

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 318**

51 Int. Cl.:

A61K 31/216 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2018** **PCT/EP2018/053520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018** **WO18149812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2018** **E 18708058 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 3582767**

54 Título: **Un ingrediente activo farmacéutico y uso del mismo, en particular para la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos en humanos y animales**

30 Prioridad:

16.02.2017 FR 1770144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

**VALBIOTIS (25.0%)
Rue Paul Vatine, ZI des quatre Chevaliers,
Bâtiment 12 F
17180 Perigny, FR;
UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE (25.0%);
LA ROCHELLE UNIVERSITÉ (25.0%) y
CNRS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**PELTIER, SÉBASTIEN;
CHAVANELLE, VIVIEN;
LE JOUBIOUX, FLORIAN;
SIRVENT, PASCAL y
MAUGARD, THIERRY**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 879 318 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

Un ingrediente activo farmacéutico y uso del mismo, en particular para la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos en humanos y animales

La presente invención se refiere a un ingrediente activo farmacéutico que consiste en la combinación de dos moléculas y su uso como un fármaco, en particular en la prevención y/o tratamiento de trastornos patológicos metabólicos glucídicos y/o lipídicos.

Los trastornos y enfermedades metabólicas crónicas son cada vez más comunes. Este es el caso en particular de la diabetes tipo 2, que se ha convertido en un importante desafío médico en todo el mundo (Boyle JP y otros, *Popul Health Metr* 2010; 8:29). De hecho, de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), el número de diabéticos tipo 2 era de 415 millones en 2015 y podría llegar a 642 millones de aquí a 2040, lo que supone un aumento del 55 % (Atlas de Diabetes de la FID, 7^{ta} edición). En 2015, la diabetes fue la causa de 5 millones de muertes, que es una muerte cada seis segundos, y el gasto mundial en salud relacionado con esta patología fue de 673 mil millones de dólares.

La diabetes tipo 2 se caracteriza por una concentración anormalmente alta de azúcar en la sangre y una intolerancia a los carbohidratos. La principal causa de este estado hiperglucémico crónico es una resistencia a la insulina y una secreción insuficiente en respuesta a un estado metabólico determinado (Beigi FI, *N Eng J Med* 2012; 366:1319-27). Para combatir esta patología, el principal objetivo es reducir los niveles de glucemia y reducir la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) a un nivel menor o igual al 7,0 % para adultos (excepto para mujeres embarazadas; ADA, *Diabetes Care* 2015; 38(1):S33-S40). La gran mayoría de los pacientes diagnosticados reciben tratamiento farmacológico por el resto de sus vidas (Qaseem A y otros, *Ann Intern Med* 2012; 156:218-31). No obstante, las terapias actuales no son efectivas para corregir las causas de la diabetes tipo 2 (Tao H y otros, *Nat Med* 2014; 20(11):1263-69), en particular la resistencia a la insulina y la pérdida de la capacidad del páncreas para secretar insulina en respuesta a un aumento de la glucemia. Por tanto, la mayoría de los pacientes se vuelven resistentes a los tratamientos actuales (Qaseem A y otros, *Ann Intern Med* 2012; 156:218-31; Nathan D y otros, *Diabetes Care* 2009; 32:193-203). El desarrollo de nuevos fármacos, en particular fármacos que sean capaces de mantener aún más la secreción de insulina en respuesta a un aumento de la glucemia, es una prioridad para combatir el desarrollo de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones. A través de estos efectos, fármacos de este tipo harían posible retrasar o incluso no iniciar la terapia con insulina. En los pacientes diabéticos, también existe una alta prevalencia de EHGNA que varía entre el 50 y el 70 % (Anstee Q y otros, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10:330-44; Targher G y otros, *Diabetes Care* 2007; 30:1212-8; Williamson R y otros, *Diabetes Care* 2011; 34:1139-44). EHGNA o esteatosis hepática no alcohólica (equivalente al término "enfermedad del hígado graso no alcohólico") abarca un espectro desde la esteatosis hepática simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y la cirrosis (Angulo P *N Eng J Med* 2002; 346:1221-31; Neuschwander-Tetri B y otros, *Hepatology* 2003; 37:1202-19; Adams L y otros, *Gastroenterology* 2005; 129:113-21; Kotronen A y otros, *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3490-7). La EHNA se caracteriza por una excesiva acumulación intrahepática de grasas (esteatosis), que puede estar aislada o asociada a una inflamación hepática inespecífica. EHNA es la forma progresiva de EHGNA y se define por la combinación de esteatosis en más del 5 % de las células hepáticas con inflamación lobular y daño de los hepatocitos (hinchamiento) (Adams L y otros, *Cmaj* 2005; 172:899-905; Kleiner D y otros, *Hepatology* 2005; 41:1313-21; Brunt E *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:195-203). La esteatosis simple, que afecta entre el 1 y el 5 % de los hepatocitos, se considera fisiológica y tiene una evolución benigna, mientras que la EHNA se define por daño hepatocelular, inflamación y/o fibrosis que puede conducir a cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (Vanni E y otros, *Dig Liver Dis* 2010; 42:320-30).

Además, los pacientes diabéticos tipo 2 tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular. Por lo tanto, también es necesario manejar los factores de riesgo cardiovascular tradicionales como, en particular, el control de los lípidos circulantes y el peso. Actualmente, esta necesidad requiere que se tomen simultáneamente varios fármacos de diferentes clases terapéuticas. Pero la combinación de fármacos a veces puede producir reacciones secundarias graves, por ejemplo, cuando se administran simultáneamente fibratos y estatinas, lo que aumenta el riesgo de miopatía (Denke MJ *Manag Care Pharm* 2003; 9:17-9).

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de fármacos cuyo mecanismo de acción de "blancos múltiples" sea ventajoso en términos de cumplimiento, tolerancia y efectividad. Productos de este tipo harían posible reducir el riesgo global de enfermedades cardio-metabólicas y prevenir y tratar independientemente cada trastorno y/o sus consecuencias.

