

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 279**

21 Número de solicitud: 201200097

51 Int. Cl.:

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 31/201 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

01.02.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.08.2013

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.10.2013

Fecha de la concesión:

31.03.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CADIZ (25.0%)
Otri-Vicerrectorado de I+D+I C/ Benito Pérez
Galdós s/n
11002 Cádiz (Cádiz) ES;
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (25.0%);
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CANARIAS
(25.0%) y
BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ZUBIA MENDOZA, Eva;
DE LOS REYES JIMENEZ, Carolina;
ORTEGA AGÜERA, M^a Jesús;
MOTILVA SÁNCHEZ, Virginia;
ÁVILA ROMÁN, Javier;
GARCIA-MAURIÑO RUIZ-BERDEJO, Sofia;
DE LA JARA VALIDO, Adelina y
MENDOZA GUZMÁN, Héctor**

54 Título: **Uso de oxilipinas y sus derivados como agentes antiinflamatorios**

57 Resumen:

Uso de oxilipinas y sus derivados como agentes antiinflamatorios.

La invención se refiere al uso de ácidos grasos monohidroxilados, en particular de oxilipinas derivadas de ácidos α -linolénico y linoleico, así como al uso de fracciones, extractos o biomasa de microalgas que contienen dichos ácidos, para su empleo como antiinflamatorios y quimiopreventivos en la enfermedad inflamatoria intestinal.

ES 2 417 279 B2

DESCRIPCIÓN

USO DE OXILIPINAS Y SUS DERIVADOS COMO AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

5 La presente invención se refiere al uso de ácidos grasos monohidroxilados, así como al uso de fracciones, extractos o biomasa de microalgas que contienen dichos ácidos, para su empleo como antiinflamatorios y quimiopreventivos en la enfermedad inflamatoria intestinal. Por tanto, la presente invención podría englobarse dentro del sector farmacéutico.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las oxilipinas son un conjunto de moléculas estructuralmente muy diversas que derivan de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Estos metabolitos se encuentran en animales, plantas, algas, bacterias y hongos, y generalmente actúan en rutas de señalización relacionadas con diversas respuestas a factores ambientales y patológicos. Un tipo de oxilipinas son los ácidos grasos que incorporan uno o varios grupos hidroxilo en su estructura (ácidos grasos hidroxilados, 20 hidroxíácidos).

Las oxilipinas en general, y los ácidos grasos hidroxilados en particular, presentan importantes actividades biológicas en animales superiores y humanos.

25

Se ha demostrado que diversos ácidos mono-, di- o trihidroxilados, formados a partir de los ácidos eicosapentaenoico (C20:5 n-3; EPA) y docosahexaenoico (C22:6 n-3; DHA), poseen una potente actividad antiinflamatoria e inmunoreguladora. Estos derivados altamente 30 bioactivos, también conocidos como resolvinas y docosatrienos, son considerados responsables de varios de los efectos beneficiosos de los ácidos EPA y DHA en la prevención y tratamiento de enfermedades

inflamatorias y cardiovasculares. En los últimos años se han presentado diversas patentes que describen una variedad de derivados hidroxilados de los ácidos araquidónico (C20:4 n-6; ARA), EPA y DHA, las rutas a través de las que se forman, así como métodos para su obtención y uso en el tratamiento de procesos inflamatorios (US2006/0293288).

El ácido 13-hidroxiocetadecatrienoico (13-HOTE) deriva de la oxidación del ácido α -linolénico (C18:3 n-3; ALA) y se ha detectado en el plasma humano, si bien su función fisiológica no está establecida. Se ha propuesto la potencialidad del 13-HOTE como agente antiinflamatorio en el tratamiento de osteoartritis y artritis reumatoide, dada su capacidad para suprimir in vitro la expresión de metaloproteinasas de matriz inducida por interleukina-1 β (Schulze-Tanzil et al. 2002, *Histol. Histopathol.* 17: 477-485).

En humanos, la oxidación del ácido linoleico (C18:2 n-6; LA) está mediada predominantemente por la 15-lipoxigenasa-1 (15-LOX-1) para originar el ácido 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE), una oxilipina que ha demostrado poseer numerosos efectos fisiológicos. El ácido (13S)-HODE es un ligando natural de los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), factores de transcripción que están implicados en patologías como obesidad, diabetes y cáncer. A través de la interacción con los PPARs, 13-HODE induce apoptosis en líneas de células de cáncer de colon HCT-116 (Zuo et al. 2006, *Oncogene* 25: 1225-1241). Por otro lado, se ha demostrado que el ácido 13-HODE presenta efectos antitumorigénicos en cáncer colorrectal y que el aumento en la expresión de la 15-LOX-1 (enzima que genera 13-HODE) disminuye la proliferación y la capacidad de emigración en las líneas celulares de carcinoma colorrectal HCT-116 y HT-29 (Çimen et al. 2009, *Cancer Sci.* 100: 2283–2291). Así mismo, se ha descrito que el ácido 13-HODE modula la proliferación cutánea y que su aplicación tópica revierte la hiperproliferación epidérmica

inducida (Ziboh et al. 2000, *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 3615-3665). En los últimos años se han publicado diversas patentes incluyendo aquellas relacionadas con la utilización del ácido 13-HODE como marcador para evaluar el stress oxidativo en mamíferos (WO2005/059566) o su uso tópico para el tratamiento de trastornos oculares (WO 2006/065916A1).

