

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 378**

51 Int. Cl.:

A61K 36/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2007 E 07724084 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2004206**

54 Título: **Complejos de fosfolípidos de extractos de frutas del olivo que tienen una biodisponibilidad mejorada**

30 Prioridad:

13.04.2006 EP 06007820

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

24.09.2014

73 Titular/es:

**INDENA S.P.A. (100.0%)
VIA ORTLES, 12
20139 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**FRANCESCHI, FEDERICO y
GIORI, ANDREA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 498 378 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

Complejos de fosfolípidos de extractos de frutas del olivo que tienen una biodisponibilidad mejorada.

5 La presente invención se refiere a complejos de fosfolípidos de extractos de las frutas del olivo que tienen una biodisponibilidad mejorada.

Antecedentes tecnológicos

10 Los estudios sobre los principios activos de la *Olea europeae* realizaron por décadas, y sus propiedades se confirmaron recientemente en estudios experimentales y clínicos.¹

15 Se informó que la *oleuropeína*, el principal componente detectable en las hojas, es el compuesto responsable de la hipotensión, la dilatación coronaria y la acción antiarrítmica. En un estudio² los efectos antihipertensivo, diurético, antiarteriosclerótico, antioxidante e hipoglucémico de los triterpenoides aislados a partir de las hojas de *Olea europea* se confirmaron en un modelo de ratas genéticamente hipertensas sensibles a sal. El extracto de la hoja del olivo contiene además otros fitoquímicos sinérgicos que incluyen a la *rutina* y la *hesperidina*. Ellos son vitales en su capacidad para aumentar la resistencia de los capilares (vasos sanguíneos) y para regular su permeabilidad.

20 En lo que se refiere al aceite de oliva, varios estudios demostraron la importante función de los compuestos fenólicos contenidos en el mismo. Los principales componentes, tirosol, verbascósido e hidroxitirosol, son potentes inhibidores de la oxidación de las LDL *in vivo*,³⁻⁴ que se vincula a la formación de placas de aterosclerosis que se postulan para contribuir al desarrollo de la enfermedad cardíaca coronaria. El hidroxitirosol se reportó que reduce, solo, el riesgo de las enfermedades coronarias del corazón y la aterosclerosis⁵⁻⁶, siendo *in vitro* un inhibidor potente y dosis-dependiente de la oxidación de las LDL inducida por sulfato de cobre. Estos resultados además se obtuvieron en el modelo animal.⁷ El verbascósido demostró poseer acciones potentes de secuestro sobre los aniones superóxido y los radicales hidroxilo,⁸⁻⁹ y además para actuar como antioxidante para inhibir la peroxidación de los microsomas de hígado de ratón, de las mitocondrias de hígado de rata, la emólisis de eritrocitos inducida por radicales; su potencial antioxidante se reveló en muchos otros modelos experimentales.

30 Estudios recientes demostraron que los componentes fenólicos del aceite de oliva virgen, como el hidroxitirosol y sus derivados secoiridoides y metabolitos - a saber compuestos con una estructura orto-difenólica - ejercen fuertes efectos antioxidantes, así como otros biológicamente relevantes.¹⁰⁻¹¹ Aunque la mayoría de estos resultados se obtuvieron en sistemas *in vitro*,¹²⁻¹³ se acumulan además evidencias de las actividades biológicas de los compuestos fenólicos del aceite de oliva *in vivo*.¹⁴⁻¹⁵ El hidroxitirosol (HT) es aparentemente el más activo de los fenoles del olivo, demostró absorberse en los humanos de manera dosis-dependiente, aunque en grados diferentes según su formulación. Como un ejemplo, su incorporación en un yogur disminuye su biodisponibilidad en comparación con la existente después de la administración como un componente natural del aceite de oliva extra virgen.¹⁶

40 Por lo tanto, es altamente deseable encontrar derivados de extractos de las frutas del olivo que tengan una biodisponibilidad mejorada.

45 Compuestos complejos de extractos vegetales o de componentes purificados de ellos con fosfolípidos naturales, sintéticos o semisintéticos, se describieron, por ejemplo, en EP 209 038, EP 275 005, EP 283 713, EP 1 035 859 y EP 1 140 115. Los complejos que se mencionan mejoran la biodisponibilidad en plasma del extracto o el componente purificado, debido a su lipofiliidad. EP 275 005 indica que la formación de los complejos se lleva a cabo en un disolvente aprótico. EP 1 140 115 genéricamente menciona al etanol entre los diversos disolventes que se pueden utilizar para la preparación de los complejos mencionados, pero no proporciona ejemplos de preparaciones que hacen uso del etanol como disolvente. Además, los complejos descritos son complejos de fosfolípidos de proantocianidina A2, que son muy diferentes en la estructura química con respecto a los complejos de fosfolípidos de extractos de las frutas del olivo de la presente invención.

