

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 901**

21 Número de solicitud: 201831297

51 Int. Cl.:

**A61K 31/222** (2006.01)

**A61K 36/63** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.12.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.06.2020**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (75.0%)**

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid ES y**

**UNIVERSITY OF ATHENS LIAISON OFFICE WITH  
COMPANIES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GUTIERREZ MIRANDA, Beatriz;**

**NIETO CALLEJO, M<sup>a</sup> Luisa y**

**MAGIATIS, Prokopios**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Uso de secoiridoides para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas.**

57 Resumen:

Uso de secoiridoides para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas.

La presente invención se refiere al uso de secoiridoides, tales como oleaceína y oleocantal, para prevenir o tratar enfermedades que provocan alteraciones gastrointestinales inmunomediadas. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o composición nutracéutica que comprende dichos secoiridoides.

ES 2 769 901 A1

**DESCRIPCIÓN****USO DE SECOIRIDOIDES PARA EL TRATAMIENTO O LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INMUNOMEDIADAS**

5

10

La presente invención se refiere al uso de secoiridoides, tales como oleaceína y oleocantal, para evitar o tratar enfermedades que provocan alteraciones gastrointestinales inmunomediadas. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que contiene dichos secoiridoides. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo técnico de la medicina, así como a la industria de los alimentos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

20

25

30

35

La enfermedad inflamatoria inmunomediada (IMID) es una expresión usada para definir un grupo de trastornos no relacionados y clínicamente heterogéneos, que se reconocen por compartir mecanismos patógenos inflamatorios comunes, siendo las enfermedades autoinmunitarias un subconjunto de las IMID (Kuek A. et al., Postgrad Med J. 2007;83:251-60). Las IMID representan un problema sanitario sustancial. La incidencia de estas enfermedades autoinmunes e inflamatorias ha aumentado en todo el mundo, junto con un diagnóstico más temprano y un mayor conocimiento médico. Estas enfermedades son muy frecuentes en países industrializados desarrollados, y existe la hipótesis que los cambios en factores ambientales, tales como el estilo de vida moderno, los hábitos alimenticios, el uso de antibióticos y la higiene, tienen un papel fundamental. Los factores genéticos también son determinantes cruciales de la susceptibilidad, de hecho, las IMID pueden coexistir dentro de la misma familia. Además, está ampliamente reconocido que los pacientes con IMID están en un mayor riesgo de desarrollar otras afecciones relacionadas con inflamación. Por ejemplo, los pacientes con espondilitis anquilosante frecuentemente desarrollaban iritis (39 %), soriasis (16 %) y enfermedad inflamatoria intestinal (18 %). Las IMID se definen por el sistema orgánico principal que se ve afectado; aunque están asociadas con morbilidades que se extienden más allá del órgano diana principal. Por tanto, muchas afecciones en que no hay síntomas localizados en el sistema gastrointestinal a menudo implican una disfunción gastrointestinal subyacente. Dado que la mucosa intestinal humana representa una de las áreas que se ven más influenciadas por el entorno circundante, los microbios residentes han surgido como único órgano que determina constantemente la inmunidad y el metabolismo del hospedador. Una hipótesis emergente y atractiva es que en las IMID hay una comunicación mal regulada entre las células epiteliales intestinales, el microbiota y el sistema inmune. Por tanto, una composición microbiana alterada, acoplada con una permeabilidad intestinal aumentada se ha asociado recientemente con enfermedades

autoinmunes, particularmente artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, enfermedad hepática autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso diseminado y psoriasis/artritis psoriásica, entre otras.

5           La presente invención se refiere a la búsqueda de nuevos tratamientos para enfermedades que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas y describe una nueva aplicación farmacológica de la oleaceína y el oleocantal como agentes que reducirían notablemente rasgos característicos principales de la disfunción gastrointestinal, tales como la permeabilidad intestinal aumentada, la estructura alterada de la mucosa incluyendo la inflamación y el estrés oxidativo en el intestino. La presente invención usa la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) como modelo de IMID que desarrolla alteraciones gastrointestinales (Nouri M. et al., PLoS One. 2014;9: e106335). Los ratones con EAE muestran características de dismotilidad gastrointestinal, presentan permeabilidad intestinal aumentada, sobreexpresión de la proteína de uniones estrechas zonulina, alteraciones en la morfología intestinal e inflamación en el intestino delgado.

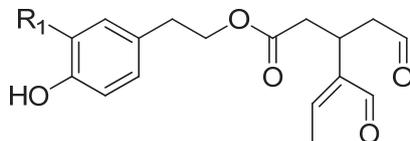
## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20           En la presente invención, los autores han descubierto que los secoiridoides, tales como la oleaceína y el oleocantal, tienen efectos protectores sobre la integridad y la función de la barrera hematoencefálica (BBB)/barrera intestinal, así como sobre los eventos oxidativos e inmunitarios-inflamatorios relacionados con alteraciones gastrointestinales inmunomediadas.

25           Los secoiridoides son monoterpenoides derivados de iridoides de plantas basados en la cadena principal 7,8-seco-ciclopenta[c]-piranoide (Rodriguez S. et al., Current Organic Chemistry; 1998, 2, 627-648). La mayoría de los secoiridoides y los iridoides se han aislado de plantas y se conocen aproximadamente 600 estructuras diferentes. Casi todos los secoiridoides son glucósidos. Este grupo de fitoquímicos se produce ampliamente en la naturaleza, y muestran una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas, incluyendo actividades antibacterianas, antineoplásicas, anticoagulantes, antifúngicas, antioxidativas, antiprotozoicas y hepatoprotectoras (Dinda B. et al., Chem Pharm Bull (Tokio). Agosto de 2009;57(8):765-96).

35           Estos productos son sustancias naturales que pueden aislarse de las olivas, estos compuestos podrían usarse como complemento de la dieta o en preparaciones nutracéuticas.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

5

sus sales, tautómeros y/o solvatos de los mismos farmacéuticamente aceptables en la que  $R_1$  es un  $-OH$  o  $H$  para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas.