En relación con otros ácidos hidroxilados C18, se ha presentado (a) una solicitud de patente sobre la obtención y uso como agentes antiinflamatorios y antineurodegenerativos de derivados mono o dihidroxilados del ácido estearidónico (C18:4 n-3; SDA) y del ácido γ -linolénico (C18:3 n-6; GLA), como los ácidos 10-hidroxi SDA o 7-hidroxi GLA (US2007/0248586A1); (b) una solicitud patente sobre el uso de ácidos grasos hidroxilados C18 y C20, como el (9S)-HODE, (8S)-HETrE o (8S)-HEPE, para la preparación de medicamentos aplicables a la neutralización terapéutica de un fármaco de tipo organoboronato (WO2006/059083); (c) una solicitud de patente sobre una composición biológicamente activa que contiene, entre otros principios, el ácido 9-HOTE (WO2006/010560A2).

Actualmente algunas empresas de productos químicos finos comercializan una gama de derivados hidroxilados de ácidos grasos de 18 a 22 carbonos, incluyendo los ácidos 13-HOTE y 13-HODE, para su uso en estudios bioquímicos (ej. Cayman Chemical Company, USA).

En lo que respecta a los métodos de obtención de éstos ácidos, se ha descrito una síntesis estereoselectiva del ácido (13S)-HOTE, y varios métodos de síntesis del ácido (13S)-HODE, así como la preparación de este compuesto a través de la oxidación enzimática del LA. Más recientemente se ha presentado una solicitud de patente sobre la obtención de 13-HODE mediante una síntesis que implica la oxidación del LA con lipoxigenasa de maíz (WO2008/133398A1).

- Las microalgas son un grupo de organismos unicelulares, tanto procariotas como eucariotas, que se encuentran en ambientes acuáticos terrestres y marinos, y que en su mayoría son fotosintéticos. Su enorme biodiversidad, composición química, cortos tiempos de generación y la posibilidad de cultivo industrial hacen que las microalgas sean potencialmente una fuente muy interesante de productos con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.
- 5
- 10 Son escasos los datos sobre oxilipinas de microalgas. Se ha descrito el aislamiento de hidroxiácidos en las microalgas de la clase Cyanophyceae *Lygnbya majuscula* (ácido malyngico), *Anabaena flos-aquae f. flos-aquae* (9R-HOTE y 9R-HODE), *Oscillatoria redeki* HUB 051 (9-HODE y 13-HODE) y *Nostoc* sp. PCC7120 (9R-HOTE y 9R-HODE) y en la microalga de la clase Chlorophyceae *Dunaliella acidophila* (12R-HOTE y 9S-HOTE). Por otro lado, en diatomeas (Bacilliarophyceae) se ha identificado una variedad de oxilipinas, principalmente aldehídos poliinsaturados, implicados en la defensa química de estas microalgas.
- 15
- 20 La única referencia sobre el uso de fuentes naturales para la obtención de ácidos grasos hidroxilados aislados, o aceites que contengan dichos ácidos, se refiere a derivados del ácido estearidónico (SDA) o del ácido γ -linolénico (GLA) (US 2007/0248586A1). Esta solicitud de patente incluye el uso de animales, plantas y microorganismos para la obtención de aceites que contengan oxilipinas. En lo que respecta a microorganismos, dicha patente incluye el uso de determinadas especies de microalgas (ej. especies del género *Scenedesmus*) así como su manipulación genética (ej. especies del género *Cryptocodinium*).
- 25
- 30 No se han encontrado datos sobre el uso de microalgas como fuente de oxilipinas derivadas de los ácidos α -linolénico y/o linoleico en general y de los hidroxiácidos 13-HOTE y 13-HODE en particular.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

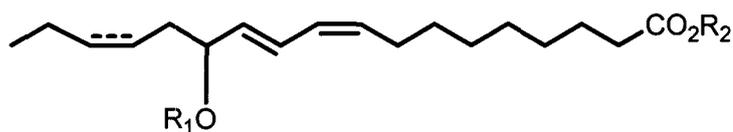
Los autores de la presente solicitud han encontrado:

- 5 (a) que diversas especies de microalgas cultivadas de la clase Chlorophyceae y Trebouxiophyceae contienen las oxilipinas (13S,9Z,11E,15Z)-13-hidroxi octadeca-9,11,15-trienoico [(13S)-HOTE] y/o (13S,9Z,11E)-13-hidroxi octadeca-9,11-dienoico [(13S)-HODE],
- 10 (b) que estos compuestos presentan actividad *in vitro* como agentes antiinflamatorios, y
- (c) que la administración a modelos animales de un preparado basado en microalgas que contienen las citadas oxilipinas atenúa los daños de la enfermedad inflamatoria intestinal.

