

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 135 353**
(21) Número de solicitud: 9800625
(51) Int. Cl.⁶: A61K 31/565

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **24.03.98**

(71) Solicitante/s:
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
Avda. Melchor Botella, s/n
03206 Elche, Alicante, ES

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.99**

(72) Inventor/es: **Soria Escoms, Bernat;**
Nadal Navajas, Angel;
Ripoll Orts, Cristina;
Rovira de Miguel, Juan Manuel;
Andreu Sánchez, Etelvina;
Laribi, Ouahiba y
León Quinto, Trinidad

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.99

(74) Agente: **Fernández Marquina, Pilar**

(54) Título: **Utilización del 17 β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de la Diabetes Mellitus y sus manifestaciones.**

(57) Resumen:

Utilización del 17 β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de la Diabetes Mellitus y sus manifestaciones.

La Diabetes Mellitus es un desorden de la homeostasis de la glucosa, siendo una de sus características la disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa. La insulina es una hormona peptídica sintetizada, almacenada y liberada por las células tipo B de los islotes de Langerhans del páncreas.

La utilización de 17 β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tiene su origen en los efectos de los estrógenos sobre los mecanismos de secreción de insulina.

La adición de 17 β -estradiol, sus análogos y derivados potencia la secreción de insulina para concentraciones de glucosa por encima de 7 mM, sin producir efectos en ausencia de glucosa o a concentraciones inferiores a la umbral (5-7 mM), por lo que evita el riesgo de hipoglucemias severas, la complicación más seria de los tratamientos antidiabéticos más utilizados.

ES 2 135 353 A1

DESCRIPCION

Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de la *Diabetes Mellitus* y sus manifestaciones.

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las aplicaciones de los estrógenos, sus análogos y derivados. Más concretamente, de su utilización en el tratamiento de la *Diabetes Mellitus* derivada de sus efectos sobre los mecanismos de secreción de insulina.

Antecedentes de la invención

La *Diabetes Mellitus* es una enfermedad del metabolismo de los hidratos de carbono causada por el déficit total o parcial de insulina. La insulina es una hormona peptídica sintetizada, almacenada y liberada por las células tipo B de los islotes de Langerhans del páncreas.

La insulina controla la concentración de glucosa en sangre o glucemia. A su vez, la liberación de insulina está directamente conectada con la presencia de glucosa en sangre.

El mecanismo mediante el cual un aumento de glucosa en sangre se traduce en la liberación de insulina es el siguiente: un aumento de la glucosa en el espacio extracelular genera un aumento similar en el interior de la célula beta pancreática (Cook D.L., Taborsky G.J., *Diabetes Mellitus. Theory and Practice*, H Rifkin y D Porte Jr, eds, 1990, pp: 89-103); (Ashcroft F. M. and Rorsman P., *Prog. Biophys. molec. Biol.*, 1989, 54:87-143). Para ello la membrana de la célula está dotada con un transportador de alta capacidad y baja afinidad, el GLUT2. Una vez dentro de la célula, se fosforila por acción de una hexokinasa de baja afinidad (la glucokinasa) y se inicia el metabolismo de la glucosa que va a tener como consecuencia un aumento del cociente ATP/ADP y de los diadenosirilolifosfatos. El aumento de estos mensajeros es a su vez responsable del cierre del canal de potasio regulado por ATP, responsable del mantenimiento del potencial de membrana en reposo (Cook D.L., Hales C.N., *Nature*, 1984, 311:271-273); (Ashcroft F.M., Harrison D., Ashcroft S.J.H., *Nature*, 1984, 312:446-448); (Valdemillos M., Nadal A., Contreras D., and Soria B., *Journal of Physiology*, 1992, 455:1.73-186); (Ripoll C., Martín F., Rovira J.M., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Soria B., *Diabetes*, 1996, 45:1431-1434). En consecuencia la célula se despolariza, se abren canales de calcio activados por voltaje y aumenta el calcio citosólico. El aumento de calcio citosólico es a su vez responsable de la secreción de insulina (Martín F., Sánchez-Andrés J.V. and Soria B., *Diabetes*, 1995, 44:300-305). Por lo tanto, cualquier mecanismo que active alguno de los pasos de la secuencia de eventos descrita puede funcionar como un potenciador de la secreción de insulina.