10

Las enfermedades inflamatorias inmunomediadas que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas se seleccionan preferiblemente de la lista que comprende; enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso diseminado (SLE) y psoriasis/artritis psoriásica y miocarditis.

15

La expresión "sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos" se refiere a sales o solvatos que, cuando se administran al destinatario, pueden proporcionar un compuesto tal como el que se describe en este documento. La preparación de sales y derivados puede realizarse por métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como molestias gástricas, vértigo y efectos secundarios similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recogido en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

20

25

30

Los compuestos usados en la invención pueden estar en forma cristalina, como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, hidratos), y se entiende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación en general son conocidos en el estado de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, el solvato es un hidrato.

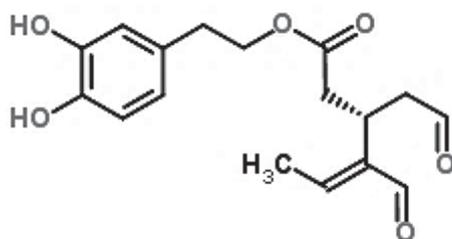
35

Se entiende que "tautómeros" son los dos isómeros que difieren únicamente en la posición de un grupo funcional porque entre las dos formas hay un equilibrio químico en que

se produce una migración de un grupo o átomo.

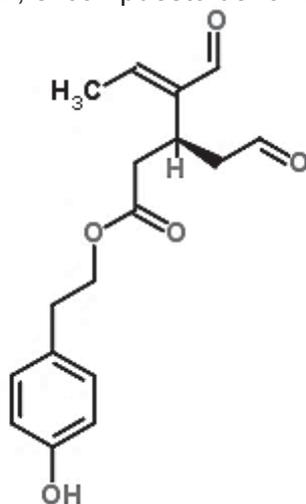
Salvo que se indique de otro modo, los compuestos usados en la invención están destinados a incluir compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de deuterio o un átomo de tritio, o la sustitución de un átomo de carbono por un átomo de carbono enriquecido en  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o un átomo de nitrógeno enriquecido en  $^{15}\text{N}$  están dentro del alcance de esta invención.

En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) es oleaceína:



Oleaceína

En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es oleocantal:



Oleocantal

En una realización particular, la dosis administrada de compuesto de fórmula (I), sus sales, tautómeros y/o solvatos del mismo farmacéuticamente aceptables (a partir de ahora en este documento los compuestos de la presente invención) varía entre 5 mg/día y 20 mg/día, más particularmente 10 mg por kg por día.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo: oral, parenteral (subcutánea, intraperitoneal,

intravenosa, intramuscular, etc.), intranasal inhalados, etc.

5 La invención también se refiere a una composición que comprende los compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas.

La composición podría ser una composición farmacéutica o una composición nutracéutica.

10 La expresión composición nutracéutica como se usa en este documento incluye alimentos, productos alimenticios, complementos dietéticos, complementos nutritivos o composición de complemento para un alimento o un producto alimenticio.

15 En una realización particular, la composición es una composición farmacéutica, en la que los compuestos de la presente invención se combinan con excipientes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 La expresión "excipientes, adyuvantes y/o vehículos" se refiere a entidades moleculares o sustancias mediante las que se administra el ingrediente activo. Dichos excipientes, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y aceites similares, excipientes, agentes disgregantes, humectantes o diluyentes. Los excipientes y vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W.  
25 Martin.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo: oral, parenteral (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), etc.

35 En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica de administración oral, sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, diluyentes, agentes disgregantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden prepararse por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en la forma galénica adecuada; en este caso,

dichas composiciones farmacéuticas incluirán excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se eligen de acuerdo con la forma farmacéutica de administración seleccionada. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y su preparación en el libro "Treatise on Galenic Pharmacy" de C. Faulí i Trillo, 10.<sup>a</sup> Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, o cualquier libro de características similares en cada país.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse junto con otros fármacos adicionales para proporcionar un tratamiento combinado. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, como alternativa, pueden proporcionarse como una composición separada para administración simultánea o no con la composición farmacéutica que comprende los compuestos de la presente invención.

Para uso terapéutico, los compuestos de la presente invención están en una forma farmacéuticamente aceptable o están sustancialmente puros, es decir, que tienen un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza excluyendo los aditivos farmacéuticos normales, tales como diluyentes y vehículos, y están libres de cualquier material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para la sustancia activa son particularmente por encima de un 50 %, más particularmente por encima de un 70 % y aún más particularmente por encima de un 90 %. En una realización particular, los niveles del compuesto con fórmula (I), o sus sales o solvatos, están por encima de un 95 %.

Como se ha dicho anteriormente, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I), sus sales, tautómeros y/o solvatos de los mismos farmacéuticamente aceptables o composiciones para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas. Como alternativa, la invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir enfermedades inflamatorias inmunomediadas que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas, que comprende administrar un compuesto o una composición de la invención a un sujeto que lo necesita. Como alternativa, la invención se refiere al uso de un compuesto o una composición de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias inmunomediadas que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas.

Se entiende ampliamente que "tratamiento" se refiere a reducir el potencial de una determinada enfermedad, reducir la aparición de una determinada enfermedad y/o una reducción en la gravedad de una determinada enfermedad particularmente, a un grado que el sujeto ya no padezca malestar y/o función alterada debido a ello. "Tratamiento" se refiere

a proporcionar un beneficio terapéutico o un resultado clínico deseado, que no es necesariamente una cura para una enfermedad o trastorno particular, sino que en su lugar abarca un resultado que muy típicamente incluye el alivio de la enfermedad, eliminación de la enfermedad, reducción o alivio de un síntoma asociado con la enfermedad, prevención de una enfermedad secundario resultante de la aparición de una enfermedad primaria, disminución del grado de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado patológico, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable de la enfermedad.