- 15 De acuerdo con ello, la presente invención se refiere al uso de los ácidos 13-HOTE y/o 13-HODE y compuestos derivados de los mismos, así como de fracciones, extractos o biomasa de las microalgas que los contienen, en la preparación de composiciones dietéticas o farmacéuticas para su empleo en el tratamiento y/o prevención de procesos inflamatorios en
- 20 general, y de la enfermedad inflamatoria intestinal en particular.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) (a partir de ahora compuesto de la invención):

25



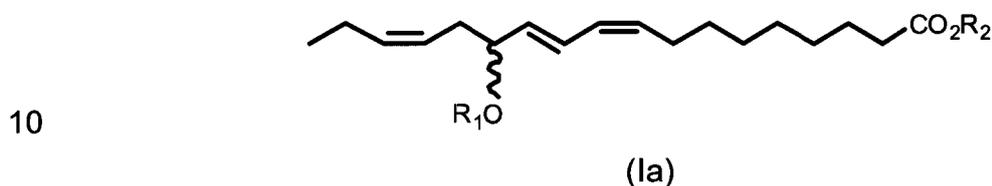
(I)

donde: ----- representa un enlace doble o simple;

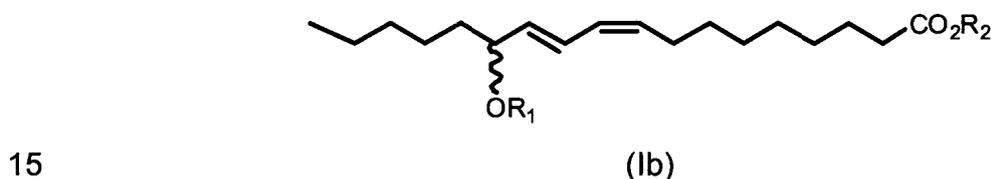
- 30 R₁ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, un grupo

alquilo (C₁-C₁₀), alqueno (C₂-C₁₀), alquino (C₂-C₁₀) o acilo; y
 R₂ se selecciona de entre hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₁₀),
 o cualquiera de sus sales o esteroisómeros farmacéuticamente
 aceptables, para la elaboración de una composición farmacéutica para el
 5 tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias del tracto
 digestivo.

Cuando ----- representa un enlace doble la fórmula general sería la
 siguiente (Ia):



Cuando ----- representa un enlace sencillo la fórmula general sería la
 siguiente (Ib):



El enlace ondulado en las fórmulas indica que la configuración de ese
 carbono puede ser *R* o *S*, o una mezcla racémica.

20 Los compuestos de la presente invención, representados por la fórmula
 (I), descrita anteriormente pueden incluir cualquiera sus sales, éster,
 solvato o sus esteroisómeros, en particular cualquiera de sus
 enantiómeros (*R* ó *S*) o una mezcla racémica.

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables " se refiere a cualquier
 sal farmacéutica o cualquier otro compuesto que, siendo administrado a
 un receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un
 compuesto descrito en el presente documento. Sin embargo se observará
 que las sales farmacéuticamente inaceptables están también en el ámbito

de la invención ya que estas últimas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, estereoisómeros y derivados pueden ser llevadas a cabo por medio de métodos conocidos en la materia.

5

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo
10 alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquinilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

15 El término "alquenilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles y que opcionalmente puede contener algún enlace triple, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-
20 butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquilo, alquinilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

25 El término "alquinilo" se refiere a cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen al menos uno o más enlaces carbono-carbono triples y que opcionalmente puede contener algún enlace doble, por ejemplo, etilino, propinilo, butinilo, etc. Los radicales alquinilo pueden estar opcionalmente
30 sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

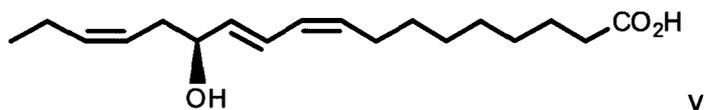
El término “grupo acilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada, lineal o ramificada, saturada o insaturada, en la que el primer carbono de la cadena es un grupo carbonilo, es decir, el grupo acilo tiene como fórmula
 5 $-\text{CO}-\text{R}'$, siendo R' un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo según se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida de la presente invención, R_1 es hidrógeno. En otra realización preferida de la presente invención, R_2 es hidrógeno.

10

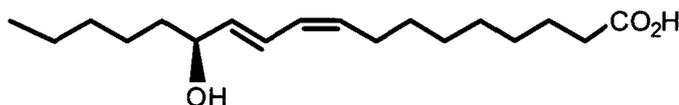
En una realización más preferida R_1 y R_2 son hidrógeno.

