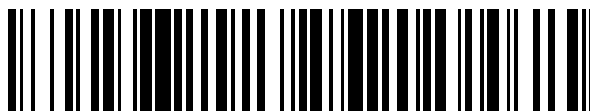


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 212**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009** **E 09726179 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 2285388**

54 Título: **Uso de oleuropeína y derivados en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 y patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas**

30 Prioridad:

27.03.2008 IT MI20080514

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE (100.0%)
Piazza San Marco, 4
50121 Firenze, IT

72 Inventor/es:

BERTI, ANDREA;
STEFANI, MASSIMO y
RIGACCI, STEFANIA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 475 212 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 oleuropeína y derivados en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 y patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas.

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere al uso de oleuropeína en forma no glicosilada en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Además, esta invención se refiere al uso de oleuropeína en forma no glicosilada en el tratamiento de patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas donde la patología es diabetes mellitus tipo 2. Específicamente, esta invención se refiere al uso de oleuropeína en forma no glicosilada para preparar una fórmula farmacéutica para el tratamiento profiláctico y terapéutico de patologías asociadas a o que derivan de un depósito amiloide donde la patología es diabetes mellitus tipo 2.

ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] Es un hecho bien conocido que la diabetes mellitus no insulino-dependiente tipo 2 (NIDDM) se caracteriza por la presencia de islotes pancreáticos de sustancia amiloide, que comprende principalmente agregados de un péptido, amilina (hI-APP).

[0003] Los depósitos de amiloide pueden observarse en aproximadamente el 90% de los pacientes de NIDDM, y hoy en día se cree que es una de las principales causas de esta enfermedad. La amilina (hIAPP) es un péptido de 37 aminoácidos co-secretados con la insulina por las células β de los islotes en respuesta a un aumento de la concentración de glucosa en sangre. La amilina se caracteriza por una solubilidad limitada y una alta propensión a generar fibrillas, a través de un proceso de nucleación de varias fases.

[0004] La investigación científica participa naturalmente en gran medida intentando identificar nuevas moléculas capaces de inhibir la formación de agregados amiloides de hIAPP, que se usarán en el tratamiento profiláctico y terapéutico de NIDDM y en todas las patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas.

[0005] Al-Azzawie y col.; Life Science 2006, 78, 1371-1377 desvela el uso de oleuropeína para tratar y prevenir la diabetes mellitus tipo I. Al-Azzawie y col. se refieren al efecto antioxidante de la oleuropeína en conejos con diabetes aloxánica.

[0006] El documento US 2006/0177530 desvela el uso de oleuropeína para tratar una neuropatía diabética.

[0007] Los documentos KR 2005/0078709 y KR 2005/0107897 desvelan ambos el uso de composiciones que comprenden oleuropeína para tratar una plétora de enfermedades (hipertensión, diabetes, arteriosclerosis, enfermedades víricas, hipertermia, malaria, inflamación, tos, gripe, etc.) en base a las propiedades antioxidantes de la oleuropeína.

[0008] El documento WO02009066021, desvela el uso de extractos de aceite de oliva rico en oleocantal para el tratamiento de afecciones del metabolismo lipídico. En particular, se demuestra que el oleocantal puede tener un efecto positivo también en la actividad de la insulina y en captación de glucosa. El documento US2004097428 describe un procedimiento para inhibir el cáncer, la formación de cicatrices, alterar el citoesqueleto celular y otorgar resistencia frente a infección, comprendiendo dicho procedimiento la administración de oleuropeína y/o sus productos de hidrólisis.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] El sujeto de esta invención es el uso de oleuropeína en forma no glicosilada para la preparación de una fórmula farmacéutica como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

[0010] A este fin, se explican y se reivindican formas preferidas de esta invención, como se indica en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] La familia de las oleáceas (Oleaceae) incluye plantas muy interesantes, la más famosa de las cuales es el olivo (*Olea Europaea subsp. Europaea*). La familia Oleaceae incluye 27 géneros y entre 400 y 900 especies diferentes.

[0012] El olivo (*Olea Europaea*) es una planta frutal, y sus frutos, aceitunas, se usan por su aceite. El aceite de oliva contiene muchos polifenoles. La oleuropeína es el polifenol secoiridoide que, en forma glicosilada, es característico de las oleáceas, y específicamente de *Olea Europea*. Los secoiridoidees son derivados estructurales de los iridoidees (que tienen un anillo ciclopentano que generalmente se condensa a un anillo heterocíclico oxigenado de 6 miembros) para la apertura del anillo ciclopentano tras la oxidación y la ruptura de un enlace carbono-carbono.

