

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 295**

51 Int. Cl.:

A61K 31/26 (2006.01)

A61K 36/31 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/EP2013/074201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13792389 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2919775**

54 Título: **Sulforafano para tratar o reducir la resistencia a la insulina del hígado**

30 Prioridad:

19.11.2012 SE 1251306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

**Anders Rosengren (50.0%)
Hejderidaregatan 21
271 57 Ystad, SE y
Annika Axelsson (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROSENGREN, ANDERS y
AXELSSON, ANNIKA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 628 295 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

Sulforafano para tratar o reducir la resistencia a la insulina del hígado

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de la resistencia a la insulina del hígado.

5 Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus tipo 2 es un trastorno metabólico que se caracteriza por una alta glucosa en sangre en el contexto de la resistencia a la insulina (IR) y la deficiencia relativa de insulina. La diabetes tipo 2 representa aproximadamente 90% de los casos de diabetes y se piensa predominantemente que está causada por la obesidad, que resulta de un desequilibrio sostenido entre la ingesta de energía y el gasto. Se calcula que más de un tercio de la población adulta de los EE.UU. de más de 20 años de edad tenía el síndrome de resistencia a la insulina en el año 2000 y, por lo tanto, están en alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Ford ES. "Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S." Diabetes Care 28: 2745-2749, 2005).

La diabetes tipo 2 se trata inicialmente con modificaciones dietéticas y aumento de ejercicio. Si los niveles de glucosa en la sangre no se reducen a un nivel adecuado, los pacientes suelen ser tratados con una serie de medicamentos estándar tales como metformina, un fármaco antidiabético oral de la clase biguanida. La metformina necesita ser regulada a los requerimientos individuales del paciente y en casos raros, la metformina puede causar acidosis láctica. Todos los pacientes no responden a la metformina y no se administra a pacientes con insuficiencia renal. Para los pacientes que no responden a metformina, se administran tiazolidinadonas para mejorar la captación de glucosa y el perfil lipídico en sangre. Sin embargo, el tratamiento con tiazolidinadiona se ha relacionado con el aumento de la mortalidad en grandes estudios prospectivos, por lo que las tiazolidinadonas se prescriben ahora con gran cuidado.

Muchos tejidos, incluyendo el hígado, el músculo esquelético y los adipocitos, manifiestan resistencia a la insulina (Groop LC et al. "Role of free Fatty acids and insulin in determining free fatty acid and lipid oxidation in man". J Clin Invest 87:83-89, 1991). Aunque en muchos individuos la resistencia a la insulina se desarrolla simultáneamente en múltiples órganos, la severidad de la resistencia a la insulina puede diferir entre los diversos tejidos. Los medicamentos actuales no se dirigen a un tejido específico, sino a la resistencia a la insulina en general. Los sujetos que sufren de resistencia a la insulina, en los que la resistencia a la insulina es más prominente en el tipo de tejido se beneficiarían del tratamiento dirigido a este tejido. Aunque los medicamentos actuales no se dirigen a un tejido específico, los métodos actuales permiten la cuantificación de órganos que son resistentes a la insulina, así como la cuantificación de la magnitud de la resistencia a la insulina en cada órgano.

El metabolismo de la glucosa está controlado por una interacción compleja de tejidos metabólicamente activos. La glucosa es absorbida por los músculos en un proceso mediado por la insulina. Cuando el tejido muscular es resistente a la insulina, disminuye la captación de glucosa, lo que conduce a una mayor glucosa en la sangre. El tejido graso almacena los lípidos de la sangre, en un proceso que también está regulado por la insulina. Por último, el hígado desempeña un papel importante en la regulación de la glucosa en sangre mediante la regulación de la producción de glucosa. La insulina inhibe la producción de glucosa del hígado. Por lo tanto, si el hígado es resistente a la insulina, la producción de glucosa no se inhibirá adecuadamente después de una comida, lo que contribuirá a la alta glucemia.

Se ha demostrado que algunos pacientes con diabetes tipo 2 tienen principalmente perturbaciones en la sensibilidad a la insulina muscular, mientras que la resistencia a la insulina hepática es predominante en otros pacientes (Shulman, G.I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance". J. Clin. Invest. 106, 171-176.; Jornayvaz y Shulman, "Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C ϵ and Hepatic Insulin Resistance", Cell 2012 15: 574-; Björnholm y Zierath. "Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes". Biochemical Society Transactions (2005) Volumen 33, parte 2).

Como sólo algunos pacientes con diabetes tipo 2 sufren de resistencia a la insulina hepática predominante, sería de interés específico un medicamento dirigido a la resistencia a la insulina en el hígado.