En una realización aún más preferida los compuestos de la invención son los siguientes: (13S,9Z,11E,15Z)-13-hidroxiocetadeca-9,11,15-trienoico [(13S)-HOTE]
 15 [(13S)-HOTE]



y

(13S,9Z,11E)-13-hidroxiocetadeca-9,11-dienoico [(13S)-HODE]



20 Estos compuestos antiinflamatorios de la invención pueden obtenerse a partir de ciertas especies de microalgas mediante extracción de la biomasa con disolventes orgánicos. El extracto puede separarse mediante técnicas cromatográficas y obtenerse fracciones que contienen los compuestos antiinflamatorios. Dependiendo de los pasos de purificación,
 25 puede llegarse a la obtención de los compuestos puros. Por ejemplo el compuesto (13S)-HOTE se ha obtenido a partir de la biomasa seca de la microalga *Chlamydomonas debaryana*. El compuesto aislado presenta una alta actividad como inhibidor de la producción de $\text{TNF}-\alpha$, una importante citoquina proinflamatoria.

5 El agente antiinflamatorio puede usarse en forma pura o bien como un constituyente de un extracto o de una composición basada en la biomasa de microalgas, típicamente un extracto o composición de biomasa donde la concentración del agente antiinflamatorio es conocida a fin de que se pueda controlar la dosis. Además, otros componentes presentes en el extracto o la biomasa pueden reforzar los efectos del compuesto antiinflamatorio.

10 Por tanto, otra realización de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I), según se ha descrito anteriormente, en una forma pura o en un extracto o biomasa de microalgas.

15 Por "compuesto en una forma pura" o "compuesto puro" se entiende al compuesto obtenido a partir de un extracto natural mediante sucesivas etapas de purificación o bien sintetizado químicamente por métodos conocidos por un experto en la materia.

20 Por "biomasa de microalgas" se entiende a un material obtenido tras separación de la masa de microalgas del medio de cultivo y posterior secado.

25 Por "extracto de microalgas" se entiende la mezcla de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los compuestos de la invención, obtenida por tratamiento de la biomasa seca de microalgas con disolventes orgánicos, preferiblemente metanol, seguido de la evaporación del disolvente. Por extracto también consideramos una fracción del mismo, es decir, por "Fracción" se entiende una mezcla de compuestos orgánicos obtenida por separación de un extracto mediante técnicas cromatográficas.

30

En una realización preferida, las microalgas son de la clase Chlorophyceae o Trebouxiophyceae. Más preferiblemente son del género *Chlamydomonas*, *Nannochloris* o *Chlorella* y aún más preferiblemente de las especies *Chlamydomonas debaryana* o *Chlorella sorokiniana*.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de microalgas de la clase Chlorophyceae, preferiblemente del género *Chlamydomonas*, más preferiblemente de la especie *Chlamydomonas debaryana*, para la obtención del compuesto de fórmula general (I) descrito anteriormente.

10

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de microalgas de la clase Trebouxiophyceae, preferiblemente de los géneros *Nannochloris* o *Chlorella*, más preferiblemente de la especie *Chlorella sorokiniana* para la obtención del compuesto de fórmula general (I) anteriormente descrito.

15

Los compuestos de la invención, como se demuestra en los ejemplos se pueden utilizar como agentes antiinflamatorios.

20

Por “enfermedades inflamatorias del tracto digestivo” se refiere a enfermedades que cursan con procesos inflamatorios agudos y/o crónicos, de intensidad elevada o leve, producidas en el tracto digestivo, considerando como tal al sistema de órganos capaces de la ingestión, la digestión, la absorción y la excreción de alimentos en un animal, en especial en un humano. Estas enfermedades están particularmente asociadas a trastornos inmunológicos.

25

30

En particular por “enfermedades inflamatorias intestinales” se refiere en la presente invención a las que se producen en el tracto digestivo, especialmente en el intestino delgado y grueso, y que puede provocar una gran cantidad de síntomas en el individuo que lo padezca, como por ejemplo pérdidas de peso, sangre en heces y/o diarreas, entre otros, que

conlleven a un deterioro considerable en su calidad de vida. Estas enfermedades se pueden seleccionar de entre, aunque sin limitarse a, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

5 Además, en base a evidencias recientes que demuestran el desarrollo de ciertos procesos tumorales como consecuencia de patologías inflamatorias previas mal controladas, incluyendo le enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer colorrectal, los compuestos de la invención se pueden utilizar para la prevención del cáncer de colon.

10

Independientemente de la forma en la que se encuentre, puro o en un extracto o biomasa de microalgas, pero en particular cuando se trate del compuesto puro, el compuesto de la invención se formula para facilitar su aplicación y biodisponibilidad, preferiblemente con portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente.

15

El compuesto de la invención puede ser utilizado con otros ingredientes activos o fármacos que potencien los efectos antiinflamatorios o que ofrezcan otros beneficios adicionales. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o pueden ser proporcionados en una composición separada para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

20

Además, el compuesto de la invención puro o un extracto o una composición basada en la biomasa se puede formular sólo o con otros ingredientes, en la forma de polvos, gránulos, pastillas, suspensiones, disoluciones o emulsiones que pueden contener otros compuestos habitualmente usados en el ámbito de la preparación de este tipo de productos.

25

30

La dosificación del compuesto de la invención variará de acuerdo con la formulación particular, la condición inflamatoria específica a tratar y el modo de aplicación.