El tratamiento de la ausencia total de insulina (diabetes tipo I) necesita de la administración de insulina exógena (diabetes insufino dependiente), mientras que la diabetes tipo II (no insulino dependiente), responsable del 75 % de los cuadros diabéticos, se trata mediante potenciadores de la secreción de insulina.

La diabetes tipo II es un desorden de la ho-

meostasis de la glucosa caracterizada por hiperglucemia, resistencia periférica a la insulina, deterioro del metabolismo hepático de la glucosa y disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa, lo que se ha descrito como "ceguera" a la glucosa, es decir, aunque la concentración plasmática de insulina en pacientes con diabetes tipo II puede ser normal o incluso aumentada en comparación con los individuos normales, la secreción de insulina no se adecua a la hiperglucemia presente.

Se han propuesto numerosos tratamientos para la diabetes tipo II. De entre ellos, los más utilizados son los antidiabéticos orales como la glibenclamida o la tolbutamida, cuyo efecto insulín secretor se debe a su capacidad para inhibir de forma directa el canal de potasio regulado por ATP (Ashford M.L.J., Sturgess N.C., Cook D.L., Hales C.N., *Biophysics of the Pancreatic B-cell*, I Atwater, E Rojas y B. Soria eds., 1986, pp.69-76); (Trube G., Rorsman P. and Ohno-Shosaku T., *Pflügers Arch.*, 1986, 407:493-499). Al ser activos en ausencia de glucosa pueden liberar insulina en condiciones no deseadas (a concentraciones bajas de glucosa) y causar hipoglucemias severas (la más seria de las complicaciones del tratamiento antidiabético). Por esto se han propuesto tratamientos alternativos que tuviesen la capacidad de actuar como un modulador sinérgico con la glucosa, es decir, no ser activos para concentraciones bajas de glucosa (por debajo del nivel umbral, 5-7 mM y sí a concentraciones superiores).

El GLP-1 (glucagon like peptide 1), en sus formas GLP-1 (7-36) amida y GLP-1 (7-37), posee esta propiedad (Holz IV G.G., Kühnleib W.H. and Habener J.F., *Nature*, 1993, 361:362-365). El GLP-1 (7-37) potencia el efecto de la glucosa, no es efectivo para concentraciones bajas (subestimuladoras) de glucosa y sí lo es cuando la glucosa aumenta por encima de sus valores fisiológicos (aproximadamente 1 gr/l). No obstante, posee dos grandes desventajas: 1) debe utilizarse a concentraciones farmacológicas que pueden generar efectos en otros tejidos, 2) se trata de un péptido y debe administrarse por vía parenteral y 3) la vida media del GLP-1 es demasiado corta para mantener niveles plasmáticos durante tiempo suficiente mediante administración subcutánea. Es por esto que se están desarrollando análogos con vida media más larga.

Compendio de la invención

La presente invención aporta una solución en el tratamiento de la *Diabetes Mellitus* y sus manifestaciones mediante la utilización de 17β -estradiol, sus análogos y derivados.

En esta solicitud se describe con gran detalle metodológico el efecto directo de los estrógenos sobre la célula beta, a su vez se demuestra la presencia de un receptor para estrógenos en la membrana plasmática de dicha célula. La acción de concentraciones fisiológicas de estrógenos (100 pM), sus análogos y derivados sobre dicho receptor tendría como consecuencia la modulación de la secreción de insulina.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de investigar el papel de los estrógenos como moduladores de la célula beta pancreática se registró el potencial de membrana de la

célula B del islote de Langerhans del ratón (Sánchez-Andrés J.V., Soria B., *European Journal of Pharmacology*, 1991, 205:89-91). La adición de 17 β -estradiol (100 pm en ausencia de glucosa o a concentraciones inferiores a la concentración umbral (5-7 mM) no produjo ningún cambio en el potencial de membrana. Sin embargo, cuando se aplicó en presencia de glucosa 8 mM generó una activación significativa de las oscilaciones del potencial de membrana: la frecuencia de las oscilaciones aumentó en un 40 %.

