

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 560**

51 Int. Cl.:

A61K 36/638 (2006.01)

A61K 31/222 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2013 PCT/EP2013/064869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2013 E 13742600 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2872131**

54 Título: **Oleaceína para tratar o prevenir enfermedades resultantes de placas ateroscleróticas**

30 Prioridad:

14.07.2012 PL 39996212

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
(100.0%)**

**Ul. Zwirki i Wigury 61
02-091 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**CZERWINSKA, MONIKA, EWA;
KISS, ANNA, KAROLINA;
NARUSZEWICZ, MAREK, ALEKSY y
FILIPEK, AGNIESZKA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

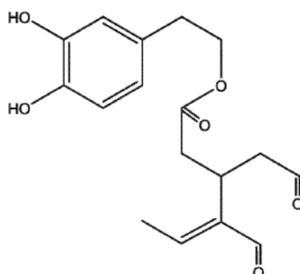
ES 2 711 560 T3

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

Oleaceína para tratar o prevenir enfermedades resultantes de placas ateroscleróticas

- 5 El objeto de esta invención es oleaceína obtenida por un proceso específico a partir de *Ligustrum vulgare L.* para su uso en la reducción de inflamación de placas ateroscleróticas o para su uso en estabilizar la placa aterosclerótica. Tal preparación se puede usar en particular en la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por la degradación de la placa aterosclerótica, lo más específicamente ictus isquémico cerebral y parada cardíaca. La oleaceína es un compuesto definido por la fórmula 1, también descrito en la bibliografía como 3,4-DHPEA-EDA.
- 10 Constituye un 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) esterificado con un derivado dialdehído del ácido enólico.



Fórmula 1

- 15 La placa aterosclerótica es el nombre atribuido a los cambios que se producen en las paredes arteriales (epitelio interior), que se forman en aterosclerosis. La placa está compuesta de masa lipídica (principalmente, LDL), células y fibrina. Tiene forma convexa hacia la luz de los vasos sanguíneos, disminuyendo su diámetro. Esto, a su vez, puede llevar a la isquemia de tejidos suministrados por dicha arteria.
- 20 La degradación no controlada de la placa aterosclerótica acumulada, junto con la evolución de aterosclerosis en arterias, principalmente en las arterias aorta, coronarias y craneales, y con menos frecuencia en arterias de extremidades, puede convertirse en la causa directa de consecuencias graves tal como ictus isquémico cerebral o isquemia cardíaca. La placa aterosclerótica se puede agrietar, activando factores trombóticos del suero, lo que produce la formación de un coágulo. Esto puede disminuir la capacidad de los vasos, y en casos extremos ocluir por completo la luz del vaso. Esta es la forma más común en que la arteria coronaria se bloquea, y en consecuencia se produce un ataque al corazón. De una manera similar, la oclusión de una arteria cerebral, como resultado de la degradación de la placa aterosclerótica, produce ictus isquémicos cerebrales. La isquemia de extremidades se puede producir a través de una ruta similar.
- 25
- 30 La placa aterosclerótica también daña capas más profundas de las paredes arteriales, contribuyendo a la formación de aneurismas.

Por esta razón, es deseable, en pacientes que padecen aterosclerosis, estabilizar la placa aterosclerótica. También es deseable estabilizar la placa aterosclerótica dañada para disminuir su velocidad de degradación, y por tanto reducir el curso de un ataque al corazón o ictus cerebral.

35

En general se acepta que las metaloproteinasas extracelulares liberadas por los macrófagos desempeñan un papel clave en la degradación de la placa aterosclerótica. Entre estas, la metaloproteinasa-9 (MMP 9) es responsable de la degradación de gelatina, así como de colágeno de tipo IV y V, lo que produce un debilitamiento de la envuelta fibrosa de la placa aterosclerótica y su degradación (Fatar M, Stroick M, Griebel M, Hennerici M. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. Cerebrovasc Dis 2005; 20:141-51).

40

Se ha divulgado que la oleaceína podría contribuir a la estabilización de placas ateroscleróticas, es decir, por disminución de la liberación de mieloperoxidasa de neutrófilos. (M. Czerwinska et al.: "OLEACEIN FROM VIRGIN OLIVE OIL MAY CONTRIBUTES TO STABILIZATION OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES BY DECREASE MYELOPEROXIDASE RELEASE FROM NEUTROPHILS", EAS2012 libro de resúmenes, 29 Mayo 2012, página 1108).

45

El fin de esta invención es administrar una preparación que se podría usar para estabilizar la placa aterosclerótica mediante la inhibición con éxito de su degradación en presencia de metaloproteinasa-9. Tal preparación se podría usar en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen de la degradación de la placa aterosclerótica, en particular ataques al corazón, enfermedad isquémica coronaria, ictus cerebral isquémico, e isquemia de las extremidades.