"Prevención" pretende evitar la aparición de dicha enfermedad. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de una enfermedad). La prevención también puede ser parcial, de modo que, por ejemplo, la aparición de una enfermedad en un sujeto sea menor que la que se habría producido sin la administración de los compuestos de la presente invención. La prevención también se refiere a susceptibilidad reducida a una afección clínica.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica de la presente invención. Durante toda la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Llegará a ser evidentes para los expertos en la materia objetivos, ventajas y características adicionales de la invención tras el examen de la descripción o pueden aprenderlos mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Fig. 1. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce el estrés oxidativo en tejido de colon.** Para examinar si el tratamiento con OLE evita la producción del anión superóxido, se aisló tejido de colon de ratones a los 21-23 días después de la inmunización y se tiñeron con el marcador fluorescente por oxidación, dihidroetidio, DHE. Imágenes representativas de la tinción con DHE y gráfico de barras que muestra la cuantificación de fluorescencia roja de secciones de colon de ratones control. C; de ratones control tratados con OLE, C+OLE; de ratones inducidos, EAE; y de ratones inducidos tratados con OLE, EAE+OLE. La EAE indujo acumulación del anión superóxido en el colon. El tratamiento con oleaceína mejoró

este parámetro.

**Fig. 2. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce los parámetros de daño oxidativo en tejido de colon.** Se usaron los niveles de expresión de malondialdehído, MDA (A) y el poder antioxidante/reductor férrico, FRAP (B) en colon como indicadores de respuestas protectoras. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. EAE, ratones inducidos. EAE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de 5 animales.  $\ddagger p < 0,001$  frente al control; y  $*p < 0,001$  frente a EAE.

**Fig. 3. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce los parámetros de daño intestinal.** Se usaron niveles de expresión de CD14 soluble e iFABP en suero como marcadores subrogados de traslocación microbiana e integridad de la barrera intestinal, respectivamente. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. EAE, ratones inducidos. EAE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de 5 animales.  $\ddagger p < 0,001$  frente al control; y  $*p < 0,001$  frente a EAE.

**Fig. 4. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce los parámetros de permeabilidad intestinal.** Se prepararon sacos intestinales del colon (A) o íleon (B) de ratones de los diferentes grupos experimentales. Los sacos se cargaron con dextrano marcado con FITC (FD-40) y se colocaron en un baño. Después de 120 min, se cuantificó la concentración de FD-40 presente en las soluciones del baño. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. EAE, ratones inducidos. EAE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de 5 animales.  $\ddagger\ddagger\ddagger p < 0,05$  frente al control; y  $***p < 0,05$  frente a EAE.

**Fig. 5. El tratamiento con oleaceína (OLE) modula los parámetros de lesión intestinal.** (A) Análisis histológico y cuantificación de mucinas del colon. Para examinar si el tratamiento con OLE evita una disminución en el contenido de mucinas, se aisló el colon de ratones a los 21-23 días después de la inmunización y se tiñeron con AB/PAS. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. EAE, ratones inducidos. EAE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. (B) Expresión de galectina-3 (Gal-3) en tejido de colon de todos los grupos experimentales. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de 5 animales.  $\ddagger\ddagger p < 0,01$  frente al control; y  $***p < 0,05$  frente a EAE.

**Fig. 6. El tratamiento con oleaceína (OLE) modula los parámetros inflamatorios en colon.** Se usó la expresión de parámetros relacionados con inflamación como medidas

de respuestas protectoras: niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , TNF $\alpha$  (A), interleucina-1  $\beta$ , IL-1 $\beta$  (B), interleucina-33, IL-33 (C) e interleucina-25, IL-25 (D) en colon, se usaron como medidas para evaluar respuestas protectoras. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. EAE, ratones inducidos. EAE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de 5-8 animales.  $\ddagger\ddagger p < 0,01$  y  $\ddagger\ddagger\ddagger p < 0,05$  vs frente al control y  $**p < 0,01$  y  $***p < 0,05$  frente a EAE.

**Fig. 7. La oleaceína (OLE) inhibe las respuestas de células epiteliales intestinales activadas**, incluyendo la producción de especies de reactivas oxígeno, ROS (A); la inducción de citocinas inflamatorias tales como interleucina-8, IL-8 (B); la alteración de la función de barrera de monocapas de Caco-2 (C).

Las células epiteliales intestinales Caco-2 se pretrataron durante 30 minutos con las dosis indicadas de OLE: (A) Después de 24 h de estimulación con 400  $\mu$ M de t-BOOH (hidroperóxido de tert-butilo) o 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se evaluó la producción de ROS intracelular por análisis de citometría de flujo. El panel muestra la cuantificación expresada en unidades arbitrarias (A.U.). (B) Después de 24 h de estimulación con 25 ng/ml de IL-1 $\beta$ , se midieron los niveles de IL-8 en sobrenadantes del cultivo celular por ELISA comercial. (C) Después de 24 h de estimulación con 100 ng/ml de TNF $\alpha$ , se evaluó la integridad de la monocapa por mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y de la permeabilidad a FD-40.  $\ddagger p < 0,001$  frente al control y  $*p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$  y  $***p < 0,05$  frente a estímulos sin OLE; n= 3.

**Fig. 8. El oleocantal (OLC) inhibe las respuestas de células epiteliales intestinales activadas**, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno, ROS (A); la inducción de citocinas inflamatorias tales como interleucina-8, IL-8 (B); la alteración de la función de barrera de monocapas de Caco-2 (C).

Las células epiteliales intestinales Caco-2 se pretrataron durante 30 min con las dosis indicadas de oleocantal (OLC): (A) Después de 24 h de estimulación con 400  $\mu$ M de t-BOOH o 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se evaluó la producción de ROS intracelular por análisis de citometría de flujo. El panel muestra la cuantificación expresada en unidades arbitrarias (A.U.). (B) Después de 24 h de estimulación con 25 ng/ml de IL-1 $\beta$ , se midieron los niveles de IL-8 en sobrenadantes de cultivo celular por ELISA comercial. (C) Después de 24 h de estimulación con 100 ng/ml de TNF $\alpha$ , se evaluó la integridad de la monocapa por mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la permeabilidad a FD-40.  $\ddagger p < 0,001$  frente al control y  $*p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$  y  $***p < 0,05$  frente a estímulos sin OLE; n= 3.