5 A lo largo de la presente descripción, el término “tratamiento” se refiere a eliminar, reducir o disminuir la causa o efectos de la enfermedad. Para los propósitos de esta invención, tratamiento incluye, aunque sin quedar limitados a los mismos, aliviar, disminuir o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad; reducir el grado de enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión
10 de la enfermedad, aliviar o mejorar el estado de la enfermedad y remitir (ya sea total o parcial).

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) descrito anteriormente y en cualquiera de sus formas, como aditivo en alimentos funcionales o complementos alimentarios o dietéticos.
15

De esta manera, los compuestos descritos en la presente invención se pueden utilizar, además de en composiciones farmacéuticas, en alimentos (incluidos los etiquetados como funcionales o nutraceúticos) o en complementos alimentarios o dietéticos no sólo para prevenir la aparición de procesos inflamatorios sino también para mejorar las defensas del organismo como parte del sistema inmune.
20

25 En la presente invención se entiende como “alimento funcional” a un alimento o complemento alimenticio incluidos los llamados “nutracéuticos”, que posee un efecto beneficioso sobre la salud.

30 Por “complementos alimentarios o dietéticos” se refieren a composiciones no alimenticias, es decir, que no son alimentos, pero que aportan a la dieta un efecto beneficioso sobre la salud, dichos complementos pueden

contener otro tipo de suplementos como vitaminas, antioxidantes, entre otros. Estas composiciones pueden ser administradas de la misma forma que lo descrito para las composiciones farmacéuticas.

5 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un alimento funcional o un complemento alimentario o dietético que comprende un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en la presente invención y en cualquiera de sus formas.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
15 siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

20 A continuación, la invención se ilustrará mediante una serie de ensayos realizados por los inventores.

EJEMPLO 1

25 Este ejemplo ilustra cómo se han aislado los ácidos 13-HOTE y 13-HODE a partir de microalgas y los métodos utilizados para su identificación.

Materiales y métodos

La cromatografía en columna se realizó con silica gel Merck (70-230 μm).
30 Las separaciones en HPLC se realizaron en un equipo LaChrom-Hitachi con columnas LiChrospher Si-60 (Merck) y un detector de UV L-7400. Los disolventes utilizados eran de calidad para su uso en HPLC. Los

espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian INOVA 600 utilizando CD₃OD como disolvente. Los desplazamientos químicos se referenciaron respecto a la señal del disolvente (δ_H 3.30 y δ_C 49.0). Los espectros COSY, HSQC, HMBC, and NOESY se realizaron utilizando las
5 secuencias de pulsos estándar de Varian.

Extracción y aislamiento de productos

La biomasa seca de la microalga *Chlamydomonas debaryana* se extrajo con una mezcla 1:1 de acetona-metanol. Tras la evaporación del
10 disolvente a presión reducida, el extracto obtenido se sometió a separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluida con mezclas de hexano-dietil éter de polaridad creciente y posteriormente con mezclas de cloroformo metanol de polaridad creciente. Las fracciones eluidas con dietil éter y con cloroformo-metanol (9:1 y 8:2) se
15 suspendieron en metanol-agua (9:1) y se pasaron a través de cartuchos RP-18. La disolución obtenida se evaporó a presión reducida y la mezcla resultante se separó mediante HPLC en fase normal utilizado como eluyente mezclas de cloroformo-metanol o hexano-isopropanol-ácido acético hasta la obtención de los compuestos puros.

20

Identificación de compuestos

El ácido (13S)-HOTE se identificó a partir de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN (Tabla 1), COSY,HSQC, HMBC y NOESY. La configuración absoluta en C-13 se estableció a partir del valor de la rotación óptica
25 (Yadav et al. 1992, *Tetrahedron* 58: 4465-4474).

El ácido (13S)-HODE se identificó a partir de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN (Tabla 2), COSY,HSQC, HMBC y NOESY. La configuración absoluta en C-13 se estableció a partir del valor de la rotación óptica
30 (Yadav et al. 1992, *Tetrahedron* 58: 4465-4474).

Tabla 1. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN del ácido 13-HOTE (600 MHz, CD_3OD)

# C	$\delta^{13}\text{C}$ m	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)	# C	$\delta^{13}\text{C}$ m	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
1	177.7 s		10	129.3 d	5.96 (dd, 10.9,10.9)
2	35.0 t	2.27 (t, 7.4)	11	126.6 d	6.49 (dd, 15.3,11.0)
3	26.1 t	1.59 (m)	12	136.7 d	5.63 (dd, 15.3,6.6)
4	30.1* t	1.32 (m)	13	73.3 d	4.10 (dt, 6.4,6.4)
5	30.2* t	1.32 (m)	14	36.3 t	2.29 (m), 2.24 (m)
6	30.3* t	1.32 (m)	15	125.5 d	5.35 (dt, 10.7,7.3,1.5)
7	30.7 t	1.38 (m)	16	134.6 d	5.45 (dt, 10.7,7.3,1.6)
8	28.6 t	2.19 (dt, 7.7,7.7)	17	21.7 t	2.05 (dc, 7.5,7.5)
9	133.0 d	5.40 (dt, 10.7,7.7)	18	14.5 c	0.95 (t, 7.5)