Un objetivo de la presente invención es proponer un ingrediente activo que satisfaga estas necesidades médicas insatisfechas y que sea, en particular, capaz de mantener una secreción adecuada de insulina en respuesta a un aumento de la glucemia durante el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Es importante señalar que, en la mayoría de los casos, en un paciente adulto, la EHGNA y la EHNA se asocian a la resistencia a la insulina y sus complicaciones fenotípicas, esencialmente las dolencias que forman parte del síndrome metabólico: diabetes tipo 2, obesidad, hipertensión arterial, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia

(Marchesini G y otros, Diabetes 2001; 50:1844-50); Ratzu V y otros, J Hepatol 2010; 53:372-84; Neuschwander-Tetri BA y otros, Hepatology 2003; 37:1202-19).

Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención es proponer un ingrediente activo capaz de:

- reducir la resistencia a la insulina;
- reducir el estrés oxidativo y la inflamación;
- limitar el desarrollo de adipocitos;
- reducir la tasa de triglicéridos circulantes.

Para cumplir estos objetivos, la invención se refiere al uso de un ingrediente activo farmacéutico que consiste exclusivamente en la combinación de:

- ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico, y
- (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo.

Los extractos de plantas que contienen estas moléculas ya se han descritos en la literatura científica para aplicaciones en productos nutricionales y composiciones farmacéuticas pero, sorprendentemente, los resultados obtenidos al usar el ingrediente activo de acuerdo con la invención son diferentes de los que se podrían obtener al usar extractos de plantas que contienen estas dos moléculas. El ingrediente activo consiste únicamente en estas dos moléculas, que actúan en sinergia en particular para reducir la glucemia en ayunas y limitar la pérdida de la capacidad del páncreas para secretar insulina en respuesta a un aumento de la glucemia. Ventajosamente, el ingrediente activo de acuerdo con la invención también haría posible considerar la implementación posterior de la terapia con insulina, lo que conduce a una mejora considerable de la calidad de vida (con inyecciones de insulina retardadas o incluso eliminadas) para los pacientes.

Por lo tanto, un ingrediente activo de este tipo haría posible ventajosamente limitar o incluso eliminar la resistencia a la insulina, que es un mecanismo importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Además, el ingrediente activo de acuerdo con la invención es capaz de actuar sobre el estrés oxidativo, la inflamación y el metabolismo lipídico al reducir significativamente el desarrollo de adipocitos y triglicéridos séricos.

Por tanto, el objeto de la invención es un ingrediente activo farmacéutico que consiste exclusivamente de la combinación del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo, para el uso como producto farmacéutico o veterinario, en particular en la prevención y/o tratamiento de trastornos patológicos metabólicos glucídicos y/o lipídicos en humanos o animales.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un ingrediente activo que consiste exclusivamente de la combinación del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo para el mismo uso.

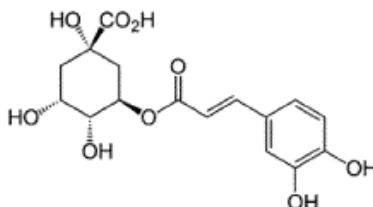
La invención se describirá ahora en detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 es una ilustración del desarrollo de diabetes tipo 2 en ratones;
- La Figura 2 muestra los resultados del ensayo que se presentan en el punto II, con relación a la ingesta dietética después de 5 semanas de tratamiento (valores promedio), estos resultados corresponden a los resultados de la Tabla 1;
- La Figura 3 muestra los resultados del ensayo que se presentan en el punto II, con relación a la glucemia en ayunas (valores promedio) después de 6 semanas de tratamiento, estos resultados corresponden a los resultados de la Tabla 2;
- La Figura 4 muestra los resultados del ensayo que se presenta en el punto II, con relación al factor de sinergia después de 6 semanas de tratamiento;
- La Figura 5 muestra los resultados del ensayo que se presenta en el punto II, con relación a la insulinemia en ayunas después de 6 semanas de tratamiento (valores promedio), estos resultados corresponden a los resultados de la Tabla 3;
- La Figura 6 muestra los resultados del ensayo que se presenta en el punto II, con relación a los triglicéridos séricos en ayunas después de 6 semanas de tratamiento (valores promedio), estos resultados corresponden a los resultados de la Tabla 4.

La invención se refiere a un ingrediente activo farmacéutico que consiste exclusivamente en la combinación del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y

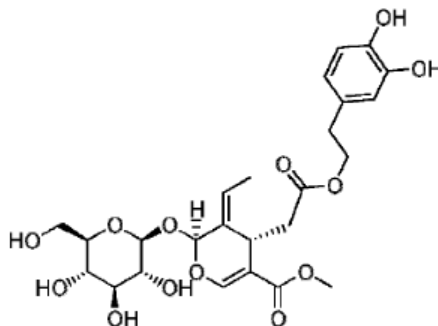
(2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo para el uso como producto farmacéutico o veterinario.

El ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[2-(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico corresponde a la siguiente fórmula:



También se puede hacer referencia al término "V63X35" en los ejemplos y pruebas que se presentan en la presente solicitud.

El (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo corresponde a la siguiente fórmula:



También se puede hacer referencia al término "V63X54" en los ejemplos y pruebas que se presentan en la presente solicitud.

Estas dos moléculas que constituyen el ingrediente activo de acuerdo con la invención son moléculas naturales o moléculas químicas y/o biotecnológicas sintéticas. Se entiende por moléculas naturales las moléculas extraídas de una materia prima vegetal con una pureza entre el 80 % y el 100 %.

El ingrediente activo consiste exclusivamente en estas dos moléculas y no comprende ninguna otra, a excepción de las impurezas en el caso de moléculas extraídas de una materia prima vegetal.