Por lo tanto, existe la necesidad de un nuevo tratamiento para tratar o reducir la resistencia a la insulina del hígado. Preferiblemente, dicho tratamiento debe tener efectos secundarios limitados. Además, dicho tratamiento debe usarse preferiblemente de manera segura en combinación con otros fármacos que son de uso común en pacientes resistentes a la insulina, tales como fármacos antidiabéticos, fármacos antihipertensivos, agentes reductores del colesterol e insulina.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención busca preferentemente mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias en la técnica anteriormente identificadas y desventajas individualmente o en cualquier combinación y

5 soluciona al menos los problemas mencionados anteriormente proporcionando sulforafano o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso en el tratamiento o la reducción de la resistencia a la insulina del hígado y/o para su uso en la mejora de la sensibilidad a la insulina hepática. Por lo tanto, la invención proporciona sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso en el tratamiento o reducción de la resistencia a la insulina del hígado y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina hepática, en el cual el índice de resistencia del hígado a la insulina, del sujeto a tratar, es más alto que la resistencia a la insulina de otro tejido metabólico.

10 Otras realizaciones de la invención se especifican en las reivindicaciones dependientes. Se ha demostrado que el sulforafano posee efectos específicos sobre la resistencia a la insulina del hígado. Su efecto sobre la resistencia a la insulina en otros órganos y tejido es mucho menos pronunciado, en caso de que estuviera activo. Estas propiedades previamente desconocidas proporcionan el uso de sulforafano en sujetos que sufren de resistencia a la insulina del hígado y en menor grado en otro tejido.

15 El sulforafano es un compuesto del grupo isotiocianato de compuestos organosulfurados. Se sabe que exhibe propiedades antimicrobianas y anticancerosas a partir de ensayos experimentales. Se puede aislar de las verduras crucíferas, como brócoli, coles de Bruselas o coles. El sulforafano está en numerosos ensayos clínicos (Clinical Trials.gov, un servicio de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos). Los estudios han demostrado que el sulforafano tiene baja toxicidad incluso a altas dosis, y no se han reportado eventos adversos graves en estudios en curso para otras indicaciones.

20 El sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, no sólo se puede usar para tratar o reducir la resistencia a la insulina del hígado y/o para mejorar la sensibilidad a la insulina hepática. También puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento y/o en la reducción de la resistencia a la insulina del hígado y/o para su uso en la mejora de la sensibilidad a la insulina hepática.

25 Además, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se puede usar en un método para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina del hígado y/o en un método para mejorar la sensibilidad a la insulina hepática. Dicho método comprende administrar a un mamífero, incluido el hombre, que necesita tal prevención y/o tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano.

De manera similar, como el sulforafano es eficaz para reducir la resistencia a la insulina del hígado, se puede usar sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, en el tratamiento y/o mejora de la tolerancia a la glucosa.

30 Cuando se usa para prevenir, tratar y/o reducir la resistencia a la insulina del hígado, la dosis diaria administrada de sulforafano es típicamente de 10 a 1000 μmol , tal como de 50 a 500 μmol , por ejemplo. 100 a 200 μmol de sulforafano. El sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se puede administrar de diversas maneras. Las rutas preferidas incluyen inyección, por ejemplo, inyección intraperitoneal y administración oral. En términos de peso corporal, la dosis diaria administrada de sulforafano administrada a un sujeto a tratar puede ser de 1 a 100 mg/kg del peso corporal de los sujetos, tal como 5 a 50 mg/kg del peso corporal de los sujetos, por ejemplo, aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal de los sujetos.

40 Como ya se ha descrito, cuando se usa sulforafano o un extracto de planta que comprende sulforafano para prevenir, tratar y/o reducir la resistencia a la insulina del hígado, se prefiere que el índice de resistencia a la insulina del hígado a tratar sea mayor que la resistencia a la insulina de otro tejido metabólico. Especialmente, se prefiere que el índice de resistencia a la insulina del hígado en el sujeto a tratar sea mayor que el índice de resistencia a la insulina de la grasa corporal o los músculos. Mientras que el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, es eficaz en la reducción de la resistencia a la insulina del hígado, no tiene actividad, o la tiene muy limitada, en otro tejido metabólico. Por lo tanto, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, sólo debe usarse para tratar la resistencia a la insulina del hígado. Los sujetos que sufren solamente de resistencia a la insulina en otro tejido metabólico que no sea el hígado, no pueden beneficiarse del tratamiento con sulforafano e incluso pueden verse afectados adversamente. Por lo tanto, es importante dirigirse sólo a los sujetos que sufren de resistencia a la insulina en el hígado.

50 De acuerdo con una realización, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se utiliza para prevenir, tratar y/o reducir la resistencia a la insulina del hígado en sujetos, cuya resistencia a la insulina de otro tejido metabólico que no sea el hígado, no aumenta.