Se sabe que el patrón de descarga en ráfagas de la célula beta se traduce en oscilaciones del calcio citosólico que, como se ha dicho, inducen la secreción de insulina (Valdeomillos M., Santos R.M., Contreras D., Soria B. and Rosario L.M., *FEBS Letters*, 1989, 259:19-23); (Santos R.M., Rosario L.M., Nadal A., García Sancho J., Soria B. and Valdeomillos M., *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 1991, 418:417-22). Para concentraciones de glucosa en el rango subestimulador (por debajo de 7 mM), el 17 β -estradiol no produjo ningún efecto. Sin embargo, cuando el efecto de los estrógenos se midió en presencia de glucosa 8 mM se observó un aumento significativo tanto de la frecuencia (aumentada en un 138 %) como de la amplitud (aumentada en un 63 %) de las oscilaciones de calcio citosólico. Consecuentemente, la secreción de insulina estaba aumentada en un 30 % para concentraciones de glucosa en el rango deseado (7-9 mM), para concentraciones más bajas, por ejemplo 3 mM, no se produjo ningún efecto y para concentraciones superiores se apreció un aumento menor (no significativo) en la secreción de insulina. La sinergia entre la glucosa y 17 β -estradiol indica que se trata de un modulador. Los efectos del 17 β -estradiol sobre la célula beta pancreática no se limitan al sexo femenino, estando presentes tanto en el sexo masculino como en el femenino. Asimismo el efecto del 17 β -estradiol es estereospecífico, siendo el 17 α -estradiol mucho menos efectivo. Otras hormonas esteroideas como la estrona, la testoesterona y el estriol eran mucho menos efectivas que el 17 β -estradiol.

El 17 β -estradiol inhibe de forma reversible al canal de potasio regulado por ATP. Dicho efecto no es un efecto directo sobre el canal, como las sulfonilureas (glibenclamida, tolbutamida), sino que exige la participación de un mensajero intracelular. Los estrógenos no son activos cuando se aplican directamente sobre la cara interna o externa del canal en parches escindidos y sí lo es cuando se aplica en la configuración del "cell-attached", es decir sobre la célula íntegra que mantiene los mecanismos de acoplamiento intactos. La figura 1 muestra el efecto del 17 β -estradiol sobre el canal de potasio regulado por ATP. En la parte superior (A) de la figura se muestra la actividad del canal en condiciones de control (0 min) y tras la adición del 17 β -estradiol (1 y 4 min). En la parte inferior (B) se muestra un registro continuo de la probabilidad de apertura del canal antes, durante (barra) y después de la exposición al 17 β -estradiol. Obsérvese la reversibilidad de los efectos a los 35 minutos.

Como cabría esperar de un modulador fisiológico los efectos del 17 β -estradiol dependen de

la concentración. La curva concentración-efecto es de tipo sigmoidal y alcanza su valor medio para 500 pM.

Los efectos descritos previamente no se deben a la acción del esteroide sobre el genoma. El pretratamiento durante al menos 3 horas con Actinomicina-D, un inhibidor de la síntesis del ácido ribonucleico, no bloquea el efecto del 17 β -estradiol sobre la célula beta pancreática. Por otra parte, la incubación durante 4 horas con cicloheximida, un inhibidor potente de la síntesis de proteínas, tampoco modifica los efectos descritos. Por último, el uso del tamoxifén, un inhibidor clásico del receptor citosólico-nuclear, tampoco modificó los efectos descritos.

Cuando se aplica estradiol conjugado a albúmina sérica bovina, es decir, en una forma impermeable que no puede atravesar la membrana celular, también se observaron los efectos descritos.

Todos estos efectos ocurren a través de un receptor localizado en la membrana celular. Los ensayos de unión competitiva y localización realizados mediante microscopía reflectiva confocal e inmunohistoquímica así lo demostraron.

Como el 17 β -estradiol y sus análogos aumentan la secreción de insulina de forma sinérgica con la concentración de glucosa, evitarán la hipoglucemia causada por sulfonilureas cuando la glucemia sea normal o inferior a la normal.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes experimentos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

a) El potencial de membrana de las células tipo beta del islote de Langerhans se midió mediante microelectrodos intracelulares. Una vez microdisecados, los islotes fueron colocados en una microcámaras de 50 μ l perfundida con una solución nutricia de Krebs gaseada constantemente con O₂ (95 %) y CO₂ (5 %) hasta alcanzar un pH de 7.4. La temperatura se mantuvo controlada a 35°C. El registro se realizó mediante un amplificador Axoclamp 2B. La composición exacta de las soluciones empleadas y la técnica de registro se han descrito previamente (Sanchez-Andrés J.V., Soria B., *European Journal of Pharmacology*, 1991, 205:89-91).