La relación en peso del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[2-(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico al (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo es preferentemente entre 1/40 y 1/1, y aún con mayor preferencia entre 1/1 y 1/10. De hecho, estas relaciones hacen posible obtener una efectividad óptima para la prevención y/o el tratamiento de trastornos metabólicos glucídicos y/o lipídicos, en particular en la lucha contra la diabetes tipo 2.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención puede presentarse en forma seca para su ingesta oral, la forma seca permite la producción de galénicos sólidos tales como comprimidos o cápsulas de gel. El ingrediente activo de acuerdo con la invención también puede estar presente en forma líquida para uso oral, enteral, parenteral o subcutáneo.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención puede obtenerse mediante cualquier proceso adecuado. En particular, puede obtenerse simplemente al mezclar las dos moléculas en las proporciones deseadas. Las moléculas que constituyen el ingrediente activo se obtienen preferentemente mediante un proceso de síntesis química y/o biotecnológica de las dos moléculas. El ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[2-(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico se puede sintetizar por acoplamiento químico y/o enzimático de (2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato al ácido (1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico. La reacción de esterificación se puede lograr preferentemente en un medio no convencional mediante el uso de un catalizador enzimático de lipasa. El (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-

piran-5-carboxilato de metilo se puede sintetizar mediante acoplamiento químico y/o enzimático de preferentemente 4-(2-hidroxietil)-1,2-bencenodiol glucosilado al ácido [(2S,3S,4S)-3-formil-5-(metoxycarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-il] acético. La reacción de esterificación y glucosilación se puede lograr preferentemente en un medio no convencional mediante el uso de catalizadores enzimáticos, respectivamente una lipasa y una β -D-glucosidasa.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención se usa preferentemente en una composición farmacéutica.

Por lo tanto, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente activo como se describió anteriormente, para el uso como producto farmacéutico o veterinario. Una composición de este tipo puede estar en forma líquida o sólida, en dependencia del modo y forma de administración seleccionada para el ingrediente activo.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención se encuentra preferentemente entre el 0,05 % (por ejemplo, una forma comprimida con excipientes) y el 100 % en peso de materia seca de la composición final (con exclusión del portador, por ejemplo un ingrediente activo que asciende al 100 % de la composición dentro de una cápsula de gel).

El peso de materia húmeda del ingrediente activo como porcentaje de la composición final depende de la naturaleza de los excipientes usados.

Adicional al ingrediente activo de acuerdo con la invención, la composición, cuando se presenta en forma seca o en forma seca para reconstituir en agua, puede comprender opcionalmente al menos un excipiente adecuado para esta forma que, aunque la lista no es exhaustiva, se selecciona, por ejemplo de: ácido esteárico, almidón de maíz, celulosa microcristalina, citral, sal de sodio croscarmelosa, crospovidona, óxido de hierro amarillo, gelatina, geraniol, goma xantana, hiprolosa, hipromelosa, indigotina, macrogol 400, macrogol 8000, estearato de magnesio, maltodextrina, Opadry claro, providona K 30, propilenglicol, sílice coloidal anhidra, carboximetil amidona de sodio, benzoato de sodio y dióxido de titanio.

Adicional al ingrediente activo de acuerdo con la invención, la composición, cuando se presenta en forma líquida, puede comprender opcionalmente al menos un excipiente adecuado para esta forma que, aunque la lista no es exhaustiva, se selecciona por ejemplo de: alcohol bencílico, carmelosa de sodio, cloruro de cetilpiridinio, agua WFI, glicerol, metacresol, fenol, fosfato monosódico dihidratado, fosfato disódico dihidratado, fosfato disódico dodecahidratado, propilenglicol, polisorbato 80, proteínas de *Escherichia coli*, cloruro de sodio, hidróxido de sodio y cloruro de zinc.

El ingrediente activo farmacéutico y la composición de acuerdo con la invención se pueden usar en particular en la prevención y/o el tratamiento de trastornos patológicos metabólicos glucídicos y/o lipídicos en seres humanos o animales.

En conformidad con lo establecido en la invención, se entiende por trastorno patológico metabólico cualquier trastorno que promueva y/o agrave y/o provoque patologías metabólicas. Las dolencias metabólicas forman un entorno patológico que agrupa trastornos multifactoriales que están más o menos conectados por una fuente, blancos metabólicos o mecanismos comunes.

En conformidad con lo establecido en la invención, se entiende por trastornos metabólicos glucídicos cualquier modificación del metabolismo celular de los carbohidratos que sea capaz de provocar y/o favorecer y/o agravar patologías. Por ejemplo, la diabetes tipo 2 está asociada con un trastorno metabólico glucídico que implica en particular un aumento de la producción de glucosa hepática.

En conformidad con lo establecido en la invención, se entiende por trastornos metabólicos lipídicos cualquier modificación del metabolismo celular de los lípidos que sea capaz de provocar y/o favorecer y/o agravar patologías. Por ejemplo, EHGNA está asociado con un trastorno metabólico lipídico que implica en particular una acumulación intrahepática excesiva de grasas.

El ingrediente activo y la composición de acuerdo con la invención son en particular efectivas para la prevención y/o el tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada de:

- diabetes tipo 2, al mantener una secreción adecuada de insulina en respuesta a un aumento de la glucemia durante el desarrollo de la enfermedad;
- enfermedades del hígado graso no alcohólico, en particular EHGNA y EHNA, al actuar sobre la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación;
- dislipidemia, en particular al reducir los triglicéridos séricos;
- obesidad al reducir el desarrollo de adipocitos;
- síndrome metabólico;
- patologías cardiovasculares, en particular patologías cardiovasculares que resultan de complicaciones de la diabetes tipo 2 y/o EHGNA o EHNA y/o dislipidemia y/u obesidad y/o síndrome metabólico, en particular

aquellas seleccionadas entre enfermedades coronarias, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades arteriales periféricas y trombosis venosas profundas.

Para estos efectos, las dos moléculas que constituyen el ingrediente activo de acuerdo con la invención actúan en sinergia.

Cuando se administra por vía oral a un ser humano, en particular a pacientes que padecen diabetes tipo 2, el ingrediente activo de acuerdo con la invención se administra preferentemente a una tasa de 5 a 5000 mg/día, y aún con mayor preferencia de 100 a 3000 mg/día. La dosis enteral, parenteral o intraperitoneal es preferentemente menor que al menos un factor de 5.

Cuando se administra por vía oral a un perro o gato, en particular a un perro o gato que padece de diabetes tipo 2, el ingrediente activo de acuerdo con la invención se administra preferentemente a una tasa de 1 a 5000 mg/día, y aún con mayor preferencia de 10 a 2000 mg/día. La dosis enteral, parenteral o intraperitoneal es preferentemente menor que al menos un factor de 5.