55 De acuerdo con una realización, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se usa para mejorar el índice de sensibilidad a la insulina del hígado en sujetos cuyo índice de sensibilidad a la insulina del hígado es inferior a la sensibilidad a la insulina de otro tejido metabólico. Especialmente, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se puede usar para mejorar el índice de sensibilidad a la insulina del hígado en sujetos cuyo índice de sensibilidad a la insulina del hígado es inferior al índice de sensibilidad a la insulina de la grasa corporal o los músculos. Además, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se utiliza, según una realización, para mejorar el índice de sensibilidad a la insulina del hígado en sujetos, cuya sensibilidad a la insulina de otro tejido metabólico que no es el hígado, no disminuye.

El sulforafano se puede usar en forma aislada, con una pureza de al menos 99% en peso. Como se comprende fácilmente por el experto en la materia, el sulforafano aislado se formula típicamente en una composición farmacéutica con excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). Dicha composición farmacéutica comprenderá típicamente menos del 99% en peso de sulforafano. El experto en la materia está familiarizado con la práctica de formular sulforafano en una composición farmacéutica que comprende sulforafano. Ejemplos de tales formulaciones son conocidas en la técnica.

Además, el sulforafano se puede usar en forma de un extracto de planta que comprende sulforafano. Los extractos de plantas se pueden obtener de coles de Bruselas, repollo, coliflor, col china, col rizada, coles, brotes de brócoli, brócoli chino, brócoli raab, colinabo, mostaza, nabo, rábano, rúcula o berro.

10 Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de los que es capaz la invención serán evidentes y elucidados a partir de la siguiente descripción de realizaciones de la presente invención, haciéndose referencia a los dibujos adjuntos, en los que

15 La fig. 1 muestra los niveles de tolerancia de una prueba de glucosa oral a ratas tratadas con sulforafano en comparación con las ratas tratadas con vehículo (control);

La fig. 2 muestra niveles de tolerancia de una prueba de piruvato intraperitoneal a ratas tratadas con sulforafano en comparación con ratas tratadas con vehículo (control); y

20 La fig. 3 muestra la secreción hepática de glucosa de células hepáticas sensibles a la insulina (las primeras 6 barras) y resistentes a la insulina (inducidas por palmitato), no tratadas (Ctrl) o incubadas durante 24 horas con sulforafano (SFN).

Resumen detallado de las realizaciones preferidas

El sulforafano es el primer compuesto que tiene efectos específicos sobre la resistencia a la insulina en el hígado. Esto se basa en datos in vivo extensivos de animales tratados con dieta con alto contenido en fructosa, que es una forma clásica de inducir resistencia a la insulina sin ninguna modificación genética. Con la prueba oral de tolerancia a la glucosa, los inventores han encontrado que la tolerancia a la glucosa mejora significativamente después de dos semanas de inyecciones diarias con sulforafano (10 mg/kg). Los inventores también han realizado pruebas de tolerancia al piruvato por tratamiento intraperitoneal que reflejan específicamente la sensibilidad a la insulina en el hígado, con efecto positivo significativo del sulforafano. En la prueba de tolerancia a la insulina que mide la sensibilidad a la insulina en grasa y músculo, no se han observado efectos del tratamiento con sulforafano. Los experimentos se han repetido varias veces, también en animales con dieta rica en grasas, con resultados positivos.

El sulforafano ya está siendo probado clínicamente para otras indicaciones (cáncer y enfermedades inmunes) con muy baja toxicidad, incluso en dosis altas.

35 Esto hace que el sulforafano sea el primer fármaco potencial contra la resistencia a la insulina en el hígado. Una terapia más específica basada en sulforafano podría proporcionar así un mejor control de la enfermedad y por tanto, se podrían proporcionar menos efectos secundarios que los tratamientos existentes de Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina.

40 Se ha sugerido que los brotes de brócoli pueden mejorar la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos de tipo 2 (cf. Zahra Bahadoran et.al., "Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial" International Journal of Food Sciences and Nutrition, Nov 2012; 63 (7): 767-771). Se sugiere que el fortalecimiento del sistema antioxidante puede ser importante para prevenir la activación de estas vías, y que los brotes de brócoli son fuentes ricas en componentes bioactivos, incluyendo isotiocianatos, glucosinolatos, flavonoides, fenoles, carotenoides, vitaminas antioxidantes, selenio y especialmente sulforafano como potente inductor de enzimas antioxidantes. Un estudio doble ciego y controlado con placebo de pacientes diabéticos tipo 2 no reportó efectos nocivos de los ensayos de brotes de brócoli en polvo (BSP, del inglés *Broccoli Sprouts Powder*). Se midieron las concentraciones de glucosa en plasma y de insulina sérica en ayunas y se observó una mejora general para el grupo de BSP. Sin embargo, no se contabilizaron ni se esperaron efectos específicos del sulforafano sobre la resistencia a la insulina en el hígado. Por lo tanto, a partir de esta publicación, el experto en la materia no tendría ninguna razón para creer que el sulforafano fuera diferente de otros fármacos dirigidos a la resistencia a la insulina en general.