Descripción de la invención

55 La presente invención se refiere a complejos de fosfolípidos de extractos de las frutas del olivo.

Se encontró que los complejos de fosfolípidos de la invención proporcionan mayores niveles sistémicos de agente parental que los extractos etanólicos de las frutas del olivo no formulados.

60 Por lo tanto, la presente invención se refiere a complejos de fosfolípidos de extractos de las frutas del olivo que tienen una biodisponibilidad mejorada como se define en las reivindicaciones adjuntas.

65 En una primera modalidad, la invención se refiere a complejos de fosfolípidos de extractos acuosos de las frutas del olivo; en una segunda modalidad, la invención se refiere a complejos de fosfolípidos de extractos de las frutas del olivo etanólicos o etanólicos-acuosos.

De acuerdo con la invención, los fosfolípidos de tanto origen vegetal como sintético se pueden utilizar; particularmente se prefieren los fosfolípidos de soya, tales como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina.

5 De acuerdo con la invención, los complejos se preparan por adición del fosfolípido a los extractos de las frutas del olivo disueltos en un disolvente prótico, más en particular por adición del fosfolípido a la disolución de etanol del extracto de las frutas u hojas del olivo, a reflujo y con agitación. La suspensión resultante se concentra a presión reducida a un residuo que se seca después. La relación de fosfolípidos con respecto a los extractos de las frutas del olivo está en el intervalo de 10 a 1 p/p, una relación molar más preferible es 5:1 p/p.

10 La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo uno de los complejos de de fosfolípidos de los extractos de las frutas del olivo de acuerdo con la invención, en una mezcla con un vehículo farmacéutico adecuado.

15 La presente invención se refiere más aun al uso de los complejos de fosfolípidos de los extractos de las frutas del olivo de la invención para la preparación de medicamentos que tienen acciones quimiopreventivas, antioxidantes y preventivas de las enfermedades cardiovasculares.

20 Los siguientes ejemplos ilustran más aun la invención.

Ejemplos

Preparación de los extractos de hojas o frutas de olivo

25 El extracto de las frutas del olivo que se utiliza en los ejemplos 3 y 4 se prepara como sigue. Frutas frescas (olivas) de *Olea europaea L.* se trituran, se amasan y se centrifugan para eliminar el aceite y parte del agua de la vegetación. El material resultante (pulpa de oliva) se extrae después con etanol acuoso (etanol:agua 6:4) a 60 °C y la pulpa agotada se descarga. Los extractos se filtran, se reúnen y se concentran para eliminar el etanol y las impurezas insolubles en agua se eliminan por centrifugación. La disolución clarificada se evaporó a presión reducida para obtener un extracto de fruta de olivo purificado seco (contenido total de fenoles mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu: 9.5% p/p).

30 Este extracto se purifica más aun en una resina de adsorción para obtener un contenido total de fenoles de un 30% p/p (ensayo de Folin-Ciocalteu) y se usa después en los ejemplos 1 y 2.

35 La preparación del extracto que se usa en el ejemplo 5 es similar a la del extracto que se usa en los ejemplos 3 y 4, y la única diferencia es que la pulpa de oliva se extrae con agua pura.

40 El extracto de hojas que se usa en los ejemplos 6 y 7 se prepara en su lugar por extracción de las hojas de *Olea europaea L.* con etanol acuoso (etanol:agua 9:1) a 70°C. Los extractos se filtran, se reúnen y se concentran para eliminar el etanol y las impurezas insolubles en agua se eliminan por centrifugación y se desechan. La disolución clarificada se seca a presión reducida para obtener un extracto de hoja de olivo seco purificado (contenido de polifenoles mediante el ensayo de HPLC: 20.8% p/p), que se utiliza en el ejemplo 6. Este extracto puede purificarse más aun en una resina de adsorción a fin de obtener un contenido total de fenol de un 41.6% p/p (ensayo de HPLC), después se usa para el ejemplo 7.