El ingrediente activo y la composición de acuerdo con la invención ventajosamente hacen posible reducir la glucemia, mantener una secreción adecuada de insulina en respuesta a un aumento de la glucemia durante el desarrollo de la diabetes tipo 2, aumentar la sensibilidad a la insulina, reducir la inflamación y el estrés oxidativo, reducir los triglicéridos en suero y regular el desarrollo de los adipocitos de manera beneficiosa. En particular, los efectos del ingrediente activo de acuerdo con la invención son mayores que los de la metformina, que es el medicamento de referencia para el tratamiento de la diabetes tipo 2, sobre el metabolismo de la insulina (Figura 5). Además, es posible tomar el ingrediente activo y la composición por vía oral de acuerdo con la invención, lo que es una ventaja particular con respecto a una serie de moléculas antidiabéticas que solo pueden administrarse por inyección (por ejemplo: dulaglutida, liraglutida, combinación de insulina glargina/lixisenatida).

La invención se describirá ahora mediante el uso de ejemplos de ingredientes activos y composiciones, así como también mediante el uso de los resultados de pruebas que demuestran la efectividad de la invención, sin que estos ejemplos y pruebas sean limitantes.

I. Ejemplos

Ejemplo 1: ejemplo de un ingrediente activo de acuerdo con la invención

El ingrediente activo de acuerdo con la invención del ejemplo 1 está compuesto por la combinación del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-([(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi)-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo en una relación de 1/4,6 en forma seca.

El ácido (1S,3R,4R,5R)-3-([(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi)-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico se sintetizó mediante el acoplamiento de (2E)-3-(3,4-dihidroxifenil) acrilato al ácido (1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico. Esta reacción de esterificación se lleva a cabo preferentemente por medio de un proceso de acoplamiento químico y/o biotecnológico de las dos moléculas. El acoplamiento se llevó a cabo preferiblemente en un medio no convencional mediante el uso de un catalizador enzimático de lipasa. Este es preferentemente lipasa B de *Candida antarctica*, a una concentración de 20 g/L, para catalizar el acoplamiento de 150 mM de (2E)-3-(3,4-dihidroxifenil) acrilato a 150 mM de ácido (1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico dentro de una mezcla de 2-metilbutan-2-ol/n-hexano 40/60 (v/v) a 55 °C dentro de 12 h.

El (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo se sintetizó mediante el acoplamiento químico y/o enzimático de 4-(2-hidroxietil)-1,2-bencenodiol preferentemente al ácido [(2S,3S,4S)-3-formil-5-(metoxycarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-il] acético. La reacción de esterificación y glucosilación se llevó a cabo en un medio no convencional mediante el uso de catalizadores enzimáticos, una lipasa y una β-D-glucosidasa, respectivamente.

La lipasa B de *Candida antarctica* se usa preferentemente a una concentración de 20 g/L, para catalizar el acoplamiento de 150 mM de 4-(2-hidroxietil)-1,2-bencenodiol a 75 mM de preferentemente ácido [(2S,3S,4S)-3-formil-5-(metoxycarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-il] acético glucosilado dentro de una mezcla de 2-metilbutan-2-ol/n-hexano 90/10 (v/v) a 55 °C dentro de 24 h.

La glucosidasa de *Sclerotinia sclerotiorum* se usa preferentemente, a una concentración de 30 U/ml, para catalizar la glucosilación de 50 mM de ácido [(2S,3S,4S)-3-formil-5-(metoxycarbonil)-2-metil-3,4-dihidro-2H-piran-4-il] acético con 100 mM de pNP-β-D-glucopiranosido dentro de una mezcla de DMSO/acetona 30/70 (v/v) a 40 °C dentro de 10 h.

Ejemplo 2: ejemplo de una composición de acuerdo con la invención

La composición de acuerdo con la invención del ejemplo 2 comprende, por dosis diaria, 100 mg de ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y 460 mg de (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etilideno-2(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo en forma seca.

La composición de acuerdo con la invención se presenta en forma de comprimidos blancos de 1200 mg con ranuras. Esta comprende los siguientes excipientes: hipromelosa, estearato de magnesio y povidona K 30. Los excipientes constituyen 640 mg. Por lo tanto, el ingrediente activo de acuerdo con la invención constituye el 53,3 % del peso total del comprimido y los excipientes el 46,7 %. El comprimido se produce de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la técnica.

Ejemplo 3: ejemplo de una composición de acuerdo con la invención.

La composición de acuerdo con la invención comprende, por dosis diaria, 1 mg de ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y 6 mg de (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo en forma líquida. La composición de acuerdo con la invención se presenta en forma inyectable con los siguientes excipientes: alcohol bencílico, camelosa de sodio, cloruro de cetilpiridinio, agua WFI, polisorbato 80 y cloruro de sodio. La solución inyectable se produce de acuerdo con métodos conocidos por un experto en la técnica.

II. Evaluación in vivo de la efectividad de la composición

Los experimentos in vivo se llevaron a cabo en ratones para demostrar los efectos del ingrediente activo de acuerdo con la invención, en particular sobre la glucemia en ayunas y la capacidad de secreción de insulina en respuesta a un aumento crónico de la glucemia en ayunas. La composición también se comparó con la metformina, que es una de las principales moléculas farmacéuticas prescritas para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones db/db como modelo que imita las características de la diabetes tipo 2 en humanos (Roesler WJ y otros, Mol Cell Biochem 1990; 92(2):99-106). Estos ratones son resistentes a la insulina, hipertrigliceridémicos e intolerantes a la glucosa. Desarrollan prediabetes, diabetes tipo 2 y luego EHNA muy rápidamente.