50 Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las realizaciones específicas preferidas descritas en la presente memoria descriptiva, por lo tanto, deben interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la descripción de ninguna manera. Además, aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a realizaciones específicas, no se pretende limitarla a la forma específica expuesta aquí. Mejor dicho, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas y son igualmente posibles otras realizaciones distintas a las

específicas anteriores dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas, por ejemplo, diferentes de las descritas anteriormente.

5 En las reivindicaciones, el término "comprende/que comprende" no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se pueden incluir características individuales en diferentes reivindicaciones, éstas pueden combinarse posiblemente ventajosamente, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa.

Además, las referencias singulares no excluyen una pluralidad. Los términos "un", "primero", "segundo" etc. no excluyen tampoco una pluralidad.

Experimental

10 Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y no deben ser interpretados de ninguna manera para limitar el alcance de la invención. Mejor dicho, la invención está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Estudio de los mecanismos y el efecto clínico del candidato a fármaco antidiabético sulforafano, identificado mediante análisis de red

15 Una estrategia atractiva para ampliar las opciones terapéuticas es el reposicionamiento de fármacos, lo que implica encontrar nuevas indicaciones, ya sea para los fármacos aprobados o para los miles de compuestos que han superado los ensayos toxicológicos pero que aún no han alcanzado el uso clínico. Un beneficio potencial con el reposicionamiento es que el camino hacia la implementación clínica puede ser considerablemente más corto en comparación con el desarrollo de nuevos fármacos. En un primer intento de utilizar los análisis de red genética para el reposicionamiento de fármacos, se identificó un panel de 50 genes que están perturbados en el hígado en T2D ('firma T2D'). Los genes se seleccionaron utilizando análisis de expresión diferencial, ensayos de causalidad, y un algoritmo de red bayesiana para identificar los genes que regulan la expresión de varios otros genes de la enfermedad ("reguladores clave"). Además, se recopiló una biblioteca de > 2500 firmas de fármacos derivadas del Mapa de Conectividad y de datos de microarrays públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) que son de particular relevancia para las enfermedades metabólicas. Una firma de fármaco representa genes para los que la expresión está significativamente afectada por un compuesto.

25 Las firmas de fármacos se hicieron coincidir con la firma de T2D usando el análisis de enriquecimiento en grupos de genes para encontrar fármacos que pudieran revertir genes de enfermedad expresados aberrantemente (los genes de T2D sobreexpresados deberían ser regulados a la baja en la firma del fármaco y viceversa). El compuesto de mayor clasificación fue el sulforafano, que es un isotiocianato contenido en las verduras. Entre los compuestos de mayor clasificación también estaban los fármacos antidiabéticos conocidos metformina y rosiglitazona. El sulforafano está siendo estudiado clínicamente para el cáncer y los trastornos inmunológicos.

30 Dado que se pretendía que el conjunto de genes elegido fuera representativo del hígado, se pensó que el sulforafano debería ser eficaz para reducir la resistencia a la insulina, lo que se confirmó en experimentos con animales. Además, este hallazgo está soportado en la técnica. Sin embargo, también se encontró sorprendentemente que el sulforafano era selectivo para la resistencia a la insulina del hígado. Ni el análisis de enriquecimiento en grupos de genes ni la técnica, proporcionaron ninguna orientación hacia este hallazgo. El hallazgo es importante ya que prevé el uso de sulforafano para el objetivo selectivo de resistencia a la insulina del hígado.

Sensibilidad a la insulina y resistencia a la insulina

40 El índice de sensibilidad a la insulina del hígado, otro tejido metabólico y grasa o músculos corporales puede cuantificarse usando el método clamp hiperinsulinémico-euglicémico combinado con glucosa radiomarcada (DeFronzo RA et.al. "*Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulindependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*". *Diabetologia* 23: 313-319, 1982). También se ha demostrado que las mediciones de las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT, del inglés *Oral Glucose Tolerance Test*) pueden utilizarse para derivar índices que pueden cuantificar selectivamente la resistencia insulínica hepática y muscular (Abdul-Ghani, A. M. et.al., "*Muscle and Liver Insulin Resistance Indexes Derived From the Oral Glucose Tolerance Test*". *Diabetes Care*, volumen 30, número 1, enero de 2007).

50 La medida de la sensibilidad a la insulina hepática se basa en la siguiente lógica: en el estado postabsortivo, a mayor tasa de producción de glucosa endógena (EGP, del inglés *Endogenous Glucose Production*) y a mayor concentración de insulina en plasma en ayunas (FPI, del inglés *Fasting Plasma Insulin*), es mayor, ya que 80-85% de la EGP se origina en el hígado, la EGP basal refleja principalmente la producción de glucosa hepática (HGP, del inglés *Hepatic Glucose Production*), y los inventores usan EGP y HGP de forma intercambiable. El producto de EGP y FPI, por lo tanto, proporciona una medida de la resistencia a la insulina hepática en condiciones postabsorptivas.