**EJEMPLOS**

La invención se ejemplificará, pero no necesariamente se limitará por los siguientes experimentos.

5

10

Los ratones C57B/L inmunizados con un péptido de la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), el modelo de EAE, desarrollan varios rasgos característicos de disfunción gastrointestinal: permeabilidad intestinal aumentada, estructura alterada de la mucosa incluyendo inflamación en el intestino delgado y disbiosis. Por tanto, la EAE se ha considerado como un modelo valioso para investigar las alteraciones gastrointestinales inmunomediadas y para buscar nuevos tratamientos (E. T. Spear et al., "Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis" 2018, DOI: 10.1111/nmo.13349).

15

20

25

30

En los experimentos, los autores de la invención usaron quince animales por grupo. Se inmunizaron ratones C57BL con un péptido MOG para inducir la enfermedad EAE. La inmunización se realizó con 100 µg de un péptido parcial de la glicoproteína de mielina/ de oligodendrocitos (MOG33-55) en adyuvante completo de Freund que contenía 4 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en 1 ml. Los ratones se inmunizaron por inyección subcutánea de esta emulsión en el día 0. Además, en el día 0 y 2, se les administró por vía intraperitoneal 300 ng/200 µl de toxina de *Bordetella pertussis*. La administración de 10 mg/kg de oleaceína (OLE) ácida se realizó por vía intraperitoneal una vez al día, empezando en el día de la inmunización. La oleaceína se aisló de un extracto de aceite de oliva preparado usando el método de extracción descrito por Karkoula E. (Karkoula E. et al., J Agric Food Chem. 2012;60:11696–11703). En resumen, se aisló oleaceína pura, así como oleocantal, de un extracto de aceite de oliva preparado usando el método de extracción similar al descrito a continuación para la preparación de muestras. Se mezcló aceite de oliva (5,0 g) con ciclohexano (20 ml) y acetonitrilo (25 ml). La mezcla se homogeneizó usando una mezcladora de vórtice durante 30 s y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. Una parte de fase de acetonitrilo (25 ml) se recogió, se mezcló con 1,0 ml de una solución de siringaldehído (0,5 mg/ml) en acetonitrilo y se evaporó a presión reducida usando un evaporador giratorio (Buchi, Flawil, Suiza).

35

Está ampliamente aceptado que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es una usual respuesta celular frente a desafíos ambientales y/o fisiológicos, y hay crecientes evidencias que implican la activación de ROS en la génesis de la lesión intestinal. Por ello, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó en colon midiendo la acumulación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) *in situ*. Secciones de tejido se incubaron con DHE

y la fluorescencia roja del etidio se visualizó y cuantificó con un microscopio de fluorescencia (fig. 1). La intensidad de las señales de fluorescencia se cuantificó usando el programa informático Image J (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). La elevada fluorescencia roja en las secciones de colon de ratones con EAE, en comparación con la observada en los ratones control, indicó s un exceso de los niveles de anión superóxido, y el tratamiento con OLE previno esta acumulación aumentada de  $O_2^{\cdot-}$ .

Dado que el anión superóxido se ha implicado en la peroxidación de lípidos, los autores de la invención evaluaron en colon los niveles de malondialdehído (MDA), como productos finales de la peroxidación lípidica (fig. 2A). El tejido de colon de ratones con EAE mostró niveles significativamente aumentados de MDA en comparación con el grupo control. Mientras tanto, el tratamiento con OLE evitó de forma eficaz estos aumentos. Asimismo, la capacidad antioxidante, evaluada por un ensayo del poder antioxidante/reductor férrico (FRAP), como marcador del estado antioxidante no enzimático, se redujo significativamente en el colon de ratones con EAE en comparación con el grupo control (fig. 2B). El tratamiento con OLE mostró una atenuación significativa de esta disminución en comparación con ratones con EAE no tratados.

Los daños intestinales debido a estresantes fisiológicos, tales como el estrés oxidativo, pueden contribuir a potenciar la alteración de la barrera intestinal, por ello los cambios de los marcadores serológicos subrogados de permeabilidad intestinal alterada y translocación microbiana, elCD14 soluble e iFABP se evaluaron en el suero de ratones con EAE no tratados y tratados con OLE. La inducción de EAE aumentó significativamente los niveles sericos de sCD14 e iFABP en comparación con los ratones control sanos, y el tratamiento con OLE atenuó significativamente esta respuesta (fig. 3).

A continuación, los autores de la invención analizaron el efecto protector de la OLE sobre la función de la barrera intestinal por medición *ex vivo* de la permeabilidad intestinal a FD-40, usando un ensayo de saco intestinal no-invertido. La permeabilidad del íleon y del colon a FD-40 en el grupo de EAE fue significativamente mayor en comparación con el grupo control (fig. 4A y B) y el tratamiento con OLE protegió contra este aumento.

Niveles altos de estres oxidativo en colon se ha relacionado directamente con una reducción en el contenido de mucinas. El análisis combinado de tinción con azul alciano/ácido peryódico-Schiff (AB/PAS) se usó para evaluar la variación en el contenido de mucinas ácidas y neutras en colon de ratones de los cuatro grupos experimentales (fig. 5A). Las imágenes se cuantificaron usando el programa informático Image J (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Las secciones de colon de ratones con EAE mostraron una disminución sustancial

en la tinción global de AB/PAS en comparación con el grupo control, y la intervención con OLE evitó esta disminución significativa observada en los tejidos de ratones con EAE. El tratamiento con OLE no afectó a la cantidad de células de Goblet teñidas ácidas-positivas y neutras-positivas en el colon de ratones del grupo control.