*Asignaciones intercambiables

5 Tabla 2. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN del ácido 13-HODE (600 MHz, CD_3OD)

# C	$\delta^{13}\text{C}$ m	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)	# C	$\delta^{13}\text{C}$ m	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
1	177.7 s		10	129.4 d	5.97 (dd, 11.1,11.1)
2	35.0 t	2.27 (t, 7.5)	11	126.5 d	6.48 (dd, 15.2,11.0)
3	26.1 t	1.59 (m)	12	137.3 d	5.60 (dd, 15.1,6.8)
4	30.1* t	1.30 (m)	13	73.4 d	4.07 (dt, 6.4,6.4)
5	30.2* t	1.30 (m)	14	38.4 t	1.52 (m), 1.46 (m)
6	30.3* t	1.30 (m)	15	26.3 t	1.30 (m)
7	30.7 t	1.39 (m)	16	33.0 t	1.30 (m)
8	28.6 t	2.18 (dt, 7.5,7.5)	17	23.7 t	1.30 (m)
9	132.9 d	5.40 (dt, 10.8,7.8)	18	14.4 c	0.90 (t, 7.0)

*Asignaciones intercambiables

EJEMPLO 2

Este ejemplo ilustra la actividad de los compuestos puros en ensayos de actividad antiinflamatoria *in vitro*.

5 Metodología

Las células del sistema inmune responden a diversos estímulos secretando una gran cantidad y diversidad de citoquinas. En el proceso inflamatorio, entre estas citoquinas destaca el TNF- α , que tiene un papel fundamental en las fases más tempranas del proceso (Popa et al. 2007, *J. Lipid Res.* 10 48: 751-762).

La medida de la actividad antiinflamatoria se realizó sobre la línea de leucemia monocitaria humana THP-1, tras inducir su diferenciación a macrófagos con acetato-miristato de forbol (PMA) 0.2 μ M, y estimulando 15 la producción de citoquinas, durante 24h, con lipolisacárido (LPS) a una concentración de 1 μ g ml⁻¹. A las células diferenciadas se les adicionaron los compuestos puros 13-HOTE y 13-HODE obtenidos de microalgas (ejemplo 1) a una concentración de 50 μ M, concentración que no es citotóxica para THP-1. La producción de TNF- α se cuantificó por 20 enzoinmunoanálisis (ELISA) utilizando kits comerciales (Calbiochem, EMD Chemicals Inc. Alemania).

Inhibición de la citoquina TNF- α

La estimulación con LPS aumentó la producción de TNF- α desde 4.5 \pm 25 3.0 hasta 111.62 \pm 3.1 ng ml⁻¹, mientras que en presencia de los compuestos 13-HOTE y 13-HODE se redujo hasta 27.05 \pm 0.5 y 65.45 \pm 0.5 ng ml⁻¹, respectivamente, lo que supone una inhibición de la producción de TNF- α del 79 y 44 %, respectivamente. Por tanto, estos compuestos puros poseen una alta actividad antiinflamatoria, sobre todo 30 el compuesto 13-HOTE.

También se estudió el efecto de los compuestos 13-HOTE y 13-HODE sobre la producción de TNF- α por monocitos TPH-1 no diferenciados a macrófagos. La estimulación con LPS aumentó la producción de TNF- α desde 9.9 ± 3.3 hasta 31.5 ± 9.9 ng ml⁻¹, mientras que en presencia de los
5 compuestos se redujo hasta 9.8 ± 1.3 y 17.7 ± 0.79 ng ml⁻¹, para los compuestos 13-HOTE y 13-HODE, respectivamente, lo que supone una inhibición de la producción de TNF- α del 100 y 64 %, respectivamente. Por tanto, la acción antiinflamatoria de estos compuestos se ejerce tanto sobre monocitos como sobre macrófagos, y es especialmente notable en
10 el compuesto 13-HOTE.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra la actividad antiinflamatoria in vivo de la biomasa de
15 microalgas que contienen 13-HOTE y 13-HODE.

Se realizó un ensayo agudo (5 días) en ratas Wistar, valorando la actividad de un liofilizado de microalgas frente a la colitis intestinal inducida por el hapteno ácido trinitro-bencenosulfónico (TNBS; Morris et al. 1989,
20 *Gastroenterology* 96: 795-803). Cada gramo de liofilizado de microalga contenía 0.54 mg de 13-HOTE y 0.44 mg de 13-HODE. El TNBS se aplicó por vía rectal y el liofilizado en estudio (en suspensión en solución salina con Tween 80 al 5%, y a concentraciones de 100 y 400 mg kg⁻¹ de animal) fue administrado por vía oral, utilizando una sonda intragástrica de teflón.
25 El liofilizado se administró desde el día 1 al 5, y la colitis se indujo al tercer día de tratamiento. Este modelo experimental da lugar a una inflamación localizada y alteraciones en el colon con características similares a las que han sido encontradas en enfermedades inflamatorias crónicas en humanos. Los resultados que se obtienen de este estudio pueden orientar
30 sobre la capacidad preventiva y/o curativa de los compuestos, en un rango de dosis activas, incidiendo en la capacidad antiinflamatoria que tuvieran.