55 Después de la carga de glucosa, el aumento de la concentración de glucosa en plasma estimula la secreción de insulina de las células β , y la combinación de hiperglucemia e hiperinsulinemia suprime la EGP. En sujetos con

sensibilidad normal a la insulina hepática, el aumento de las concentraciones de glucosa en plasma e insulina es suficiente para suprimir EGP y mejorar el aumento de la concentración de glucosa en plasma. Por otro lado, en los individuos resistentes a la insulina hepática, un aumento aún mayor de las concentraciones de glucosa en plasma e insulina causa sólo una supresión pequeña a moderada de la EGP, lo que da lugar a un mayor aumento de la concentración de glucosa en plasma durante la fase inicial (0- 30 min) de la OGTT. Se deduce que la magnitud del aumento de las concentraciones de glucosa en plasma e insulina inmediatamente (0-30 min) después de la carga de glucosa es proporcional a la magnitud de la resistencia a la insulina hepática. Anteriormente los inventores han demostrado que durante los 20 minutos iniciales de la infusión de insulina, la captación de glucosa muscular aumenta mínimamente, mientras que la HGP está marcadamente inhibida en los individuos NGT. El aumento de las concentraciones de glucosa en plasma e insulina puede ser cuantificado por el área incremental bajo la curva (AUC, del inglés *Area Under the Curve*) para la glucosa en plasma e insulina. Por lo tanto, el AUC total durante la OGTT refleja la combinación de las concentraciones de glucosa / insulina en plasma en ayunas y el aumento de las concentraciones de glucosa / insulina en plasma, y el producto de AUC de glucosa y AUC de insulina proporciona un índice de resistencia a la insulina hepática. Debido a que la supresión de la EGP durante la OGTT alcanza su punto más bajo 45-60 min después de la ingestión de una carga de glucosa, se calculó el producto de las AUCs de glucosa e insulina durante los primeros 30 min durante la OGTT como el índice de sensibilidad a la insulina hepática. Se comparó este índice con la sensibilidad a la insulina hepática directamente medida con $EGP * FPI$. El aumento de la concentración de glucosa en plasma durante la OGTT estimula la eliminación de glucosa en los tejidos periféricos, principalmente el músculo esquelético. Debido a que no hay un cambio significativo en la tasa de producción de EGP durante el período de 60 a 120 minutos de la OGTT, la disminución en la concentración de glucosa en plasma después de 60 minutos refleja principalmente la absorción de glucosa por los tejidos periféricos, el músculo esquelético. Por lo tanto, la disminución de la concentración máxima de glucosa en plasma durante la OGTT se determina por la combinación de dos factores: 1) resistencia a la insulina del músculo esquelético y 2) concentración de insulina en plasma. Cuanto mayor es la resistencia a la insulina muscular y menor es la concentración de insulina en plasma, más lenta es la disminución de la concentración de glucosa en plasma. Por lo tanto, la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético se puede calcular como la tasa de disminución en la concentración de glucosa en plasma dividida por la concentración de insulina en plasma, como se indica a continuación. Índice de sensibilidad a la insulina muscular = $dG / dt / \text{concentración media de insulina en plasma (I)}$, donde dG / dt es la tasa de disminución de la concentración de glucosa en plasma y se calcula como la pendiente del ajuste de mínimos cuadrados a la disminución de la concentración de glucosa en plasma desde pico al punto más bajo. Cabe señalar que en algunos casos la concentración de glucosa en plasma se ha recuperado después de alcanzar su punto más bajo. En tales casos, la concentración de glucosa de rebote no se incluyó en la regresión. Representa la concentración media de insulina en plasma durante la OGTT. Durante los últimos 30 min del clamp hiperinsulinémico-euglicémico, la HGP se suprime por > 85-90% en sujetos IGT y NGT y la eliminación de glucosa principalmente refleja la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético. Por lo tanto, se valida el índice de sensibilidad a la insulina del músculo esquelético durante la OGTT frente a la tasa de eliminación de glucosa mediada por insulina en todo el cuerpo medida con el clamp de insulina euglicémica. Todos los datos se expresan como medias \pm SD.

De acuerdo con una realización, el sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, se usa para tratar o reducir la resistencia a la insulina del hígado y/o mejorar la sensibilidad a la insulina hepática en pacientes tales como pacientes con diabetes tipo 2 que tienen una resistencia a la insulina en el hígado más pronunciada, medida por el índice de Abdul-Ghani, AM et al., En comparación con la resistencia a la insulina en los músculos, medida por el índice de sensibilidad a la insulina oral a la glucosa (OGIS, del inglés *Oral Glucose Insulin Sensitivity Index*), como se describe en (Mari et al. "A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity From the Oral Glucose Tolerance Test". *Diabetes Care* 24: 539-548, 2001).