45 Ejemplo 1 - Preparación del complejo de fosfolípidos de un extracto etanólico purificado de las frutas del olivo

50 Los fosfolípidos de soya (150 g) se añaden de manera lenta a un reflujo de etanol (1.61) con agitación mecánica. La suspensión se somete a reflujo por 1 hora con agitación, después se añade una disolución de 50 g de extracto purificado de las frutas del olivo que se mantiene a 60 °C (fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu: 30% p/p; ensayo de HPLC: verbascósido 7.38% p/p) en 100 ml de alcohol acuoso (etanol-agua 7.5:2.5) Después de completar la adición, la mezcla se somete a reflujo con agitación por 1 hora, después se filtra. La disolución resultante se concentra por destilación hasta un 70% p/p de residuo seco, después se seca al vacío a 40 °C por 68 horas.

55 Se obtienen 158 g de producto con un contenido total de fenoles de 8.86% p/p por el ensayo de Folin-Ciocalteu y un contenido de verbascósido de 2.24% p/p por el ensayo de HPLC.

60 La solubilidad del producto en disolventes orgánicos es notablemente diferente de la del extracto de partida. De hecho, mientras que el extracto purificado de partida es insoluble en cloruro de metileno, cloroformo y acetona y sólo parcialmente soluble en etanol, el extracto acomplejado es soluble en cloruro de metileno y cloroformo e insoluble en acetona y etanol.

65 Los espectros de RMN de ¹H, ¹³C y ³¹P confirman la formación del complejo. Los datos más significativos de los análisis de RMN de ³¹P se reportan en la Tabla 1. Los fosfolípidos no acomplejados tienen una señal fuerte en el espectro de RMN de CDCl₃ ³¹P a δ 0.3 como se muestra para las entradas 1 y 3 en la Tabla 1. Los fosfolípidos acomplejados, por el

contrario, tienen una señal mucho más amplia a δ 0.7 (*vide* Δ valores) como se muestra para la entrada 2 en la misma Tabla. Los núcleos ^1H y ^{13}C *tienen* el mismo comportamiento que el ^{31}P en CDCl_3 . Los espectros de carbono y protón se muestran en el Anexo.

5

Producto	δ (ppm)	Δ (Hz)
Fosfolípidos de soya comercial	0.3	2.7
Complejo de fosfolípidos de las frutas del olivo	0.7	18.3
Mezcla del extracto etanólico de las frutas del olivo y fosfolípidos de soya	0.3	2.9

10

15 Ejemplo 2 - Preparación del complejo de fosfatidilcolina del extracto etanólico purificado de las frutas del olivo

Se disuelven 100 g de fosfatidilcolina en 1.6l de etanol. La mezcla se somete a reflujo con agitación mecánica después se añade gota a gota a una disolución que se obtiene de disolver 50 g de extracto purificado de las frutas del olivo (fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu: 30% p/p; ensayo de HPLC: 7.38% verbascósido p/p) en 100 ml de alcohol acuoso (etanol-agua 7.5:2.5) que se mantiene a 60 °C. Después de completar la adición, la mezcla se somete a reflujo con agitación por 1 hora, después se concentra hasta un 70% p/p de residuo seco y al final se seca al vacío a 40 °C por 68 horas.

20

Se obtienen 150 g de producto con un 10% p/p de contenido total de fenoles por el ensayo UV de Folin-Ciocalteu y 2.46% p/p de contenido de verbascósido por el ensayo de HPLC. Los espectros de RMN del producto son similares a los que se obtienen en el Ejemplo 1.

25

Ejemplo 3 - Preparación del complejo de fosfolípidos del extracto total de las frutas del olivo

Se añaden de manera lenta 150 g de fosfolípido a 1.6l de reflujo de etanol con agitación mecánica. Después de la finalización de la adición, la suspensión se somete a reflujo por 1 hora, con agitación. Una disolución de 50 g de extracto purificado de las frutas del olivo (contenido total de fenol por el ensayo de Folin-Ciocalteu: 9.5% p/p) en 100 ml de alcohol acuoso (etanol-agua 7.5:2.5) que se mantiene a 60 °C se añade gota a gota. Después de completar la adición, la mezcla se somete a reflujo con agitación por 1 hora y después se filtra. La disolución resultante se concentra hasta un 70% p/p de residuo seco, después se seca al vacío a 40 °C por 68 horas.

35

167 g del complejo de fosfolípidos de soya del extracto total de las frutas del olivo se obtienen con un 2.7% p/p de contenido total de fenoles por el ensayo UV de Folin-Ciocalteu. Los espectros de RMN del producto son similares a los obtenidos en el Ejemplo 1.

