeCN...

2.

Alquilo-SeCN +  $\text{BH}_4^-$  Alquilo- $\text{Se}^-$

3.

Alquilo- $\text{Se}^-$  +  $\text{O}_2$  Alquilo-Se-Se-Alquilo

Este compuesto ha sido purificado mediante una cuidadosa cristalización de etanol o metanol.

4.

$\text{BH}_4^-$

**Alquilo-Se-Se-Alquilo  $\rightarrow$  2 Alquilo- $\text{Se}^-$**

5.

**Alquilo -  $\text{Se}^-$  + Hal- $\text{CH}_2$ -COOH  $\rightarrow$  Alquilo-Se- $\text{CH}_2$  - COOH**

El compuesto final, p. ej., cuando el alquilo es tetradecilo,  $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{COOH}$  (ácido tetradecilselenoacético [TSA]), se puede purificar mediante cristalización de éter dietilo y hexano.

Otros compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden sintetizar como se indica en las solicitudes de patente del solicitante PCT/N099/00135 y N° 20001123.

## Ejemplo 2

*El efecto del TTA en la diferenciación y proliferación de queratinocitos*

### *Materiales y Métodos*

#### *Cultivo celular y diferenciación*

Se aíslan queratinocitos epidérmicos humanos adultos normales a partir de piel humana obtenida tras cirugía plástica. En el primer paso, se cultivaron queratinocitos en KGM sin suero (GIBCO BRULife Technologies, Inc.) y se replataron en una matraz de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> o en placas de microtitulación de 96 pocillos precalentadas a 37°C con una densidad de 3.500 células/pocillo. Las células se incubaron en atmósfera humidificada con un 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Cuando las células alcanzaron un 40% de confluencia, fueron tratadas con un medio de crecimiento que contenía ligandos selectivos de PPAR (solos o en las combinaciones indicadas), ácido tetradeciloacético (TTA) o 1,2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se obtuvo Wy14643 de Calbiochem; el BRL49653 fue amablemente suministrado por J. Fleckner, (Novo Nordisk) y el L165041 fue amablemente suministrado por D.E. Moller (Merck Research Laboratories, Rahway, New Jersey). El TTA fue elaborado de acuerdo con el ejemplo 1. El medio se cambió diariamente. Para la diferenciación, los queratinocitos con un 40% de confluencia (día 0) fueron tratados con 1,2 mM de  $\text{CaCl}_2$ . El medio se cambió cada dos días. Las células HaCaT se obtuvieron de L. Aarenstrup (Sociedad Danesa del Cáncer, Dinamarca). Las células HaCaT se cultivaron en un medio de eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un 10% de suero fetal de ternera (FCS) y antibióticos (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de penicilina, 1 mg/ml de sulfato de estreptomycin) en una atmósfera humidificada con un 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. El medio se cambió cada dos días.

#### *Separación de los queratinocitos en células basales y células suprabasales*

Las muestras de piel normal de adulto obtenidas mediante cirugía plástica se limpiaron de grasa y se cortaron por el lado de la epidermis utilizando una escápula. El tejido se incubó durante la noche en hielo con 25 U/ml de dispasa II (Roche) hecha en Hanks Buffered Saline Solution. Se peló la epidermis utilizando unos alicates y las láminas de epidermis fueron incubadas en 0,05 mg/ml de tripsina (1:250, GIBCO BRULife Technologies, Inc.) a 37°C hasta que se liberaron células individuales. La actividad de la tripsina fue inhibida añadiendo un medio que contenía suero. Se

centrifugaron las células a 800 fcr (fuerza centrífuga relativa) y se resuspendieron en Queratinocito-SFM (GIBCO BRULife Technologies, Inc.) precalentado. La suspensión de las células se puso en matraces de cultivo de tejidos con colágeno de rabo de rata. Transcurrida 1 hora, las células no adheridas se recogieron como la fracción suprabasal y las células basales adheridas se recogieron mediante un rascador de varilla policia. Las perlitas celulares se congelaron a

-70°C hasta ser utilizadas.