50

Lo más inesperadamente, resultó que el fin declarado formulado de esta manera se ha realizado mediante el objeto de la presente invención.

55

El objeto de esta invención se refiere a oleaceína obtenida por un proceso como se da en la reivindicación 1 a partir de *Ligustrum vulgare L.* para su uso en la reducción de inflamación de placa aterosclerótica o para su uso en estabilizar la placa aterosclerótica, en particular para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades que son consecuencias de la degradación de la placa aterosclerótica, en particular esas seleccionadas de un grupo que abarca ictus cerebral isquémico, ataque al corazón, así como enfermedad isquémica del corazón.

El objeto de esta invención se refiere también a dicha oleaceína para dicho uso reivindicado en la inhibición de la producción de MMP-9 por las células contenidas en la placa aterosclerótica.

El objeto de esta invención también se refiere a dicha oleaceína para dicho uso reivindicado en donde la inflamación de la placa aterosclerótica se reduce mediante un cambio en el fenotipo de los macrófagos existentes de proinflamatorio M1 a antiinflamatorio M2, que es importante para la estabilización de la placa.

Preferiblemente, la preparación producida se usa para estabilizar la placa aterosclerótica.

La oleaceína se obtiene de *Ligustrum vulgare L.*

El objeto de la presente invención se refiere también a dicha oleaceína para su uso en estabilizar la placa aterosclerótica o para la reducción de la inflamación de la placa aterosclerótica, particularmente para el tratamiento y prevención de enfermedades que son consecuencias de la degradación de la placa aterosclerótica, en particular esas seleccionadas de un grupo que abarca ictus cerebral isquémico, ataque al corazón, así como enfermedad isquémica del corazón.

Ejemplo 1. Obtención de oleaceína de las hojas de aligustre (*Ligustrum vulgare L.*)

El aligustre (*Ligustrum vulgare L.*) es una planta decorativa que crece en Europa, con frecuencia usada para setos. El aislamiento de la oleaceína contenida en las hojas del aligustre se realizó usando una modificación del método por Kiss et al. (Journal of Ethnopharmacology 120 (2008) 220-225) en la Facultad de Farmacognosia y Fundamentos Moleculares de la Fitoterapia de la Academia Médica de Varsovia).

Para el aislamiento, se usaron 400 g de materia prima degradada. En la primera fase, las hojas de aligustre se extrajeron cuatro veces con agua destilada a una temperatura de 30°C en un baño de ultrasonido, durante 30 minutos cada vez. La extracción se realizó en una proporción de 1:10 de materia prima respecto a solvente. Los extractos acuosos se filtraron a través de lana y se juntaron. El extracto acuoso resultante se concentró mediante liofilización a un volumen de aproximadamente 1 l. Para obtener un extracto menos contaminado y para aumentar la eficacia del proceso de extracción del compuesto deseable, se usó éter dietílico en lugar de acetato de etilo. Análisis anteriores habían mostrado que una extracción con acetato de etilo contiene más compuestos químicos, haciendo de esta manera el aislamiento de oleaceína más difícil. Por consiguiente, se sometió después el extracto acuoso condensado a un extracto con éter dietílico de 5 veces a una proporción 1:1 de solvente respecto a extracto. El extracto de éter se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida, a una temperatura de 35°C. Se obtuvieron aproximadamente 5 g de extracto de éter. La siguiente modificación se basó en el uso de un aparato y reactivos en un sistema isocrático. Según Kiss et al. (2008), la purificación de extracto de acetato de etilo consistía en el uso de una columna llena con gel de sílice (0,125-0,25 mm; 5,5 cm x 10 cm) usando un gradiente de solvente de cloroformo-acetato de etilo (100-0%), así como acetato de etilo-metanol (100-0%). En el método modificado, el extracto de éter se separó usando cromatografía rápida en una columna llena con gel de sílice (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash) usando una mezcla de cloroformo y acetato de etilo (85:15) en un sistema isocrático durante 60 minutos (20 ml/min). Se obtuvieron 9 fracciones, de las cuales se seleccionaron las fracciones 3 y 4 para la separación posterior. Estas fracciones se separaron adicionalmente en una columna llena con gel de sílice (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash) usando una mezcla de tolueno, acetato de metilo y metanol (84:11:5) en un sistema isocrático durante 60 minutos (20 ml/min). Se obtuvieron 5 fracciones, y de la fracción 3, cargada en una columna llena con Sephadex, se aisló oleaceína usando una mezcla de cloroformo y metanol (9:1), como en el método original. Por tanto, se obtuvieron 1,289 g del compuesto. La identidad del compuesto se confirmó usando RMN (véase la figura 1), así como HPLC-DAD-MS/MS (véase la figura 2).