40

Ejemplo 4 - Preparación del complejo de fosfatidilcolina del extracto total de las frutas del olivo

Se disuelven 100 g de fosfatidilcolina en 700 ml de etanol, y la mezcla se somete a reflujo con agitación mecánica. Una disolución de 50 g de extracto purificado de las frutas del olivo (contenido total de fenoles por el ensayo de Folin-Ciocalteu: 9.5% p/p) en 100 ml de alcohol acuoso (etanol-agua 7.5:2.5) que se mantiene a 60 °C se añade gota a gota. Después de completar la adición, la mezcla se somete a reflujo con agitación por 1 hora, después, la disolución se concentra por destilación a presión atmosférica hasta un 70% p/p de residuo seco, después se seca al vacío a 40 °C por 68 horas.

45

175 g de producto se obtienen con un 4.1% p/p de contenido total de fenoles por el ensayo UV de Folin-Ciocalteu. Los espectros de RMN del producto son similares a los que se obtienen en el Ejemplo 1.

50

Ejemplo 5 - Preparación del complejo de fosfolípidos del extracto total acuoso de las frutas del olivo

100 g de fosfolípidos se disuelven en etanol (1250 ml) y se someten a reflujo con agitación mecánica. 50 g del extracto acuoso total de las frutas del olivo (contenido total de fenoles por el ensayo de Folin-Ciocalteu: 6.8% p/p) se añadieron de manera lenta a la mezcla. Después de completar la adición, la mezcla se somete a reflujo con agitación por 1 hora y después se filtra. La disolución resultante se concentra hasta un 70% p/p de residuo seco, después se seca al vacío a 40 °C por 68 horas.

55

Se obtienen 139 g de producto con un 2.3% p/p de contenido total de fenoles por el ensayo UV de Folin-Ciocalteu. Los espectros de RMN del producto son similares a los que se obtienen en el Ejemplo 1.

60

Ejemplo 6 - Preparación del complejo de fosfatidilcolina del extracto total de etanol de hojas de olivo (sólo como ilustración)

5 100 g de extracto total hidroalcohólico de hojas de olivo (contenido de polifenoles por el ensayo de HPLC: 20.8% p/p) se disuelven en una disolución de 128 g de fosfatidilcolina en 2570 ml de etanol. La disolución resultante se somete a reflujo por 1 hora, después se concentra a presión reducida hasta una suspensión que tiene un 70% p/v de residuo seco. El producto se seca finalmente a 40 °C al vacío por 24 horas para rendir 218 g de un producto marrón claro (polifenoles por el ensayo de HPLC: 9.3% p/p). Los espectros de RMN del producto son similares a los obtenidos en el Ejemplo 1.

10 Ejemplo 7 - Preparación del complejo de fosfatidilcolina del extracto etanólico purificado de hojas de olivo (sólo como ilustración)

15 100 g de extracto hidroalcohólico purificado de hojas de olivo (polifenoles por el ensayo de HPLC: 41.6% p/p) son disueltos en una disolución de 115 g de fosfatidilcolina en 2570 ml de etanol. La disolución resultante se somete a reflujo por 1 hora, después se concentra a presión reducida hasta una suspensión que tiene un 70% p/p de residuo seco. El producto se secó al final a 40 °C al vacío por 24 horas para rendir 196 g de un producto marrón claro (polifenoles por el ensayo de HPLC: 18.8% p/p). Los espectros de RMN del producto son similares a los obtenidos en el Ejemplo 1.

20 Sección experimental

Se realizaron pruebas para comparar la biodisponibilidad de los complejos de fosfolípidos de la invención con los de las frutas del olivo no acomplexados o extractos etanólicos de las hojas.

25 La biodisponibilidad de los fenoles en el tiempo y los intervalos de dosis se evaluaron a través de la evaluación de la excreción urinaria durante un tiempo de 24 horas, como HT total y como su metabolito más representativo, es decir alcohol homovanililo (HVA1c); después de la administración de un extracto altamente estandarizado de las frutas del olivo tanto en las formas no acomplexadas y acomplexadas con fosfolípidos a voluntarios.

30 En adición, los efectos de los tratamientos sobre la excreción de isoprostanos urinarios, un marcador aceptado de la peroxidación lipídica sistémica formado por la oxidación no enzimática del ácido graso altamente insaturado, ácido araquidónico, se evaluaron.

35 Seis voluntarios masculinos sanos se asignaron a dos grupos de tres cada uno. Al primer grupo se le administraron los complejos de la invención, a partir de ahora referido como OLEASELECT™ Phytosome®. Al segundo grupo se le administró un extracto altamente estandarizado de las frutas del olivo en forma no acomplexada, de ahora en adelante referido como OLEASELECT™.