Se analizaron las variaciones de peso, las adherencias intestinales (escalas 0-3), la diarrea (escala 0-1) y la relación peso/longitud total del colon aislado (g cm^{-1}). Igualmente se hicieron valoraciones del daño determinándose el daño macroscópico y microscópico en el colon de cada animal. La administración intracolónica de 10 mg de TNBS produjo en los animales un cuadro importante de colitis aguda, con una importante pérdida de peso corporal y aumento de diarrea. Los cambios en la fracción colónica estaban asociados a un incremento significativo ($p < 0.01$) en la relación peso/longitud del colon ($0.169 \pm 0.01 \text{ g cm}^{-1}$ en tratados con TNBS, frente a $0.081 \pm 0.004 \text{ g cm}^{-1}$ en control sano). Los resultados obtenidos en los animales tratados con el liofilizado sugerían, en conjunto, cambios indicativos de cierta mejoría. El liofilizado redujo moderadamente la pérdida del peso corporal y provocó un marcado descenso en la presencia de diarrea y las adherencias a la dosis más alta (400 mg kg^{-1}). En cuanto a la relación peso/longitud del colon se observó una disminución con ambas dosis ensayadas, siendo significativa ($p < 0.01$) a la dosis de 100 mg kg^{-1} . Los datos obtenidos tras la medición de la superficie ulcerada reflejan que ambas dosis del liofilizado (100 y 400 mg kg^{-1}) atenuaron significativamente la extensión y severidad del daño colónico. Estas dosis fueron capaces de reducir la superficie ulcerada en más de un 30% en comparación con el control TNBS.

Para el estudio histológico, las muestras fijadas e incluidas en parafina, fueron cortadas a $5-7 \mu\text{m}$ de grosor y teñidas con hematoxilina/eosina. En los cortes histológicos obtenidos tras el tratamiento con el liofilizado, se detectaron menores descamaciones de las células epiteliales y se observó una mejor conservación de la estructura glandular. Además, se detectó una disminución de infiltrado inflamatorio con respecto al control TNBS y un menor tamaño de la capa necrótica superficial.

El estudio se completó con dos pruebas bioquímicas en muestras de colon; se determinó la actividad de enzima mieloperoxidasa (MPO); esta actividad se relaciona con el grado de inflamación, ya que se trata de una enzima constitutiva de los neutrófilos, y permite estimar el grado de infiltración neutrofílica. Se cuantificó la MPO mediante una prueba colorimétrica, basada en la oxidación dependiente de H_2O_2 de un donador de electrones artificial (TMB). Los resultados se expresan como unidades de actividad de la enzima por mg de tejido ($U\ mg^{-1}$). Los resultados indicaron que la concentración mayor de liofilizado disminuyó significativamente ($p < 0.01$) el infiltrado inflamatorio. Se observó un descenso de la MPO desde $7.37 \pm 0.42\ U\ mg^{-1}$ (TNBS) hasta $6.89 \pm 0.54\ U\ mg^{-1}$ (TNBS y $100\ mg\ kg^{-1}$ del liofilizado) y hasta $2.55 \pm 0.28\ U\ mg^{-1}$ (TNBS y $400\ mg\ kg^{-1}$ del liofilizado), siendo de $2.15 \pm 0.31\ U\ mg^{-1}$ el valor correspondiente a los controles sanos.

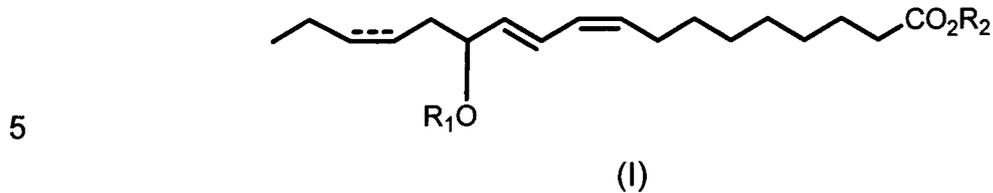
15

Todos estos resultados muestran la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los ácidos 13-HOTE y 13-HODE y la capacidad in vivo de un preparado que los contiene para prevenir daños similares a los observados en enfermedades inflamatorias intestinales en humanos.

20

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula general (I):



donde: ----- representa un enlace doble o simple;

10 R_1 se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_{10}), alquenilo (C_2-C_{10}), alquinilo (C_2-C_{10}) o un grupo acilo; y

15 R_2 se selecciona de entre hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_{10}), o cualquiera de sus sales o esteroisómeros farmacéuticamente aceptables, excepto el compuesto donde ----- es un enlace sencillo y R_1 y R_2 son hidrógeno, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias del tracto digestivo.