#### *Determinación de la viabilidad y la proliferación*

La viabilidad/proliferación se midió con una modificación del ensayo MTT introducido por Mosmann T (J *Immunol Methods* 65:55-63, 1983). Se añadieron veinticinco  $\mu$ l de 5 mg/ml de MTT en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,44 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l, pH 7,4) a cada pocillo y las placas se colocaron en una incubadora hasta que los cristales en crecimiento traspasaron las paredes celulares, normalmente, una vez trascurridas de tres a cuatro horas. Las placas se agitaron para retirar el medio y se descongelaron dos veces antes de disolver en etanol:acetona los cristales formazán. (60:40 w/w) con un batido/sacudida suave durante 30 minutos a 4°C. La cantidad de formazán se cuantificó con un lector ELISA a 540 nm. Se restaron los valores de fondo a 650 nm.

#### *Determinación de la expresión Tg-1 mediante ELISA*

Las células fueron sometidas a dos ciclos de descongelación y la transglutaminasa tipo 1 (Tg-1) se determinó mediante ELISA. Cada pocillo se llenó con 200  $\mu$ l de BSA al 1% en PBS durante una hora a 37°C y después, se incubaron durante una hora a 37°C con 100  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal específico de Tg-1 B.CI (Biomedical Technologies Inc.) diluido al 1:1.000 en PBS-BSA al 1%. Los pocillos se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS-Tween 20 al 0,05% y se incubaron durante una hora con 100  $\mu$ l de anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano secundaria diluidos al 1:2.500 en PBS-BSA al 1%. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% y una vez con PBS. Se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato de o-fenilenodiamina (OPD) y tras 30 minutos en oscuridad, las reacciones se detuvieron con 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2 N. La cantidad de transglutaminasa se midió cuantificando la reacción de la OPD con un lector ELISA a 490 nm y restando el valor de fondo a 650 nm. Para corregir las variaciones en el número de células, todos los valores se normalizaron al número de células.

### *Resultados*

#### *Efecto sobre CD36*

Para evaluar cómo afectaron el TTA y los diferentes activadores de PPAR a la expresión de un gen de respuesta PPAR conocido y a la diferenciación de los queratinocitos, primero medimos los niveles mRNA de CD36/FAT y los dos marcadores de diferenciación, Inv y Tg-1 en NHK tratados con PPAR activadores selectivos de PRAR y con TTA durante un período de tres días (Fig. 1a). Se ha demostrado que el promotor proximal del gen CD36/FAT alberga un elemento receptivo de PPAR. La administración de BRL49653 (ligando de PPAR $\gamma$ ) o Wy14643 (ligando de PPAR $\alpha$ ) indujo la expresión de CD36/FAT, y el ligando selectivo de PPAR $\gamma$ , L165041, indujo una significativa expresión dependiente de la dosis de CD36, lo que sugiere que CD36/FAT también es un gen receptivo de PPAR $\delta$ .

Finalmente, la adición de un compuesto de la presente invención, es decir, TTA, indujo la expresión de CD36/FAT mRNA a un nivel ligeramente superior al observado con Wy14643 o BRL49653.

El tratamiento con  $\text{CaCl}_2$ , un potente y reputado inductor de la diferenciación de los queratinocitos, no indujo la expresión de CD36/FAT.

#### *Expresión mRNA de Inv*

Como se muestra en la Fig. 1a, el tratamiento con Wy14643 resultó en una modesta inducción de la expresión mRNA de Inv. Curiosamente, la adición de L165041 provocó una inducción dependiente de la dosis de la expresión mRNA de Inv, mientras que BRL49653 en solitario no tuvo ningún efecto sobre la expresión mRNA de Inv. La adición de forma simultánea de L165041 y Wy14643 no aumento de forma significativa el nivel de expresión mRNA de Inv. Asimismo, el tratamiento combinado con Wy14643 y BRL49653 no indujo la expresión del mRNA de Inv por encima de lo observado utilizando Wy 14643 únicamente. Es interesante señalar que la adición simultánea de L165041 y BRL49653 indujo con fuerza la expresión mRNA de Inv, lo que indica sinergia entre PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ . El método Western Blot repite los resultados obtenidos mediante RT-PCR, mostrando una inducción dependiente de la dosis de la proteína Inv por parte de L165041 y una fuerte sinergia entre L165041 y BRL49653 (Fig. 1 b). Cada ligando selectivo de PPAR indujo la expresión mRNA de Tg-1, y combinaciones de los ligandos selectivos de PRAR indujeron la expresión de manera adicional.