La Figura 1 muestra la evolución de la insulinemia y la glucemia (glucosa) a lo largo del tiempo en este modelo (Joost HG y otros, Animal Models in Diabetes Research, Humana Press). Al igual que en los humanos, el aumento de la glucemia se acompaña inicialmente de un aumento de la insulinemia (asociada con resistencia a la insulina), que es evidencia de un páncreas que aún es capaz de secretar insulina, y luego se acompaña de una disminución, lo que conduce a un deterioro funcional del páncreas, y por lo tanto por una progresión a diabetes tipo 2, con la necesidad de terapia con insulina (Kobayashi K y otros, Metabolism: Clinical and experimental 2000; 49:22-31; Tao H y otros, Nat Med 2014; 20(11):1263-1269).

El tiempo del experimento para la prueba fue de 6 semanas con un período de preinclusión de 1 semana seguido de 6 semanas de tratamiento. Los ratones machos tenían 6 semanas al inicio del tratamiento. Se probaron el ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico solo, el (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo solo, y la mezcla de estas dos moléculas en una relación de 1/4,65 y se compararon con metformina. Estas composiciones se integraron directamente en la dieta del roedor, lo que asegura de esta manera su uso a gran escala, y posibilita limitar las inyecciones, por ejemplo inyecciones intravenosas, a un número reducido dado su modo de administración.

Después de la aleatorización de acuerdo con el peso y la glucemia en ayunas, los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- control (n = 15): CONTROL;
- metformina (n = 12, 0,2 % de la dieta): MET;
- ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico (n = 12, 0,026 % de dieta): V63X35;
- (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo (n = 11, 0,12 % de la dieta): V63X54;
- ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico + (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo (n = 11, 0,026 % y 0,12 % de la dieta respectivamente): V63000.

Los ratones se alimentaron *ad libitum* y tenían acceso ilimitado al agua. También se colocaron en jaulas individuales. La ingesta dietética se midió cada semana, excepto al final del tratamiento (semana 6), debido a las diferentes evaluaciones realizadas.

Las evaluaciones experimentales realizadas en ayunas (6 h) después de 6 semanas de tratamiento se centraron en particular en:

- medir el peso;
- medir la glucemia;
- medir la insulinemia;
- medir los triglicéridos en suero.

Los resultados de la medición de la ingesta dietética se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 2.

Tabla 1. Ingestión de alimentos después de 6 semanas de tratamiento

CONTROL	MET	V63X35	V63X54	V63000
7,7 ± 0,5	7,9 ± 0,5	7,6 ± 0,6	7,5 ± 0,5	7,7 ± 0,3
Resultados expresados en g/día; valores promedio ± SEM (error estándar de la media).				

Se observa que ninguna composición indujo un cambio en la ingesta dietética. Por lo tanto, los resultados obtenidos son independientes de la ingesta dietética. De acuerdo con el método de Reagan-Show S y otros, (FASEB J 2008; 22(3):659-61), la dosis humana equivalente de la combinación de moléculas que ingirieron los roedores fue de 19,4 mg/kg de peso corporal por día.

Los resultados de la medición de la glucemia se presentan en la Tabla 2 y en la Figura 3.

Tabla 2. Glucemia en ayunas después de 6 semanas de tratamiento

CONTROL	MET	V63X35	V63X54	V63000
481 ± 31	454 ± 34	454 ± 34	432 ± 27	355 ± 31
Resultados expresados en mg/dl; valores promedio ± SEM.				

Los resultados muestran que, después de 6 semanas de tratamiento, no se observó ningún efecto con el ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico solo (grupo V63X35) y (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etilideno-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo solo (grupo V63X54). Solo la combinación de las dos moléculas (V63000) produjo una disminución de la glucemia en ayunas (-26,2 %, ANOVA $p < 0,05$, pruebas comparativas múltiples de Tukey: V63000 *versus* CONTROL, $p < 0,05$). La metformina no tuvo ningún efecto sobre este parámetro (CONTROL, 481 mg/dl *versus* MET, 454 mg/dl, $p = 0,56$).

El efecto sinérgico sobre la glucemia en ayunas se evaluó de acuerdo con el método Colby SR descrito en "Calculation of the synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations" Weeds, 1967, 15:20-22. Un factor > 1 indica la existencia de un efecto sinérgico. Un factor < 1 indica la existencia de un antagonista.

Los cálculos realizados fueron:

$$\text{Tasa de efectividad esperada} = \text{V63X35} + \text{V63X54} - (\text{V63X35} * \text{V63X54}/100)$$

$$\text{Factor de sinergia (FS)} = (1 * \text{tasa de efectividad observada (\%, V63000)})/\text{tasa de efectividad esperada (\%)}$$

V63X35 representa el cambio porcentual en la glucemia para el grupo tratado con V63X35 en comparación con el grupo CONTROL.

V63X54 representa el cambio porcentual en la glucemia para el grupo tratado con V63X54 en comparación con el grupo CONTROL.

La tasa de efectividad observada representa el % de cambio en la glucemia en ayunas del grupo V63000 en comparación con el grupo CONTROL.

El resultado, que se muestra en la Figura 4, muestra un efecto sinérgico de la combinación con un FS = 3,58.

En conclusión, solo la combinación V63000 tuvo un efecto sobre la glucemia en ayunas. Este es un efecto sinérgico, ya que V63X35 y V63X54 no tienen ningún efecto sobre este parámetro. Además, el efecto de la composición de acuerdo con la invención es mayor que el de la metformina, a pesar de una dosis menor (MET, 0,2 % *versus* V63000 0,14 % de la dieta). La falta de efecto de la metformina en este modelo ya se ha reportado, como lo demuestran los trabajos de Ohno T y otros, (metformina 300 mg/kg/día, PLoSONE 2015; 10(4):e0124081). De hecho, la metformina

parece ser menos efectiva, o incluso inefectiva, en animales que tienen una secreción inadecuada de insulina (GLUCOPHAGE®, metformina, monografía del producto 2009, Sanofi-Aventis, Canadá). En otras palabras, la metformina llega a ser inefectiva durante una etapa avanzada de la diabetes tipo 2, que se caracteriza, entre otras cosas, por un deterioro de la función de secreción de insulina del páncreas.

Los resultados de la insulinemia en ayunas se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 5, que muestran el valor promedio de la insulinemia en ayunas después de 6 semanas de tratamiento en los diferentes grupos.