Pruebas de tolerancia a la glucosa en el tratamiento con sulforafano *in vivo*

Para las pruebas de tolerancia a la glucosa, se utilizó una dieta con alto contenido en fructosa para inducir resistencia a la insulina en un grupo de ratas Wistar. Parte del grupo recibió un período de tratamiento de dos semanas de inyecciones intraperitoneales diarias de sulforafano (10 mg/kg). Durante las pruebas de tolerancia a la glucosa, se administró glucosa al animal y después se recogieron muestras de sangre a intervalos para monitorizar la velocidad con la que se eliminaba la glucosa de la sangre. Los resultados detallados de las pruebas se encuentran en la Fig. 1. La tolerancia a la glucosa entre los animales tratados con sulforafano y el grupo de control tratado con vehículo mostró diferencias significativas. Las inyecciones diarias de sulforafano mejoraron significativamente la tolerancia a la glucosa en ratas con diabetes inducida por la dieta. Esta prueba general también refleja la resistencia a la insulina del hígado.

Pruebas de tolerancia al piruvato intraperitoneal en el tratamiento con sulforafano, *in vivo*

Para las pruebas de tolerancia al piruvato intraperitoneal, se utilizó una dieta con alto contenido en fructosa para inducir resistencia a la insulina en un grupo de ratas Wistar. Parte del grupo recibió un período de tratamiento de dos semanas de inyecciones diarias de sulforafano (10 mg/kg). Las pruebas de tolerancia al piruvato intraperitoneal son un procedimiento en el que el piruvato se convierte en glucosa en la gluconeogénesis. La prueba refleja específicamente la sensibilidad a la insulina del hígado. Los animales tratados con sulforafano mostraron diferencias

significativas de un grupo de control tratado con vehículo durante las pruebas de tolerancia al piruvato intraperitoneal, y los resultados de los ensayos detallados se encuentran en la Fig. 2.

Pruebas de tolerancia a la insulina en el tratamiento con sulforafano *in vivo*

5 Para las pruebas de tolerancia a la insulina (ITT, del inglés Insulin Tolerance Test), se utilizó una dieta con alto contenido en fructosa para inducir resistencia a la insulina en un grupo de ratas Wistar. Parte del grupo recibió un período de tratamiento de dos semanas de inyecciones diarias de sulforafano (10 mg/kg). El ITT es un procedimiento durante el cual se inyecta insulina en la vena de un sujeto para acceder a la función pituitaria y la función adrenal. Las inyecciones de insulina inducen hipoglucemia y como parte de un mecanismo de estrés se liberan hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y hormona de crecimiento (GH) para contrarrestar la hipoglucemia. La ACTH hace que el cortisol sea liberado de la corteza adrenal, que junto con la GH se opondrá a la acción de la insulina (Greenwood F.C. Et.al. "*The plasma sugar, free fatty acid, cortisol, and growth hormone response to insulin. I. In control subjects*". J Clin Invest (1965) 45 (4): 429-). El ITT refleja principalmente la sensibilidad a la insulina en el tejido muscular y la grasa. Los animales tratados con sulforafano no mostraron diferencias significativas con respecto a un grupo control tratado con vehículo durante el ITT, por lo que el tratamiento con sulforafano no afectó la sensibilidad a la insulina del tejido muscular y la grasa. Este experimento, por tanto, demuestra claramente que los efectos de sulforafano sobre la sensibilidad a la insulina son selectivos para el hígado.

Test exacto de Fisher en el tratamiento con sulforafano

20 Se utilizó una dieta con alto contenido en fructosa para inducir resistencia a la insulina en un grupo de ratas Wistar. Parte del grupo recibió un período de tratamiento de dos semanas de inyecciones diarias de sulforafano (10 mg/kg). Curiosamente, el análisis de microarrays de hígado extraído de estos animales mostró que una gran parte de los genes en la firma de T2D se invirtió en las ratas tratadas con sulforafano ($p < 0,0001$ utilizando el test exacto de sulforafano), lo que indica las propiedades antidiabéticas del tratamiento con sulforafano.

El tratamiento con sulforafano mejora específicamente la sensibilidad a la insulina hepática

25 Se sembraron 110 000 células H-4-II-E/pocillo en placas de 24 pocillos en su medio habitual (EMEM de ATCC, nº 30-2003 con adición de FBS al 10% y penicilina/estreptomicina) el día 0 y se incubaron con palmitato 0,25 mM - BSA (proporción 10:3) durante 16 h el día 2-3. Las células se lavaron para eliminar el palmitato-BSA, y luego se incubaron con sulforafano 10 uM (SFN) durante 28 h. Las células se lavaron 3 veces con medio de salida de glucosa (GOM) sin sustratos glucogénicos (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,2 mM, NaHCO₃ 20 mM, HEPES 25 mM pH 7,4 y BSA al 0,025%). Después, se añadieron 500 µl de GOM (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,2 mM, NaCO₃ 20 mM, HEPES 25 mM pH 7,4, BSA al 0,025%, lactato 20 mM, piruvato 2 mM y Glutamina 10 mM) y GOM con la adición de insulina 10 o 100 nM y se dejó que las células se incubaran durante 5 h. Después de eso, se eliminó la mayor parte del medio de incubación (375 µl) y se usó para las mediciones de glucosa. Las células se lavaron una vez con PBS frío y se lisaron con 200 ul de tampón RIPA para la determinación de la concentración de proteína. Para asegurar que las muestras de tampón estaban libres de células, se centrifugaron durante 5 min a 0,2 g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Los lisados celulares se centrifugaron asimismo durante 5 min a 10.000 g y 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La concentración de glucosa en las muestras de tampón se determinó usando el kit de ensayo AmplexRed Glucosa/Glucosa Oxidasa (LifeTechnologies no. A22189) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína en los lisados celulares se midió usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific n°. 23225).