5

Los autores de la invención también evaluaron los niveles de expresión de la proteína endógena de unión a galactósido, galectina-3, que se sabe que interactúa con mucinas del colon y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función de barrera de la mucosa. Los niveles de galectina-3 disminuyeron en colon de ratones con EAE, comparados con los de ratones control sanos, y el tratamiento con OLE evitó esta reducción (fig. 5B).

10

Después de demostrar que la OLE protege de la ruptura de la permeabilidad intestinal, se evaluó si el tratamiento con OLE también evitaba un equilibrio alterado de Th1/Th2 en colon. Los autores de la invención descubrieron que la OLE reducía significativamente los niveles de las citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , conocidas por ser proinflamatorias, y observadas sobre-expresada en tejido de colon de ratones con EAE (fig. 2A). Además, la expresión de las citocinas inmunorreguladoras que desempeñan funciones importantes en la mejoría de los procesos patológicos autoinmunitarios, tales como IL-25 e IL-33, se encontró disminuida en el colon de ratones con EAE, y el tratamiento con OLE protegió contra esta disminución.

15

20

A continuación, para evaluar si los efectos protectores encontrados *in vivo* en ratones con EAE tratados con OLE implican acciones directas sobre las células que son esenciales para mantener una barrera intestinal funcional, los autores de la invención examinaron los efectos de la OLE en monocultivos de células Caco-2, una línea celular epitelial humana que se ha usado ampliamente como un modelo de la barrera epitelial intestinal (fig. 7).

25

Los autores de la invención evaluaron la capacidad de la OLE de proteger las monocapas de células Caco-2 del estrés oxidativo usando la sonda DCFH-DA y análisis de citometría de flujo. Se observó una acumulación notable de ROS en células Caco-2 estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y t-BOOH, en comparación con las no tratadas, y el pretratamiento con OLE anuló esa respuesta (fig. 7A). Los autores de la invención también investigaron la capacidad de la OLE de regular la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiotácticas, tales como IL-8. La estimulación de células Caco-2 con IL-1 $\beta$  dio lugar a un fuerte aumento en la producción de IL-8, mientras que la presencia de OLE inhibió la sobre-expresión de esta quimioquina, de una manera dependiente de la dosis (fig. 7B).

30

35

Los autores de la invención también estudian el efecto de la OLE sobre la integridad de la monocapa de células de Caco-2 mediante medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y de la permeabilidad a FD-40. La estimulación con TNF $\alpha$  indujo una disminución significativa en TEER y un aumento significativo en la permeabilidad a FD-40 en las células Caco-2. El pretratamiento celular con OLE atenuó esta disfunción de la barrera epitelial inducida por TNF $\alpha$ . La presencia de OLE a las dosis usadas no afectó a la función basal de la barrera epitelial de Caco-2 (fig. 7C).

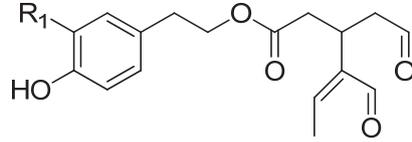
Finalmente, los autores de la invención también evalúan los efectos protectores de otro secoiridoide natural: el oleocantal (OLC) en células Caco-2, una línea celular epitelial humana que se ha usado ampliamente como modelo de la barrera epitelial intestinal, para imitar las respuestas observadas en trastornos intestinales (fig. 8). El oleocantal se aisló de un extracto de aceite de oliva preparado usando el método de extracción descrito por Karkoula E. (Karkoula E. et al., J Agric Food Chem. 2012; 60:11696–11703) como se indica anteriormente.

Entonces, los autores de la invención evaluaron la capacidad del OLC de proteger las monocapas de células Caco-2 del estrés oxidativo usando la sonda DCFH-DA y análisis de citometría de flujo. Se observó una acumulación notable de ROS en las células Caco-2 estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y t-BOOH, en comparación con las no tratadas, y el pretratamiento con OLC anuló esa respuesta (fig. 7A). Los autores de la invención también investigaron la capacidad del OLC de regular la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiotácticas, tales como IL-8. La estimulación de las células Caco-2 con IL-1 $\beta$  dio lugar a un fuerte aumento en la producción de IL-8, mientras que la presencia del OLC inhibió la sobreexpresión de esta quimiocina de una manera dependiente de la dosis (fig. 7B).

Los autores de la invención también estudian el efecto del OLC sobre la integridad de la monocapa de células Caco-2 mediante medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y de la permeabilidad a FD-40. La estimulación con TNF $\alpha$  indujo una disminución significativa en TEER y un aumento significativo en la permeabilidad a FD-40 en las células Caco-2. El pretratamiento celular con OLC atenuó esta disfunción de la barrera epitelial inducida por TNF $\alpha$ . La presencia del OLC a las dosis usadas no afectó a la función basal de la barrera epitelial de Caco-2 (fig. 7C).

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

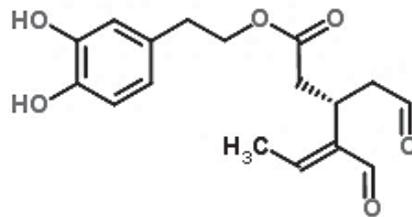
5

sus sales, tautómeros y/o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que  $R_1$  es  $-OH$  o  $H$ ,

para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas.