40 Todos los sujetos se sometieron por tres días a una dieta libre de aceite de oliva (período de lavado), después se dan, respectivamente, ya sea OLEASELECT™ Phytosome®, u OLEASELECT™, una cápsula por primera vez, dos cápsulas la segunda vez, y cuatro cápsulas la tercera vez, con una semana entre cada administración. La orina de las 24 horas se recogió el día antes y el día después de los tratamientos. El volumen urinario se midió y se almacenaron alícuotas a -80 °C.

45 Las concentraciones urinarias de HT y su metabolito alcohol homovanililo (HVA1c) se evaluaron antes y después del tratamiento. Las muestras se extrajeron y se incubaron con glucuronidasa y se analizaron por HPLC acoplada a espectrometría de masas.⁸ Las concentraciones urinarias de los isoprostanos F₂ se determinaron por inmunoensayo.⁹ Cada valor se normalizó a la concentración de creatinina (Metra Creatinina Assay Kit, Quidel) y se expresa como pg/mg de creatinina. Los resultados se analizaron para significación estadística por la prueba *t* de Student de dos colas para datos pareados.

50 El grupo que se trató con OLEASELECT™ Phytosome® mostró un porcentaje de HT y HVA1c que oscila entre 5.2 y 7.9. Este resultado demuestra un fuerte aumento de la biodisponibilidad oral. Además se observó una reducción dosis-dependiente de la excreción de isoprostanos.

55 El grupo que se trató con OLEASELECT™ solo mostró un porcentaje de HT y HVA1c en un intervalo entre 1 y 2.3, es decir, mucho más baja biodisponibilidad oral.

Referencias

- 60 1. L.I. Somova, y otros, J of Ethno Pharm 84, 299-305 (2003).
 2. L.I. Somova, y otros, J of South African Veterinary Ass 70, 14-17 (2003). ,
 3. F. Visioli, y otros, Atherosclerosis 117, 25-32 (1995).
 4. F. Visioli, C. Galli, Life Sci. 55, 1965-1971 (1994).
 5. A. Bonanome, y otros, Arterioscler. Thrombosis 12: 529-533 (1986).
 65 6. P. Grignaffini, y otros, Lancet 343, 1296-1297.

7. M. Salami, y otros, *Pharmacol. Res.* 31 275-279 (1995).
8. W. Panfen, y otros, *J Biochem Pharmacol* 51, 687-691 (1996).
9. O. Benavente-Garcia, y otros, *J Med Food* 5 (3)- 125-135 (2002).
10. Visioli F, y otros, *Circulation.* 2000;102:2169-2171.
- 5 11. Brenes M, y otros, *J Agric Food Chem.* 1999;47:3535-40.
12. Visioli F, *Atherosclerosis.* 1995;117:25-32.
13. Fito M, *Lipids.* 2000;35:633-8.
14. Miro-Casas E, *Clin Chem.* 2003;49:945-952.
15. Miro-Casas E, *Anal Biochem.* 2001;294:63-72.
- 10 16. Visioli F, *J Nutr.* 2003;133:2612-2615.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo que consiste en una mezcla seca de un extracto de frutas del olivo acuoso, etanólico o etanólico-acuoso, con una disolución alcohólica de fosfolípidos, en donde la relación de los fosfolípidos con respecto al extracto de las frutas del olivo está en el intervalo de 10 a 1 p/p.
2. El complejo de la reivindicación 1, en donde los fosfolípidos son fosfolípidos de soya.
- 10 3. El complejo de la reivindicación 1 o 2, en donde la relación de los fosfolípidos con respecto al extracto de las frutas del olivo está en el intervalo de 5 a 1 p/p.
4. El complejo de las reivindicaciones 1-3, en donde la disolución alcohólica de fosfolípidos es una disolución etanólica.
- 15 5. Un proceso para la preparación del complejo de las reivindicaciones 1-4, en donde un extracto de las frutas del olivo acuoso, etanólico o acuoso-etanólico se hace reaccionar con fosfolípidos en un disolvente alcohólico y el complejo después se aísla por concentración y secado.
6. El proceso de la reivindicación 5, en donde el solvente alcohólico es etanol.
- 20 7. Composiciones farmacéuticas que contienen como principio activo un complejo como el reivindicado en las reivindicaciones 1 a 4, en mezcla con un vehículo farmacéutico adecuado.
8. El uso del complejo de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de medicamentos que tienen acciones quimiopreventivas, antioxidantes y preventivas de enfermedades cardiovasculares.