La fig. 3 muestra que la incubación de sulforafano disminuye la salida de glucosa hepática tanto en las células hepáticas sensibles a la insulina (las primeras 6 barras) como en las resistentes a la insulina (inducidas por palmitato). Esto demuestra claramente que el tratamiento con sulforafano mejora la sensibilidad a la insulina hepática.

45 Conclusiones

En resumen, los ejemplos proporcionados aquí anteriormente muestran claramente que el tratamiento con sulforafano reduce específicamente la resistencia a la insulina en el tejido hepático de un sujeto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso en el tratamiento o la reducción de la resistencia a la insulina del hígado y/o para su uso en la mejora de la sensibilidad a la insulina hepática, donde, en el sujeto a tratar, el índice de resistencia a la insulina del hígado es superior a la resistencia a la insulina de otro tejido metabólico.
2. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la mejora de la tolerancia a la glucosa también.
- 10 3. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el sulforafano, o el extracto de planta comprende sulforafano, se administra por inyección u oralmente.
4. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la dosis diaria administrada de sulforafano es de 10 a 1000 μmol , tal como 50 a 500 μmol , p.ej. 100 a 200 μmol .
- 15 5. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la dosis diaria administrada de sulforafano a un sujeto a tratar es de 1 a 100 mg/kg del peso corporal de los sujetos, tal como 5 a 50 mg/kg del peso corporal de los sujetos, p. ej., aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal de los sujetos.
- 20 6. Sulforafano, o un extracto vegetal que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde, en el sujeto a tratar, el índice de resistencia a la insulina del hígado es superior al índice de resistencia a la insulina de grasa corporal o músculos.
7. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde en el sujeto a tratar, no se incrementa la resistencia a la insulina de otro tejido metabólico que no sea el hígado.
- 25 8. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde, en el sujeto a tratar, el índice de sensibilidad a la insulina del hígado es inferior a la sensibilidad a la insulina de otro tejido metabólico.
9. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde, en el sujeto a tratar, el índice de sensibilidad a la insulina del hígado es inferior al índice de sensibilidad a la insulina de grasa corporal o músculos .
- 30 10. Sulforafano, o un extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde en el sujeto a tratar, no disminuye la sensibilidad a la insulina de otro tejido metabólico que no sea el hígado.
- 35 11.El extracto de planta que comprende sulforafano, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho extracto vegetal se obtiene a partir de brotes de brócoli, coles de Bruselas, repollo, coliflor, col china, col rizada, coles, brócoli chino, brócoli raab, colinabo, mostaza, nabo, rábano, rúcula o berro.