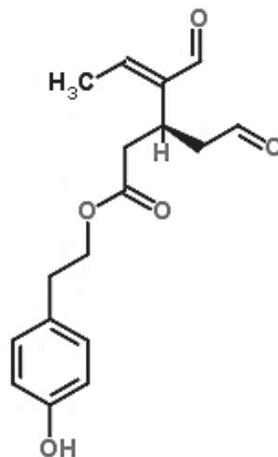
10

2. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es oleaceína:

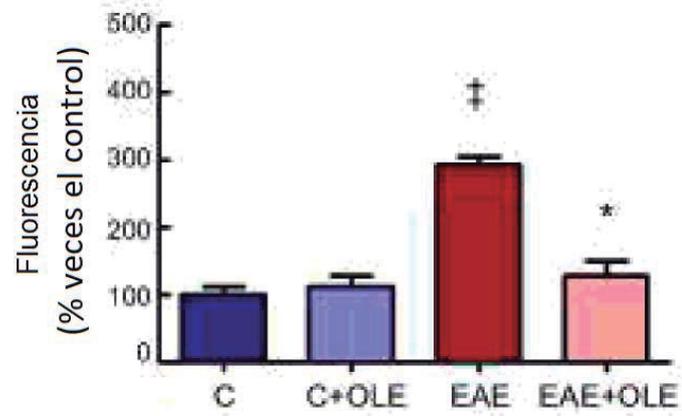


15

3. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es oleocantal:



4. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto se administra vía oral, parenteral o intranasal.
5. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto se administra a una dosis entre 5 mg/día y 20 mg/día.
6. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la enfermedad inflamatoria inmunomediada que provoca alteraciones intestinales inmunomediadas se selecciona de la lista que comprende; enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso diseminado (SLE) y psoriasis/artritis psoriásica y miocarditis.
7. Una composición que comprende el compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) que provocan alteraciones intestinales inmunomediadas.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición es una composición farmacéutica o composición nutracéutica.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende además otros fármacos adicionales para proporcionar un tratamiento combinado.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la enfermedad inflamatoria inmunomediada que provoca alteraciones intestinales inmunomediadas se selecciona de la lista que comprende; enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso diseminado (SLE) y psoriasis/artritis psoriásica y miocarditis.

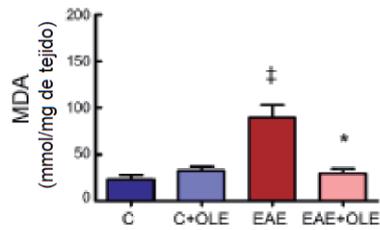


**FIG. 1**

COLON

A

Peroxidación de lípidos



B

Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

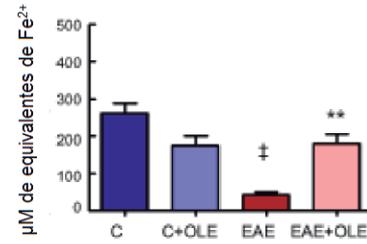


FIG. 2

SUERO

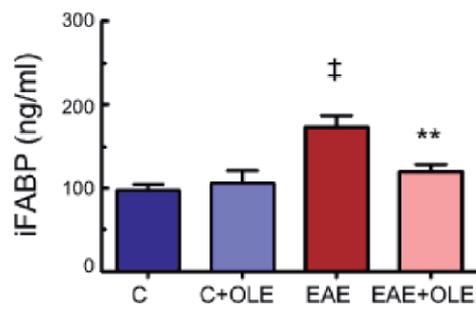
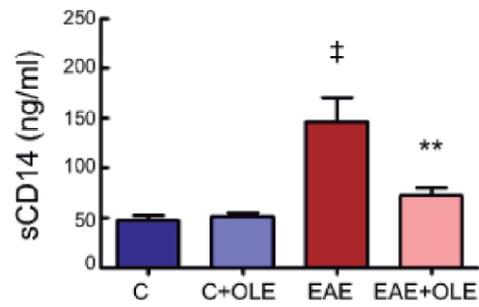


FIG. 3

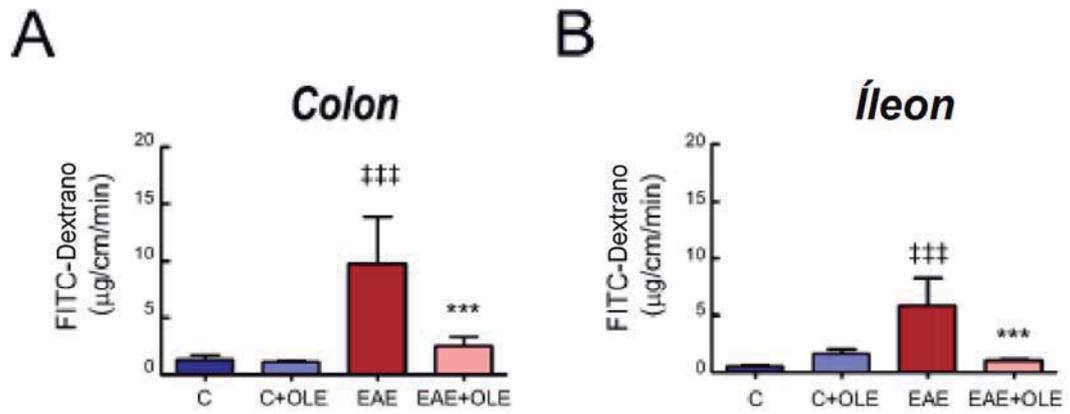
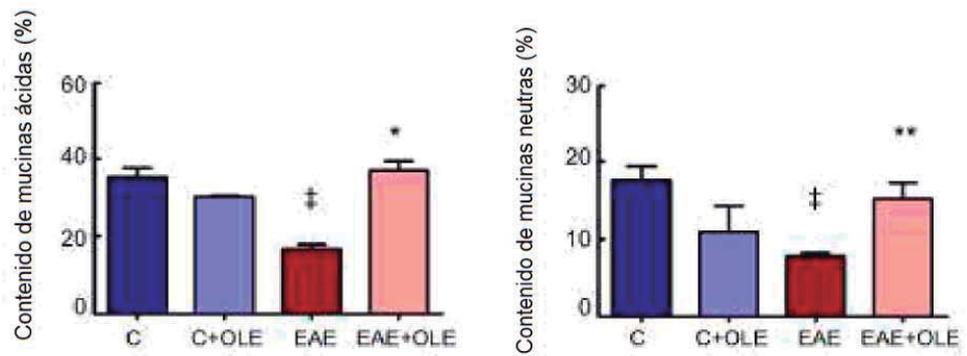
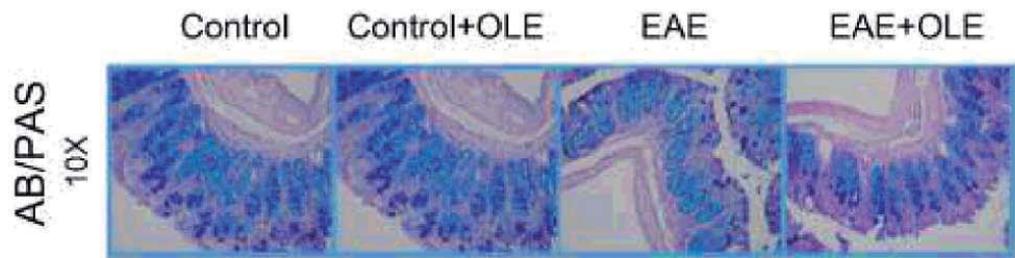