b) La actividad iónica del calcio citosólico se monitorizó mediante microfluorometría de simple excitación y doble emisión tras incubar durante 45 minutos los islotes de Langerhans con la solución de Krebs descrita previamente a la que se añadió 5 μ M del ester acetometoxi del Indo-1(Molecular Probes, USA). Los detalles de la técnica de monitorización de la actividad iónica del calcio se han descrito con anterioridad (Valdeomillos M., Santos R.M., Contreras D., Soria B. and Rosario L.M., *FEBS Letters*, 1989, 259:19-23); (Santos R.M., Rosario L.M., Nadal A., García-Sancho J., Soria B. and Valdeomillos M., *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 1991, 418:417-22); (Nadal A., Valdeomillos M., and Soria B., *Am. J Physiol.*, 1994, 267:769-774).

c) La secreción de insulina se midió mediante radioinmunoanálisis (RIA, Diagnostics Products, Los Angeles, USA) incubando los islotes durante 20 minutos a 37°C, pH=7.4 en 1 ml de medio

Krebs-Ringer que contenía 1% de albúmina sérica bovina a la que se añade el estímulo apropiado.

d) El registro de la apertura y cierre de canales se realizó mediante "patch-clamp". Las fueron llenadas con una solución que contenía, en mM: KCl 140, IHEPES 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2; pH 7.4. La solución del baño contenía, en mM: KCl 5, NaCl 135, CaCl₂ 2.5, Hepes 10, MgCl₂ 1.1; pH7.4. En los experimentos con parches escindidos se utilizó una solución que contenía, en mM: KCl 5, NaCl 135, HEPES 10, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2.5; pH 7.4, para el interior de la pipeta, mientras que la solución del baño contenía, en mM: KG 140, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, Hepes 10, EGTA 1; pH 7.2. Los registros se filtraron a 3 kHz. La técnica de registro de canales aislados se describe con mayor detalle en Hamill et al (Hamill O.P., Marty A., Nether E., Sakmann B., Sigworth F.J., *Pflügers Arch.-Eur.J. Physiol.*, 391:85-100). Su aplicación a este tipo celular ha sido descrita previamente (Cook D.L., Hales C.N., *Nature*, 1984,

5

311:271-273); (Ashcroft F.M., Harrison D., Ashcroft S.J.H., *Nature*, 1984, 312:446-448); (Valdeomillos M., Nadal A., Contreras D., and Soria B., *Journal of Physiology*, 1992, 455:173-186); (Ripoll C., Martín F., Rovira J.M., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Soria B., *Diabetes*, 1996, 45:1431-1434).

10

15

20

e) La unión del complejo estradiol-peroxidasa a la membrana se visualizó de la siguiente forma: tras fijar con formaldehido al 4% las células fueron lavadas y se desarrolló la reacción de la peroxidasa utilizando 0.5 mg/ml de 3-3'-diaminobencidina (Sigma) en presencia de 0.075% de agua oxigenada durante 5 min. El precipitado de diaminobencidina se visualizó mediante microscopía confocal. Para la inmunofluorescencia se utilizó un anticuerpo antiperoxidasa de rábano conjugado con fluoresceína. Las células teñidas se visualizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM510 equipado con un objetivo 63x de inmersión en aceite y apertura numérica 1.3.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de la *Diabetes Mellitus*.

2. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en la prevención de la *Diabetes Mellitus*, especialmente en familiares de diabéticos con trastornos en la secreción de insulina.

3. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de los trastornos

del metabolismo asociados con alteraciones en la secreción de insulina.

4. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de las complicaciones de la *Diabetes Mellitus*.

5. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de los trastornos de los efectos de la insulina.

6. Utilización del 17β -estradiol, sus análogos y derivados en el tratamiento de los trastornos de la secreción de insulina.