Tabla 3. Valores promedio de insulinemia después 6 semanas de tratamiento

CONTROL	MET	V63X35	V63X54	V63000
23.03	21.89	22.39	25.44	49.97
Resultados expresados en ng/ml.				

Se observa que todos los valores promedio son idénticos, con excepción del valor promedio del grupo V63000, que es 216 % mayor que el del grupo CONTROL (CONTROL, 23,03 ng/ml *versus* ACHOLE, 49,97 ng/ml). Estos resultados también demuestran un efecto sinérgico de la combinación de moléculas, sin que se observe diferencia entre los valores promedio de los grupos CONTROL, V63X35 y V63X54.

Mantener una secreción adecuada de insulina en respuesta a un aumento crónico de la glucemia es un gran desafío médico para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones. El aumento del valor promedio en el grupo V63000 demuestra un mejor nivel de insulina en respuesta al aumento de la glucemia. Con referencia a la Figura 1, el ingrediente activo de acuerdo con la invención desplaza la curva evolutiva de la insulinemia hacia la derecha, esto refleja una efectividad real para el tratamiento o prevención de la diabetes tipo 2, en particular durante una etapa avanzada. Estos resultados hacen posible considerar la reducción de la terapia con insulina en pacientes con diabetes tipo 2 o incluso no usar dicha terapia.

Finalmente, los resultados obtenidos sobre los triglicéridos en sangre se presentan en la Tabla 4 y en la Figura 6.

Tabla 4. Triglicéridos séricos después de 6 semanas de tratamiento

CONTROL	MET	V63000
205,4 ± 17,8	132,6 ± 7,4	122,8 ± 14,0
Resultados expresados en mg/dl; valores promedio ± SEM.		

Estos resultados demuestran que la metformina y el ingrediente activo de acuerdo con la invención disminuyen la tasa de triglicéridos en sangre en un 35,6 % y un 40,4 %, respectivamente.

El efecto de la metformina sobre los triglicéridos circulantes se describe convencionalmente en las diversas instrucciones de uso de los fármacos que incorporan esta molécula. El ingrediente activo de acuerdo con la invención también tiene un efecto favorable sobre el metabolismo de los lípidos, lo que proporciona así un efecto global sobre el riesgo cardiovascular.

REIVINDICACIONES

1. Ingrediente activo farmacéutico que consiste exclusivamente en la combinación de:
 - 5 - ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico, y
 - (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo para el uso como producto farmacéutico o veterinario.
- 10 2. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad seleccionada de diabetes tipo 2, enfermedades de hígado graso no alcohólico, patologías cardiovasculares, dislipidemia, obesidad y síndrome metabólico.
- 15 3. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque las patologías cardiovasculares se seleccionan de enfermedades coronarias, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades arteriales periféricas y trombosis venosa profunda.
4. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la enfermedad del hígado graso no alcohólico es la esteatosis hepática no alcohólica.
- 20 5. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la relación en peso del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico a (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo es entre 1:40 y 1:1.
- 25 6. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las moléculas del ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoil]oxi]-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico y de (2S,3E,4S)-4-{2-[2-(3,4-dihidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil}-3-etiliden-2-(β-D-glucopiranosiloxi)-3,4-dihidro-2H-piran-5-carboxilato de metilo son moléculas naturales o moléculas sintéticas que se producen por un proceso químico y/o biotecnológico.
- 30 7. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque está en forma líquida o sólida.
8. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores por vía oral, enteral, parenteral o subcutánea.
- 35 9. Ingrediente activo farmacéutico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una composición farmacéutica.
- 40 10. Composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque tiene forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, polvo, sobres, ampollas, solución para goteros o solución inyectable.
- 45 11. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque comprende entre 0,5 y 100 % en peso de materia seca del ingrediente activo farmacéutico.