2.- Uso según la reivindicación 1, donde R_1 es hidrógeno.

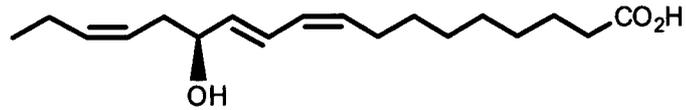
20

3.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R_2 es hidrógeno.

25 4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde ----- representa un doble enlace.

5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde ----- representa un enlace sencillo.

6. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula:



5 7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la enfermedad es intestinal.

8.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad del tracto digestivo se selecciona de entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

9.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto de fórmula (I) se encuentra en una forma pura o en un extracto o biomasa de microalga.

10.- Uso según la reivindicación anterior, donde la microalga es de la clase Chlorophyceae o Trebouxiophyceae.

11. Uso según la reivindicación anterior, donde la microalga es del género *Chlamydomonas*.

12.- Uso según la reivindicación anterior, donde la microalga es de la especie *Chlamydomonas debaryana*.

13. Uso según la reivindicación 10, donde la microalga es del género *Nannochloris* o *Chlorella*

14.- Uso según la reivindicación anterior, donde la microalga es de la especie *Chlorella sorokiniana*.

30

15.- Uso de un compuesto de fórmula (I) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, como aditivo en alimentos funcionales o complemento alimentarios o dietéticos.

5 17.- Alimento funcional que comprende un compuesto de fórmula (I) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10 18.- Complemento alimentario o dietético que comprende un compuesto de fórmula (I) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.



②¹ N.º solicitud: 201200097

②² Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2012

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 29020137780 A1 (WU) 26.09.2002, página 3, párrafo 0020, reivindicaciones	1-18
A	US 20060058269 A1 (LOCKWOCK ET AL) 16.03.2006, Página 8, párrafo 0067, tabla 3, página 42, párrafo 0168	1-18
A	GERWICK et al. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - LIPIDS AND LIPID METABOLISM, 19940324 ELSEVIER SCIENCE BV. AMSTERDAM, NL 24/03/1994 VOL: 1211 No: 3 Pags: 243 - 255 ISSN 0005-2760 Doi: doi:10.1016/0005-2760(94)90147-3, todo el documento.	1-18
A	US 7202276 B2 (BUCHANAN MICHAEL ET AL.) 10.04.2007, columna 1, primer párrafo, columna 8, primer párrafo.	1-18
A	US 2006128803 A1 (KLIMKO PETER G ET AL.) 15/06/2006, todo el documento	1-18
A	US 2006293288 A1 (SERHAN CHARLES N ET AL.) 28/12/2006, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
16.07.2013

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/202 (2006.01)

A61K31/201 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, NPL, BIOSIS, EMBASE, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 29020137780 A1 (WU)	26.09.2002
D02	US 20060058269 A1 (LOCKWOCK et al)	16.03.2006
D03	GERWICK et al. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - LIPIDS AND LIPID METABOLISM, 19940324 ELSEVIER SCIENCE BV. AMSTERDAM, NL 24/03/1994 VOL: 1211 No: 3 Pags: 243 - 255 ISSN 0005-2760 Doi: doi:10.1016/0005-2760(94)90147-3, todo el documento.	24.03.1994
D04	US 7202276 B2 (BUCHANAN MICHAEL et al.)	10.04.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general I y específicamente a dos compuestos denominados 13-hidroxiocetadecatrienoico (13-HOTE) y 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias del tracto digestivo. Se reivindica así mismo su uso como aditivo en alimentos funcionales y complemento alimentario o dietético.

El documento D1 se refiere a un método para disminuir la inflamación asociada con la inflamación crónica intestinal, se utilizan diferentes agentes y entre ellos se citan los compuestos 13-HODE y 13-HOTE (ver página 3, párrafo 0020 y reivindicación 1-3).

En el documento D2 se citan los compuestos denominados como eicosanoides y su utilización en la inflamación, así entre otros se refiere a compuestos derivados de hidroxiocetadecadienoicos (ver página 8, párrafos 0066 y 0067). En la tabla 3 se cita el compuesto 13-HODE y en la página 42, párrafo 0168 se refiere la utilización de estos compuestos como nutraceúticos y como suplementos alimenticios.

El documento D3 es una revisión sobre la estructura y biosíntesis de oxilipinas procedentes de algas marinas.

En el documento D4 se citan preparaciones dietéticas y farmacéuticas de 13-HODE y su utilización para la biocompatibilidad celular endotelial.

Por lo tanto, a la vista del documento D1 las reivindicaciones 1- 16 que se refieren al uso de los compuestos citados en la reivindicación 1 en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias del tracto digestivo, carecen de novedad y de actividad inventiva. Las reivindicaciones 17 y 18 también carecen de novedad y de actividad inventiva ya que los compuestos citados son conocidos así como su uso como agentes nutraceúticos y dietéticos (ver documento D1, D2 y D4).

En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-18 de la presente solicitud carecen de novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.