Fase de aislamiento	Método original	Método modificado
1ª extracción	agua 4x baño ultrasónico; 30 min	agua 4x baño ultrasónico; 30 min
2ª extracción	acetato de etilo 5x (1:1)	éter dietílico 5x (1:1)
1ª separación	Agua; columna de vidrio (0,125-0,25 mm; 5,5 cm x 10 cm); gradiente cloroformo-acetato de etilo (100-0%) y acetato de etilo-metanol (100-0%)	Agua (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); cromatografía rápida; sistema isocrático de cloroformo y acetato de etilo (85:15)

2ª separación		Agua (PF- 30 SIHP/80G PuriFlash); cromatografía rápida; sistema isocrático de cloroformo y acetato de etilo (85:15)
Purificación final	Sephadex; columna de vidrio (2 × 25 cm); sistema isocrático de cloroformo-metanol (9:1)	Sephadex; columna de vidrio (2 × 45 cm); sistema isocrático de cloroformo-metanol (9:1)

Ejemplo 2. Estabilización de la placa aterosclerótica aislada de arteria carótida.

5 Se obtuvieron placas ateroscleróticas (n=15) de pacientes sometidos a endarterectomía. La placa obtenida se dividió en dos partes, que se incubaron después en solución salina fisiológica tamponada (control), o solución salina fisiológica tamponada en presencia de oleaceína a las concentraciones de 5, 10, y 20 µM durante 24 horas a una temperatura de 37°C después de estimulación anterior con una solución de lipopolisacárido a una concentración de 1 µg/ml. El control sin estimular consistía en solución salina fisiológica, en la que la placa se incubó durante 2 horas. El efecto de oleaceína sobre la producción de metaloproteinasa-9 (MMP-9) se determinó usando ELISA inmunológico (R&D Systems). La cantidad de MMP-9 (ng/ml) se calculó por masa de placa aterosclerótica, y después se describió en términos de porcentaje en comparación con el control estimulado. Se determinó la CI₅₀, es decir, la concentración del compuesto a la que la reacción se inhibe en el 50%, a un nivel de 9,07 ± 1,2 µM (media ± error estándar).

15 El gráfico incluido en la figura 1 muestra la dependencia de la producción de MMP-9 [%] en las concentraciones respectivas de oleaceína (5, 10, 20 µM).

20 Los resultados experimentales demuestran la capacidad de oleaceína para inhibir la producción de MMP-9 por las células contenidas en la placa aterosclerótica. La disminución de la producción de MMP-9 estabiliza la placa aterosclerótica y retrasa su degradación. En relación con el efecto obtenido, la oleaceína se puede usar en el tratamiento y profilaxis de enfermedades que son consecuencias de la degradación de la placa aterosclerótica, en particular, ictus cerebral isquémico, ataque al corazón, así como enfermedad isquémica del corazón.

Ejemplo 3. Reducción de la inflamación de la placa aterosclerótica.

25 Se investigaron los efectos de oleaceína sobre la producción de interleuquina 10 (IL-10) con el uso del método inmunológico de ELISA (R&D Systems). Las cantidades de IL-10 se convirtieron en masa de placa aterosclerótica y, posteriormente, se determinaron en % comparadas con el control estimulado. La investigación confirmó la producción de IL-10 aumentada, inducida por oleaceína, hasta aproximadamente el 267,1 ± 61,5%.

30 En enfermedades como diabetes, aterosclerosis y otros estados patológicos en un cuerpo humano, no hay cambio en la expresión del receptor CD163 en células macrófagos debido a complejos hemoglobina-haptoglobina, que previene un cambio en el fenotipo de estas células. Los macrófagos proinflamatorios tienen un efecto desestabilizante sobre la placa aterosclerótica y producen microhemorragia.

35 Los complejos oleaceína-hemoglobina (OC+Hb) inducen la expresión del receptor secuestrante de macrófagos CD163, que lleva a un cambio en los fenotipos de los macrófagos de la forma proinflamatoria M1 al tipo antiinflamatorio M2. Este proceso afecta significativamente la estabilización de la placa aterosclerótica en arterias humanas.