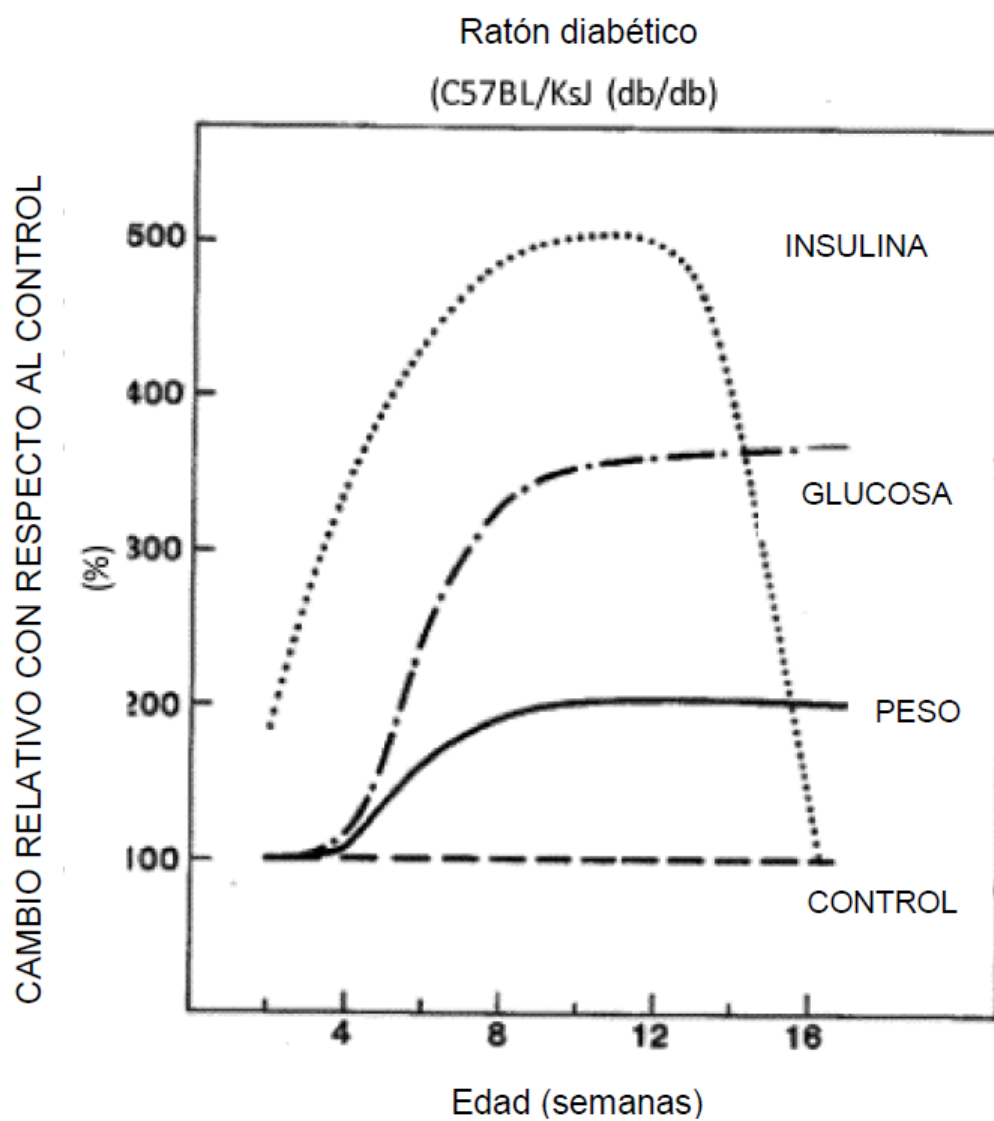


Figura 1

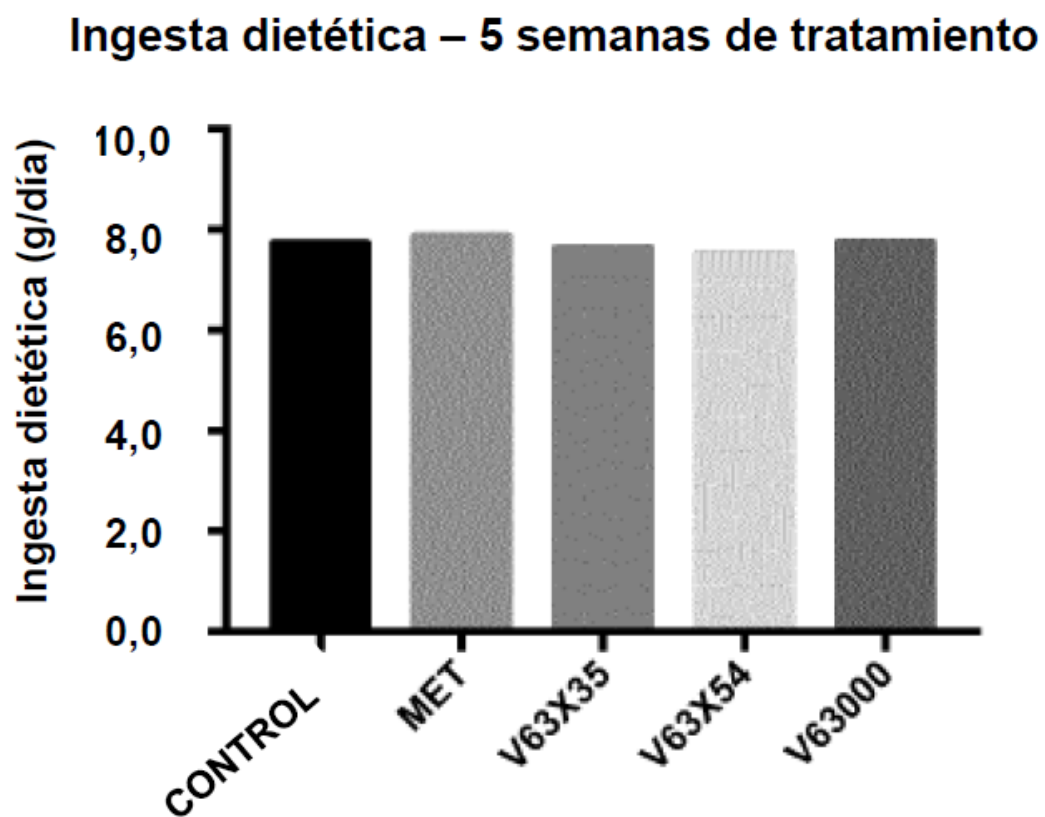
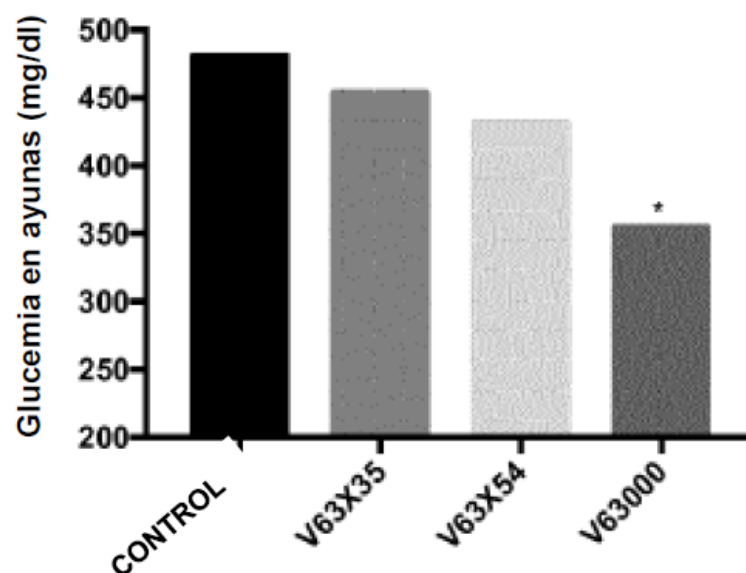