[0013] La oleuropeína glicosilada ((4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etiliden-6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-4H-piran-3-carboxilato de metilo) es una única especie química, bien caracterizada por el peso molecular de 540,51 y la fórmula molecular $C_{25}H_{32}O_{13}$. Es hidrosoluble en forma glicosilada, y fuertemente apolar en forma no glicosilada.

[0014] La hidrólisis de la oleuropeína, causada por las glucosidasas del olivo durante la maduración y el proceso tecnológico involucrado en la extracción de aceite de oliva extra virgen, desencadena la liberación de la aglicona que se divide en la fase oleosa.

[0015] En el sistema experimental, se ha aplicado la desglicosilación incubando 5,5 μ moles de oleuropeína glicosilada (obtenida de la empresa Extrasynthese) en un tampón de fosfato sódico 0,1 M a pH 7,0 (final 10 mM) con 7,55 U.I. de β -glucosidasa de almendra (EC 3.2.1.21). Por lo tanto, la mezcla de reacción se centrifugó a 18.000 rpm durante 10 minutos, con el fin de recoger la oleuropeína aglicona que se había convertido en insoluble en un entorno acuoso. El análisis con espectrómetro de masas del precipitado permitió la determinación de la pureza del producto. El precipitado disolvió de nuevo completamente en DMSO y se almacenó en la oscuridad.

[0016] El Solicitante se sorprendió al apreciar que la oleuropeína aglicona tenía una gran capacidad para inhibir el amiloide de amilina (hIAPP).

[0017] El Solicitante determinó la cinética de agregación de hIAPP, tanto en presencia como en ausencia de oleuropeína aglicona como se ha descrito previamente, por medio del ensayo de la tioflavina T (ThT). El ensayo ThT se usa ampliamente para controlar la aparición de oligómeros y polímeros ricos en β proteína y péptidos, y se basa en el aumento de la fluorescencia a 485 nm, tras la excitación a 440 nm, del ThT cuando interactúa con estructuras de tipo amiloide. El ensayo ThT se ha realizado usando diversas concentraciones diferentes de oleuropeína aglicona para generar las diversas relaciones molares entre ésta y el péptido.

[0018] El ensayo se realizó diluyendo la amilina (disuelta en origen en 80-100%, hexafluoroisopropanol (HFIP)) en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4 en presencia de HFIP al 1-4%, a concentraciones de entre 3,125 y 12,5 μ M, en presencia o ausencia de oleuropeína no glicosilada a concentraciones de 0,1 x, 2 x, 3 x y 10 x de concentración de amilina. La solución volúmica de oleuropeína aglicona, disuelta de nuevo tras la desglicosilación, con el fin de obtener 100 mM en dimetil sulfóxido (DMSO) se diluyó adicionalmente en el mismo tampón fosfato inmediatamente antes del uso, para obtener 100 x de concentración final. La incubación se realizó a 25 °C y, en diversos intervalos, se recogieron 50 μ L de solución de cada mezcla, que se diluyeron 8 veces en el tampón de glicina/NaOH 0,1 M pH 8,5 que contenía ThT 20 μ M. El valor de emisión de fluorescencia se normalizó cada vez en comparación con la de un blanco. Cada combinación de concentraciones de amilina y oleuropeína se ensayó al menos cinco veces, para poder calcular la desviación típica para cada punto.

[0019] Los resultados muestran que la inhibición de la agregación amiloide del hIAPP es dependiente de la dosis. De hecho, cuando se usa una relación de oleuropeína no glicosilada:hIAPP que varía entre 2:1 y 10:1, de acuerdo con las diferentes preparaciones de hIAPP y oleuropeína no glicosilada, se obtiene una inhibición casi completa (mayor del 90%) de la formación de agregados de ThT positivos.

[0020] Además, el Solicitante también realizó un estudio para aclarar los cambios estructurales provocados por la presencia de oleuropeína durante la agregación de amilina.