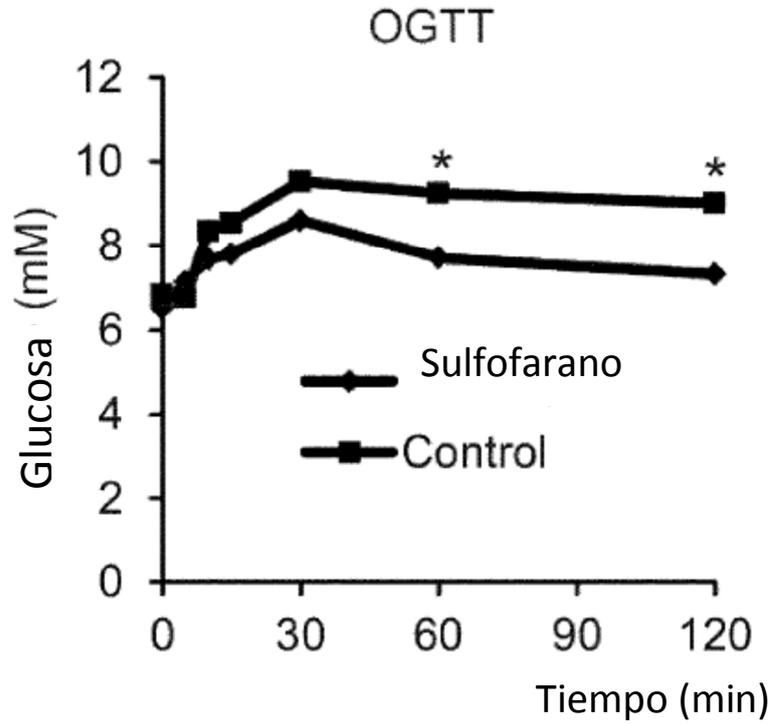


FIGURA 1

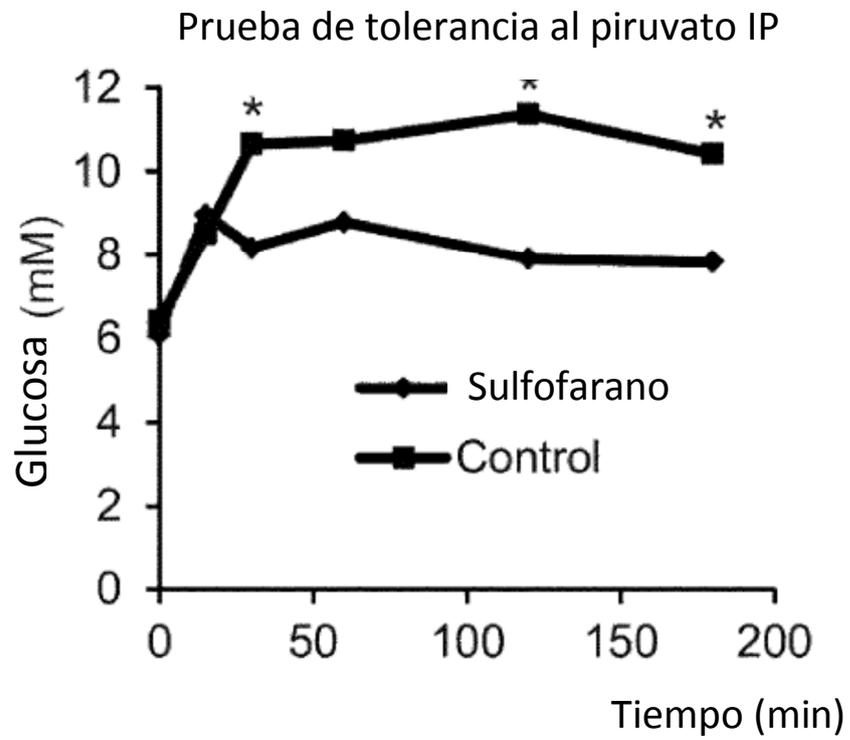


FIGURA 2

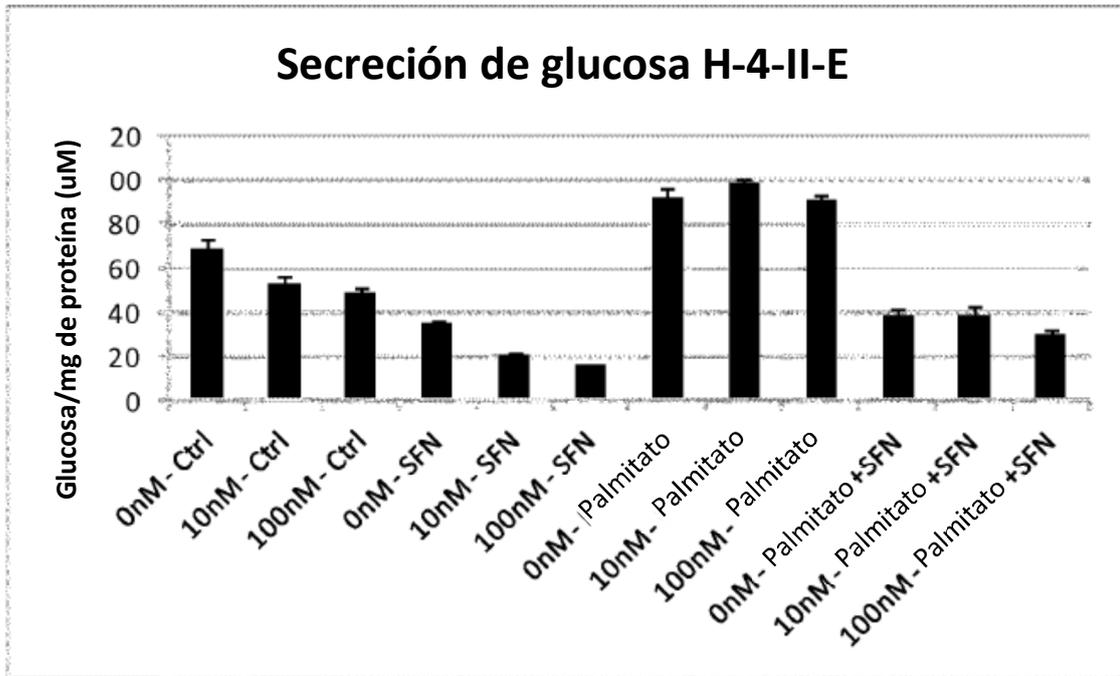


FIGURA 3