40 Los cambios en la expresión del receptor de macrófagos CD163, resultantes de la estimulación de la célula macrófago por varios agentes, se ensayaron con el uso del citómetro de flujo BD FACSCalibur. Los hallazgos se presentan en la figura 2. Descripción de los símbolos: 1 – K – control, 2 – Hb – hemoglobina, 3 – Hp – haptoglobina, 4 – OC 10 – oleaceína en 10 µM, 5 - OC 20 – oleaceína en 20 µM, 6 – OC 10 + Hb – complejo hemoglobina-oleaceína en 10 µM, 7 – OC 20 + Hb – complejo hemoglobina-oleaceína en 20 µM, 8 – Hb + Hp 1-1 – complejo hemoglobina-1-1 haptoglobina, 9 – OC 10 + Hb + Hp 1-1 – complejo oleaceína-hemoglobina-1-1 haptoglobina en 10 µM, 10 – OC 20 + Hb + Hp 1-1 – complejo oleaceína-hemoglobina-1-1 haptoglobina en 20 µM, 11 – Hb + Hp 2-2 – complejo hemoglobina-2-2 haptoglobina, 12 – OC 10 + Hb + Hp 2-2 – complejo oleaceína-hemoglobina-2-2 haptoglobina en 10 µM, 13 – OC 20 + Hb + Hp 2-2 – complejo oleaceína-hemoglobina-2-2 haptoglobina en 20 µM.

REIVINDICACIONES

1. Oleaceína obtenida de *Ligustrum vulgare* L. para su uso en la estabilización de la placa aterosclerótica o para su uso en la reducción de la inflamación de la placa aterosclerótica, en particular en el tratamiento y prevención de enfermedades resultantes de la ruptura de la placa aterosclerótica, particularmente esas seleccionadas del grupo que incluye: ictus isquémico, infarto de miocardio y enfermedad isquémica del corazón,
- 5
- en donde la oleaceína se obtiene por un proceso como sigue:
- 10
- 400 g de materia prima degradada de hojas de aligustre se extraen cuatro veces con agua destilada a una temperatura de 30°C en un baño de ultrasonido, durante 30 minutos cada vez a una proporción de 1:10 de materia prima respecto a solvente;
 - los extractos acuosos se filtran a través de lana;
 - el extracto acuoso resultante se concentra mediante liofilización a un volumen de 1 litro;
 - 15 - el extracto acuoso condensado se somete a una extracción con éter dietílico de 5 veces a una proporción 1:1 de solvente en un evaporador rotatorio a presión reducida, a una temperatura de 35°C para obtener aproximadamente 5 g de extracto de éter dietílico;
 - el extracto de éter dietílico se separa usando cromatografía rápida en una columna llena con gel de sílice usando un sistema isocrático de cloroformo y acetato de etilo (85:15) durante 60 minutos a 20 ml/min, obteniéndose 9 fracciones, de las que las fracciones 3 y 4 se seleccionan para posterior separación;
 - 20 - dichas fracciones 3 y 4 se separan adicionalmente en una columna llena con gel de sílice usando un sistema isocrático de tolueno, acetato de metilo y metanol (84:11:5) durante 60 minutos a 20 ml/min, obteniéndose 5 fracciones;
 - de la fracción 3, cargada en una columna llena con Sephadex, se aísla oleaceína usando una mezcla de cloroformo y metanol (9:1).
 - 25

Fig. 1

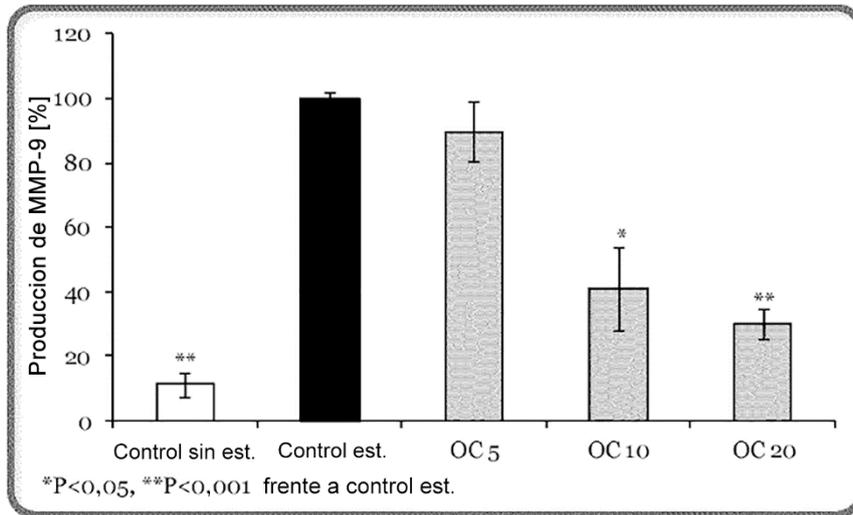


Fig. 2