[0021] Se usaron análisis de dicroísmo circular para esto, ya que esta técnica permite la evaluación de estructuras secundarias y la estructura desordenada de los polímeros en solución. Se adquirieron espectros en la región del ultravioleta lejano (entre 195 y 295 nm) a 25 °C, acumulando 8 espectros sucesivos para cada análisis realizado a la velocidad de exploración de 50 nm/min. La diferencia entre el espectro blanco correspondiente se apreció frente a cada espectro de muestra. En la práctica, inmediatamente después de haberse disuelto a la concentración de 12,5 μ M en fosfato sódico 10 mM pH 7,4 y HFIP al 1%, se descubre que la amilina no está muy estructurada con una presencia mínima de la estructura secundaria. Después de 3 horas, el espectro muestra la conversión hacia una estructura rica en láminas β , caracterizada por un mínimo de aproximadamente 218 nm, sin ningún cambio en la solubilidad. Después de 24 horas, se apreció una reducción progresiva en la señal, debido a una precipitación incipiente del hIAPP presente en la muestra debido al alcance de las dimensiones de agregados críticos para su permanencia en suspensión. Por el contrario, la transición a la estructura β , con una propensión a agregado, se

inhibe ampliamente por la presencia de la oleuropeína en una concentración de 40 μ M. A las 3 y 24 horas, puede apreciarse una reducción significativa en la intensidad de la señal, indicativa de la precipitación. Sin embargo, el espectro no muestra ninguna característica debido a la presencia de la estructura β . Por lo tanto, en base a los ensayos experimentales que se han realizado anteriormente, parecerá que la oleuropeína no glicosilada interfiere con la acumulación amiloide de hIAPP, inhibiendo su transición a una estructura β y, al mismo tiempo, provoca la insolubilidad peptídica. El análisis con microscopio electrónico de agregados de amilina obtenidos en presencia y ausencia de oleuropeína ha mostrado un precipitado amorfo que se forma en presencia de oleuropeína. Todavía no somos completamente conscientes de la naturaleza de las interacciones entre la oleuropeína y hIAPP. Se puede presumir razonablemente que tales interacciones son de naturaleza hidrófoba e interfieren con las interacciones de la misma naturaleza que pueden participar en la estabilización de las estructuras beta intermoleculares. También se han realizado diversos experimentos en células de insulinoma de rata (la línea RIN-5f) para verificar la protección frente al efecto tóxico de los agregados amiloides de hIAPP por oleuropeína. Para este fin, se obtuvieron agregados de amilina incubando el péptido a la concentración de 3 μ M en fosfato sódico 10 mM pH 7,4, HFIP al 1% en presencia y ausencia de oleuropeína aglicona 30 μ M, a 25 °C durante 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 18 h, 48 h y 72 h. Al final, los agregados se diluyeron 100 veces en el medio de cultivo y se administraron a las células durante 24 h. Por lo tanto, la citotoxicidad del tratamiento se calculó en función de la reducción del reactivo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), un ensayo usado ampliamente para evaluar la vitalidad celular. El colorante, administrando durante 2 h a la concentración de 0,5 mg/ml, tras la reducción mitocondrial, da lugar a la formulación de un producto que, una vez solubilizado tras la lisis celular en SDS al 20%, *N,N*-dimetilformamida al 50%, se absorbe a 570 nm. Cada tratamiento se realizó en tres muestras, y también se realizaron tratamientos de control únicamente con oleuropeína o sólo medio de cultivo. Los experimentos se repitieron seis veces, con el fin de realizar análisis estadísticos. Los agregados de hIAPP muestran niveles de toxicidad que disminuyen según el tiempo dedicado al aumento *in vitro*. Partiendo de 30 min, sigue siendo estadísticamente significativo en estas condiciones hasta 3 h. Las células expuestas a los agregados de hIAPP en presencia de oleuropeína no muestran ninguna tolerancia significativa en comparación con los controles no tratados, y mostraron una recuperación significativa de la vitalidad en comparación con las células tratadas con hIAPP en solitario. El tratamiento con oleuropeína en solitario no informó de ninguna diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. A este respecto, también se realizó el tratamiento con dosis superiores de oleuropeína, hasta una concentración de 200 μ M, y nunca se descubrió que esto fuera significativamente tóxico para estas células.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de oleuropeína en forma no glicosilada para la preparación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas donde la patología es diabetes mellitus tipo 2.
- 2.** Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tratamiento es profiláctico y/o terapéutico.
- 10 **3.** Uso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1-2, donde la oleuropeína en forma no glicosilada se usa en la preparación de una formulación farmacéutica para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de diabetes mellitus tipo 2.
- 4.** Oleuropeína en forma no glicosilada para su uso en el tratamiento de patologías relacionadas con fenómenos de agregación de proteínas, donde la patología es diabetes mellitus tipo 2.