Figura 2

Glucemia en ayunas después de 6 semanas de tratamiento



ANOVA

$p < 0,05$

Pruebas comparativas múltiples de Tukey

V63000 *versus* CONTROL, * $p < 0,05$

Figura 3

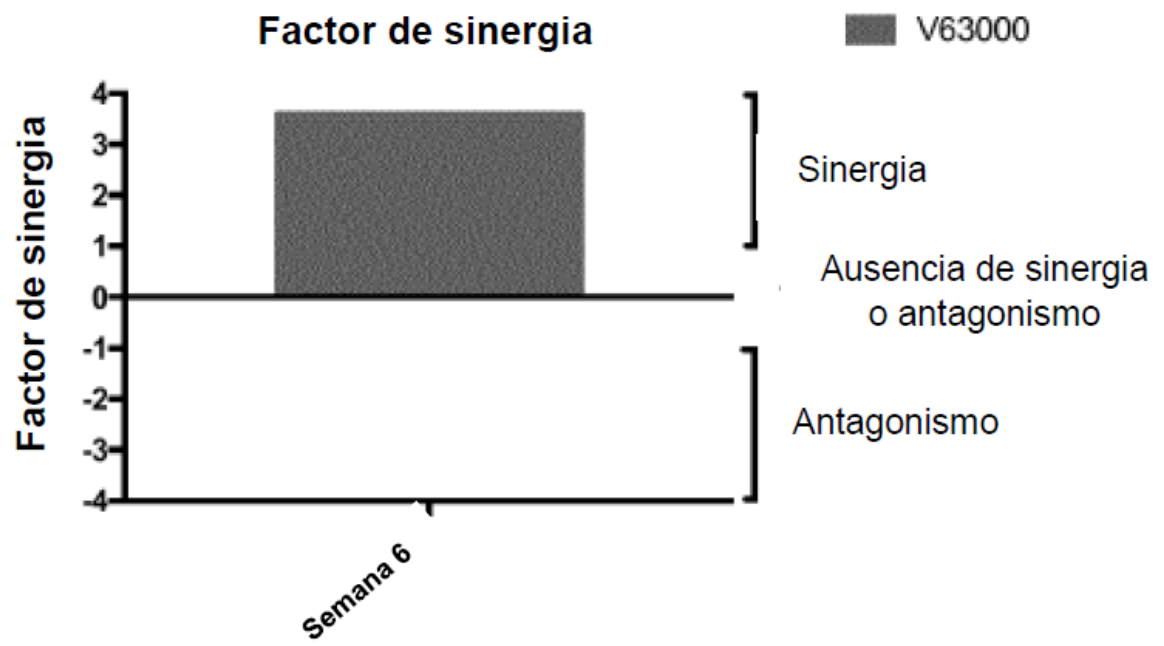


Figura 4

**Valores promedio de insulinemia en ayunas después de 6 semanas de tratamiento
(Ratón diabético db/db edad 12 semanas)**

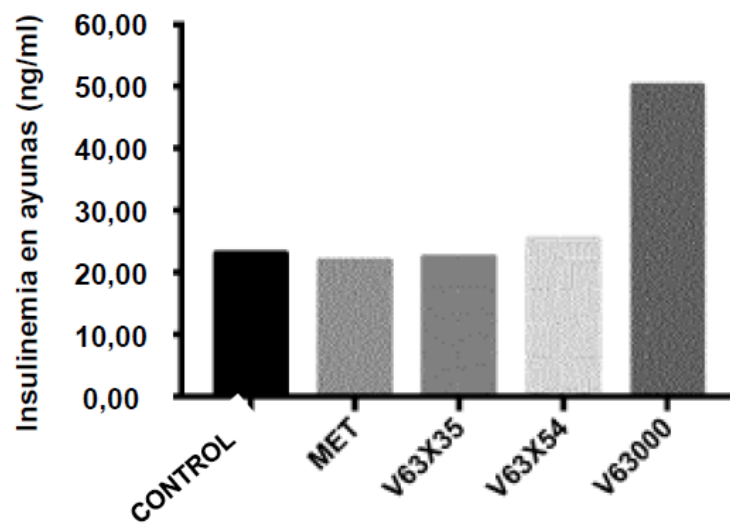
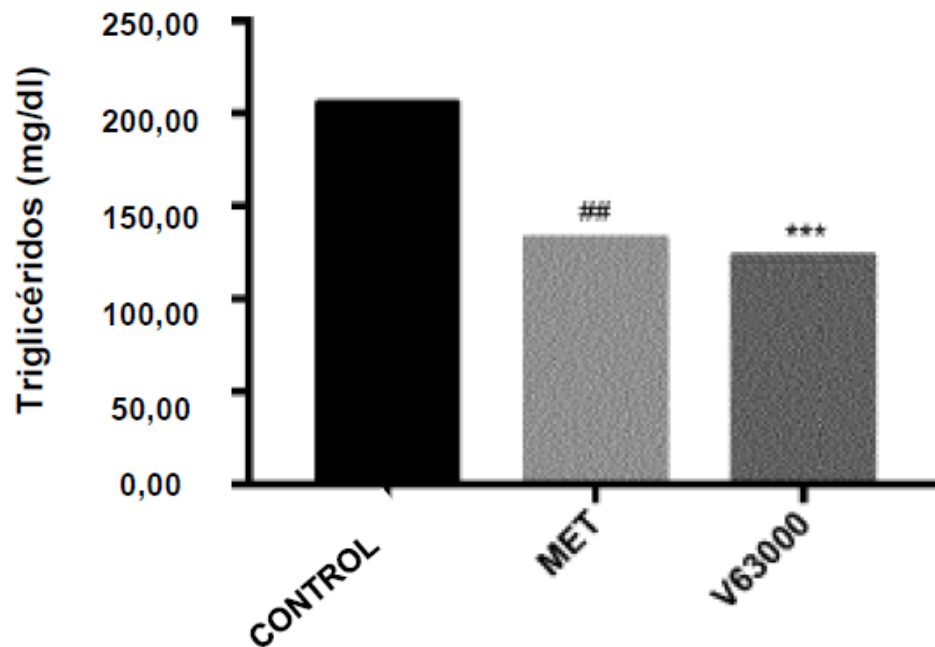


Figura 5

Triglicéridos en suero – 6 semanas de tratamiento



ANOVA

$p < 0,001$

Pruebas comparativas múltiples de Tukey

MET *versus* CONTROL, ## $p < 0,01$

V63000 *versus* CONTROL, *** $p < 0,001$

Figura 6