FIG. 4

COLON

A



B

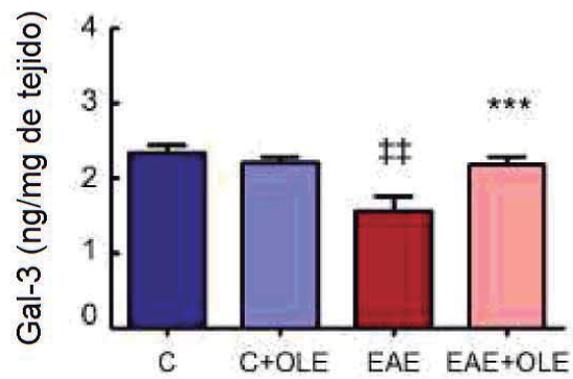


FIG. 5

COLON

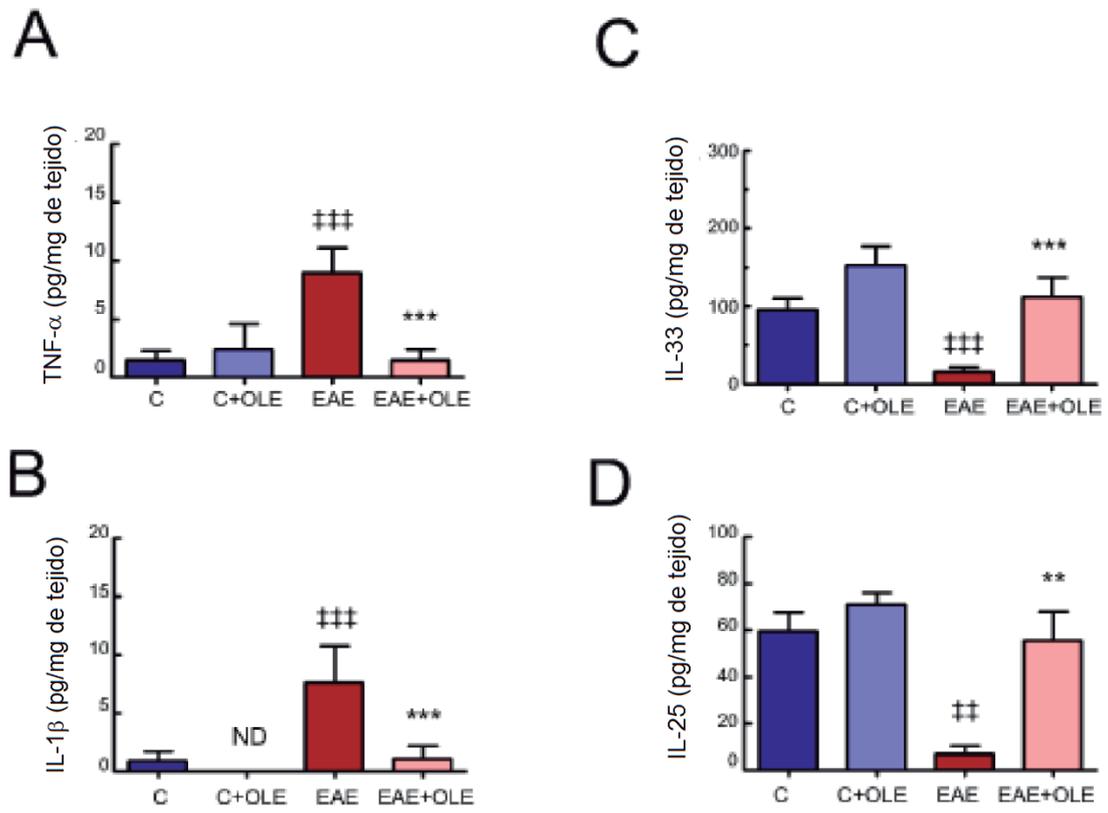


FIG. 6

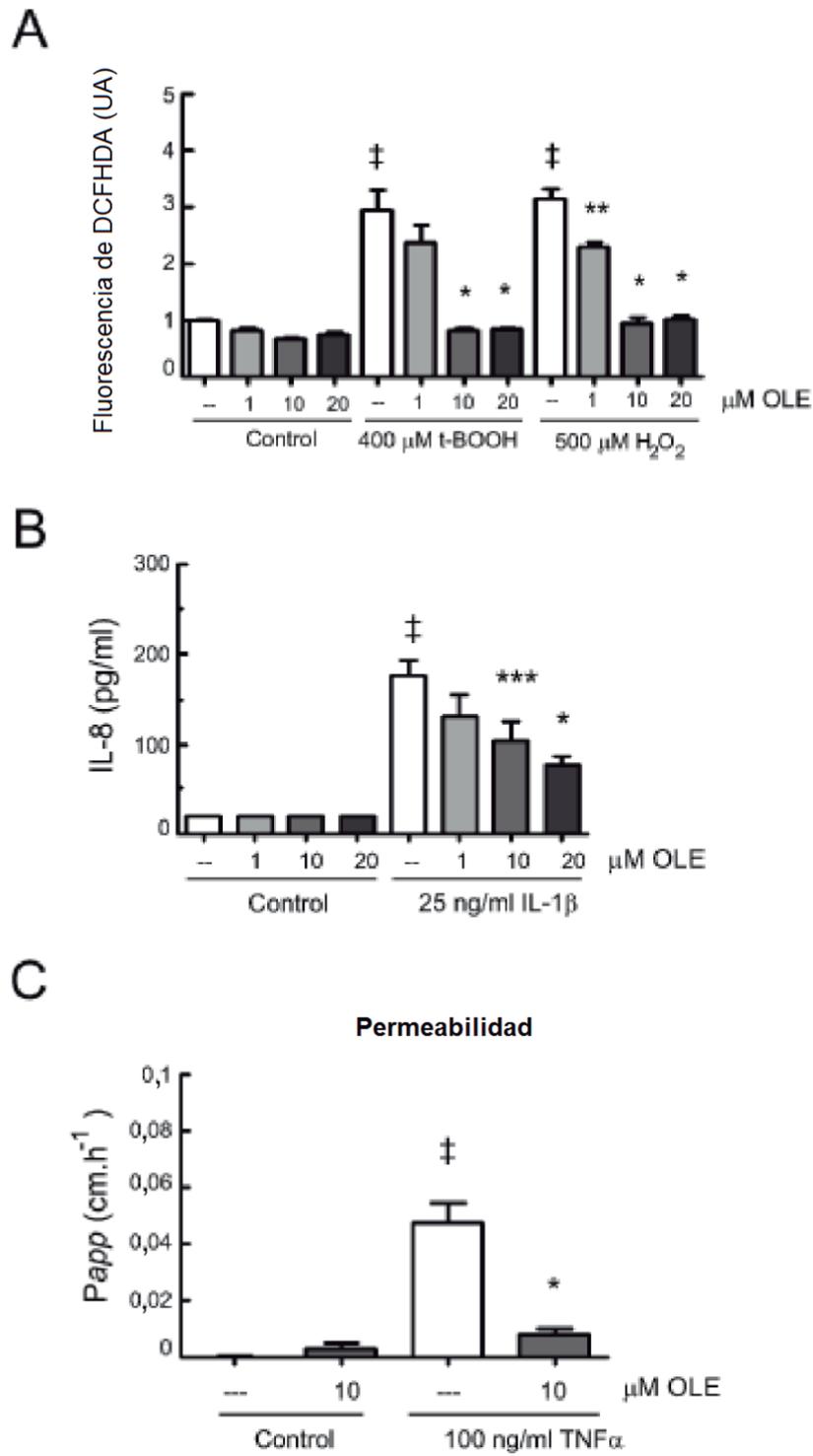
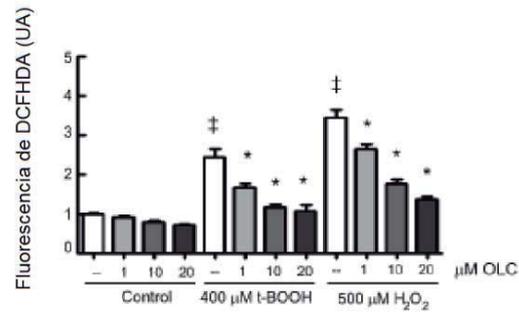
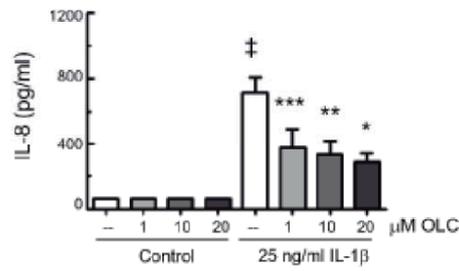


FIG. 7

A. Producción de ROS



B. Citocinas inflamatorias



C. Permeabilidad

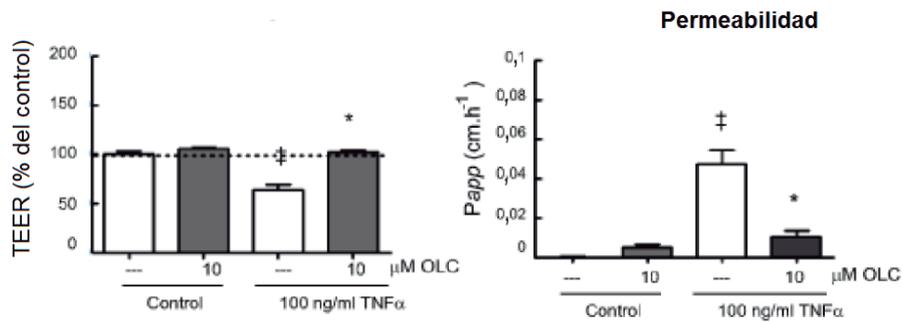


FIG. 8



21 N.º solicitud: 201831297

22 Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A61K31/222** (2006.01)  
**A61K36/63** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2010173856 A1 (DENK ERWIN) 08/07/2010, párrafo 0031 ejemplos y reivindicaciones	1-10
X	US 2018162800 A1 (HAN QIANG et al.) 14/06/2018, figura 1, párrafo 150	1-10
X	WO 2007133908 A2 (UNIV PENNSYLVANIA et al.) 22/11/2007, figura 9, párrafo 130.	1-10
A	WO 2009024680 A1 (GIREX et al.) 26/02/2009, reivindicaciones	1-10
A	PARKINSON LISA et al. Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease.. International journal of molecular sciences Switzerland 11 Jul 2014. , 11/07/2014, Vol. 15, Nº 7, Páginas 12323 - 12334, ISSN 1422-0067 (Electronic), <DOI: doi:10.3390/ijms150712323 pubmed:25019344>. pagina 12330, conclusiones	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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  
17.10.2019

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, PATENW, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, CAPLUS