La adición de un compuesto de la presente invención, es decir, TTA, indujo la expresión mRNA de Inv y Tg-1 a unos niveles que superaban significativamente los niveles obtenidos con el tratamiento con ligandos selectivos de PRAR. La potencia del TTA como inductor de la expresión de Inv y Tg-1 fue incluso más notoria cuando se analizó la expresión a nivel de proteínas mediante el método Western Blot. (Fig. 1b). Se debe señalar que el TTA indujo la expresión mRNA de Inv y Tg-1 y la expresión proteínica a unos niveles iguales o superiores a los observados con el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$ . En conjunto, estos resultados sugieren que el TTA, además de inducir posiblemente la

expresión de Inv y Tg-1 vía caminos dependientes de PPAR, ejerció un pronunciado efecto sobre la expresión de Inv y Tg-1 mediante mecanismos no relacionados con la función del TTA como activador y ligando de PPAR.

Como el TTA desinhibía la expresión de los marcadores de diferenciación de los queratinocitos, examinamos si el tratamiento con TTA o con los diferentes activadores selectivos subtipo de PPAR, bien en solitario o combinados, afectaba a la morfología de NHK durante el primer período del proceso de diferenciación (Fig. 2). Además, se examinó la expresión de Inv y Tg-1 mediante un microscopio de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 3). Tal como se evaluó mediante un microscopio de contraste de fases, la morfología de los NHK tratados durante tres días con ligandos o con 1,2 mM de  $\text{CaCl}_2$  no difería de forma notoria. Sin embargo, la densidad de las células en platos tratadas con TTA era mucho menor que la de células tratadas con el vehículo o la de células tratadas con ligandos selectivos de PPAR, lo que indica que el TTA, además de inducir marcadores específicos de queratinocitos, también provocó una detención del crecimiento o una disminución del índice de proliferación.

El microscopio de inmunofluorescencia indirecta reveló niveles comparables de expresión de Inv y Tg-1 en las células tratadas con  $\text{CaCl}_2$ - y TTA, corroborando así los resultados obtenidos por el método Western Blot. Además, este análisis también demostró que el ligando selectivo de PPAR $_{\gamma}$  L165041, de forma dependiente de la dosis, indujo la expresión de la Inv.

La diferenciación de los queratinocitos está correlacionada con un aumento en el tamaño de la célula. Es interesante señalar que una comparación minuciosa de la morfología de las células tratadas con  $\text{CaCl}_2$  y con TTA indica que la relación citoplasma-núcleo de las células tratadas con TTA tenía tendencia a ser inferior al de las células tratadas con  $\text{CaCl}_2$ . Por ello, aunque el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  y TTA indujo series superpuestas de genes marcadores de queratinocitos, esta observación sugiere que el TTA y el  $\text{CaCl}_2$  ejercen efectos diferenciales sobre la diferenciación de los queratinocitos. Para examinar de forma más cuantitativa el efecto de los ligandos selectivos de PPAR y del TTA sobre la proliferación de queratinocitos, se trataron las células NHK con ligandos PPAR, con TTA y con  $\text{CaCl}_2$  (como se indica en la Fig. 3) y se evaluó la proliferación utilizando una modificación del ensayo MTT según se describe en la sección "Materiales y Métodos". Paralelamente, la expresión de la Tg-1 se controló mediante un ensayo basado en ELISA (Fig. 3b).