10

15

20

25

30

35

40

45

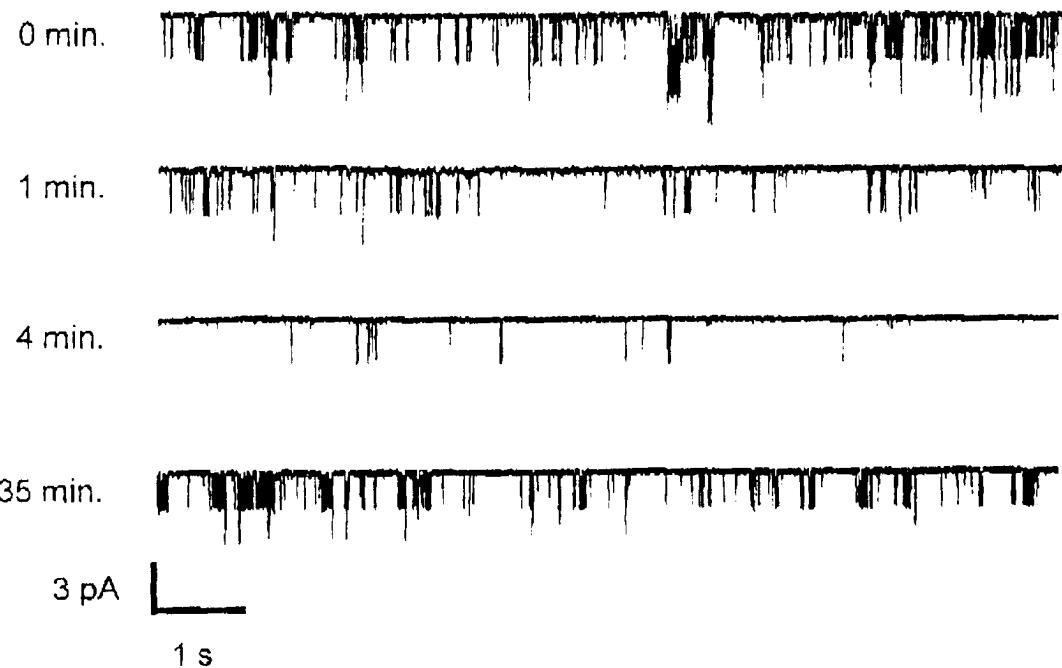
50

55

60

65

A



B

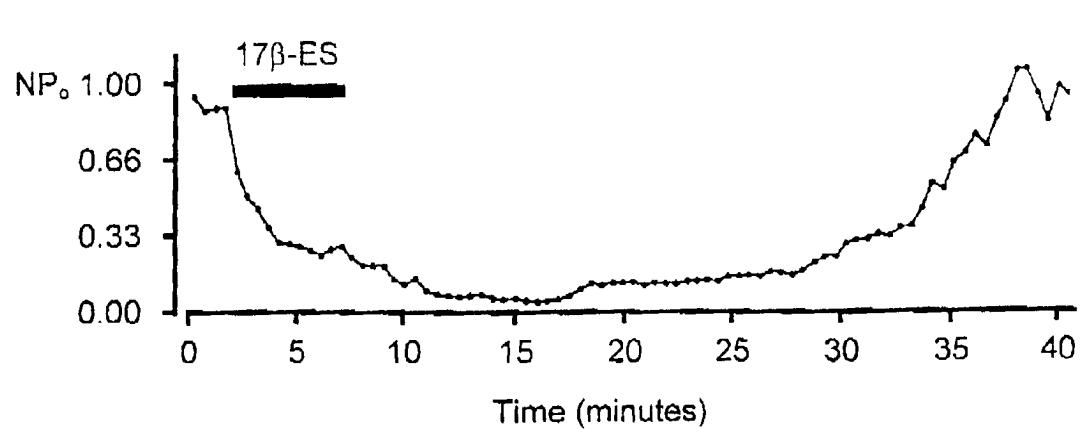


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 135 353
(21) N.º solicitud: 9800625
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.98
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.⁶: A61K 31/565

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BARLETT, P.B. et al., "Estradiol and progesterone modulation of glucose uptake rates by peripheral tissues in diabetic C57BL/KsJ mice", 1989, Med. Sci. Res., 17 (8), páginas 387-389. Todo el documento, especialmente "Introduction".	1-6
X	CROOK, D. et al., "Hormone replacement therapy with dydrogesterone and 17beta-oestradiol: effects on serum lipoproteins and glucose tolerance during 24 month follow up", 1997, Br. J. Obstet. Gynaecol., 104 (3), páginas 298-304. Páginas 302 y 303: "Discussion".	1-6
X	LEITER, E.H. et al., "The influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. IV. Male lethal syndrome in CBA/Lt mice", 1981, Diabetes, 30 (12), páginas 1035-1044. Página 1037, líneas 23-40; página 1043, líneas 18-22.	1,3,4,5
X	PUAH, J.A. et al., "Insulinotropic effect of ovarian steroid hormones in streptozotocin diabetic female mice", 1985, Horm. Metab. Res., 17 (4), páginas 216-218. Todo el documento, especialmente, página 217: "Results & Discussion".	1,3-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 02.09.99	Examinador A. Maquedaño Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------