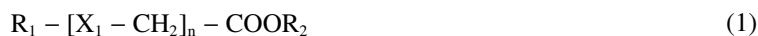
Es de señalar que el TTA ejerció una inhibición de la proliferación de las células NHK fuerte y dependiente de la dosis que superaba mucho la observada con los ligandos selectivos de PPAR. La acción antiproliferativa del  $\text{CaCl}_2$  fue sólo marginal en estos experimentos. Recapitulando los resultados obtenidos mediante RT-PCR (Transcriptasa reversa y Reacción en cadena de la polimerasa) y con el método Western Blot, sólo el TTA y el  $\text{CaCl}_2$  indujeron una expresión de Tg-1 significativa. Así, los resultados obtenidos utilizando el ensayo MTT distinguían claramente el TTA de los ligandos selectivos de PPAR y confirmaban la idea de que el TTA inhibía fuertemente la proliferación de células NHK e inducía con fuerza la expresión de genes marcadores de diferenciación de queratinocitos.

El efecto del tratamiento de un huésped con enfermedad proliferativa de la piel con un compuesto de la presente invención se puede evaluar con criterios objetivos, como una mejora de la descamación y del eritema o una reducción del tamaño de las lesiones, así como con criterios subjetivos, como el cese del picor. Los métodos objetivos que se utilizan para establecer el efecto del tratamiento en pacientes con soriasis incluyen la resolución de plagas mediante control visual y con fotografías.



## REIVINDICACIONES

1. Uso de análogos de ácidos grasos de la fórmula general (1):



- donde  $R_1$  es;

- un alqueno  $C_1-C_{24}$  con uno o más enlaces dobles y/o con uno o más enlaces triples, y/o

- un alqueno  $C_1-C_{24}$ , y/o

- un alquilo  $C_1-C_{24}$ , o un alquilo  $C_1-C_{24}$  sustituido en una o varias posiciones por uno o más compuestos seleccionados del grupo formado por fluoruro, cloro, hidróxido, alcoxido  $C_1-C_4$ , alquilo  $C_1-C_4$ , aciloxido  $C_2-C_5$  o alquilo  $C_1-C_4$ , y

- donde  $R_2$  representa hidrógeno o alquilo  $C_1-C_4$ , y

- donde  $n$  es un número entero de 1 a 12, y

- donde  $i$  es un número impar que indica la posición relativa a  $COOR_2$ , y

- donde las  $X_i$ , independientes entre sí, se seleccionan del grupo formado por O, S, SO,  $SO_2$ , Se y  $CH_3$ , y

- con la condición de que como mínimo, una de las  $X_i$  no sea  $CH_2$ ;

- con la condición de que, si  $R_1$  es un alqueno o alqueno, entonces el enlace triple o doble de carbono-carbono se posiciona entre el carbono ( $\omega-1$ ) y el carbono ( $\omega-2$ ), o entre el carbono ( $\omega-2$ ) y el carbono ( $\omega-3$ ), o entre el carbono ( $\omega-3$ ) y el carbono ( $\omega-4$ ); y

- con la condición de que

si  $R_1$  es alqueno  $C_1-C_{24}$  con más de un enlace doble, entonces  $X_i$  no sea O ni S; y

si  $R_1$  es  $C_1-C_{24}$  alquilo, e  $i$  es 3 o 5, entonces  $X_i$  no sea S;

o una sal, profármaco o combinación de éstos, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en que la enfermedad proliferativa de la piel se selecciona del grupo formado por soriasis, dermatitis atópica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria, dermatitis de contacto alérgica, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis solar premaligna y seborrea.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en que la enfermedad proliferativa de la piel es soriasis.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en que  $R_1$  es un alquilo.

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en que  $R_1$  es un alqueno.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en que los compuestos es ácido tetradecilselenoacético.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en que los análogos de ácidos grasos se deben administrar por vía tópica.

8. Uso de análogos de ácidos grasos de fórmula general (1a):



- donde  $R_1$  es:

- un alqueno  $C_1-C_{24}$  con uno o más enlaces dobles y/o con uno o más enlaces triples, y/o

## ES 2 317 938 T3

- un alquínilo  $C_1-C_{24}$  y/o
- un alquilo  $C_1-C_{24}$ , o un alquilo  $C_1-C_{24}$  sustituido en una o varias posiciones por uno o más compuestos seleccionados del grupo formado por fluoruro, cloro, hidróxido, alcoxido  $C_1-C_4$ , alquiltio  $C_1-C_4$ , aciloxido  $C_1-C_5$  o alquilo  $C_1-C_4$ , y

- donde  $R_2$  representa al hidrógeno o al alquilo  $C_1-C_4$ , y
- donde  $n$  es un número entero de 1 a 12, y
- donde  $i$  es un número impar e indica la posición relativa de  $COOR_2$ , y
- donde  $X_i$ , independientes entre sí, se selecciona del grupo formado por O, S, SO,  $SO_2$ , Se y  $CH_2$ , y
- con la condición de que como mínimo, uno de los  $X_i$  no sea  $CH_2$ , y
- con la condición de que, si  $R_1$  es un alquínilo o alquénilo, entonces el enlace triple o doble de carbono-carbono se posiciona entre el carbono ( $\omega-1$ ) y el carbono ( $\omega-2$ ), o entre el carbono ( $\omega-2$ ) y el carbono ( $\omega-3$ ), o entre el carbono ( $\omega-3$ ) y el carbono ( $\omega-4$ ).

o una sal, profármaco o combinación de éstos, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas de la piel.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que la enfermedad proliferativa de la piel se selecciona del grupo formado por soriasis, dermatitis atópica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria, dermatitis de contacto alérgica, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis solar premaligna y seborrea.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 en que la enfermedad proliferativa de la piel es soriasis.

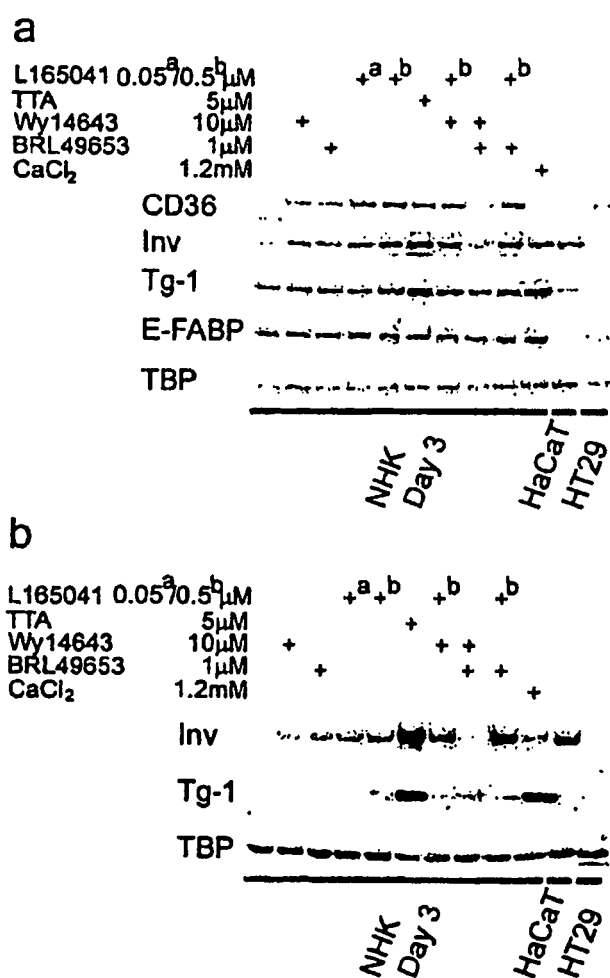
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que  $R_1$  es un alquilo.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que  $R_1$  es un alquénilo.

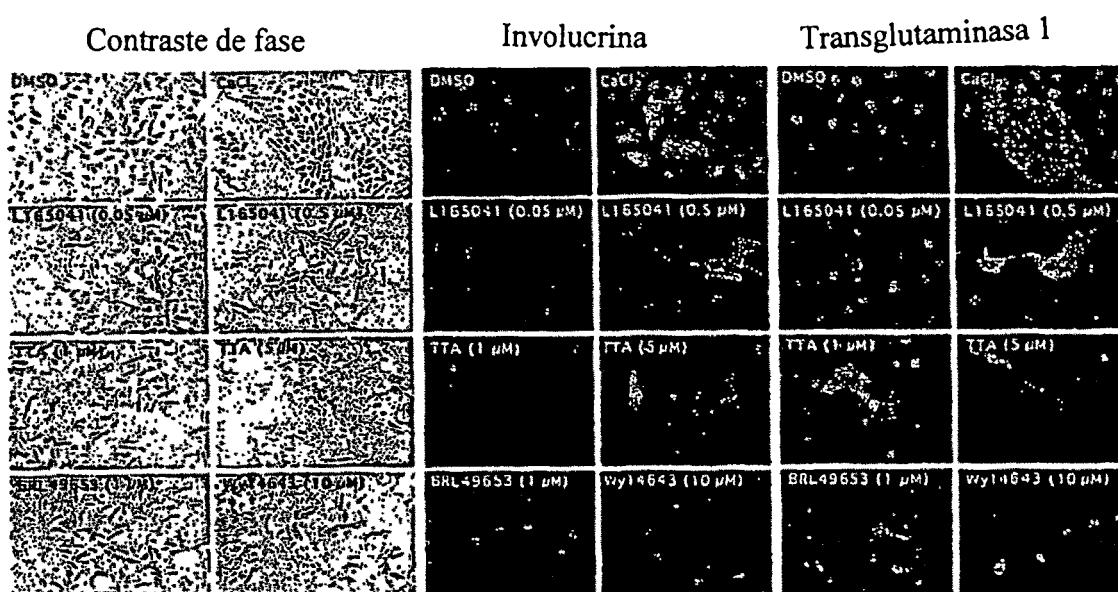
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que el compuesto es ácido tetradeciltioacético.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que el compuesto es ácido tetradecilselenoacético.

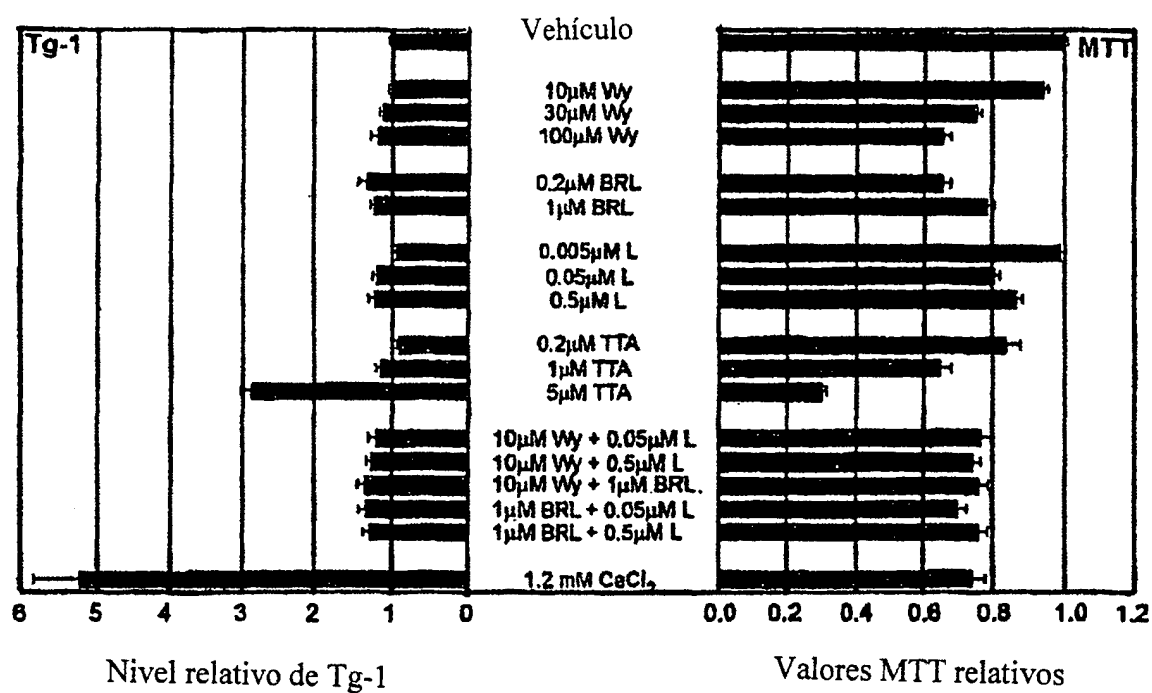
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en que los análogos de ácidos grasos se administran por vía tópica.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**