



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 277 567**

② Número de solicitud: 200503262

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/352 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **30.12.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2007**

Fecha de la concesión: **04.04.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2008**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

⑲ Titular/es: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Vizcaya, ES
Universidad Pablo de Olavide**

⑳ Inventor/es: **Matute Almu, Carlos;
Sánchez Gómez, María Victoria;
Campos Esparza, Rosario;
Alberdi Alfonso, Elena;
Gottlieb, Miroslav;
Ibarretxe Bilbao, Gaskón;
Delgado García, José María;
Gruart i Masso, Agnès y
Leal Campanario, Rocío**

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Compuestos con propiedades neuroprotectoras.**

㉓ Resumen:

Compuestos con propiedades neuroprotectoras.
Uso de compuestos antioxidantes, como la morina y la manguiferina, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos en la elaboración de una preparación farmacéutica o una composición alimentaria para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa así como para el tratamiento de síntomas asociados al envejecimiento.

ES 2 277 567 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Compuestos con propiedades neuroprotectoras.

5 **Sector de la técnica**

La invención se relaciona con el uso de compuestos antioxidantes en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y síntomas asociados al envejecimiento, y con una composición alimentaria que comprende dichos antioxidantes.

10 **Estado de la técnica**

15 Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un problema sociosanitario de gran envergadura que en las sociedades occidentales se ve agravado por el progresivo envejecimiento de la población. Estas enfermedades cursan con pérdida de células del sistema nervioso central provocada por causas diversas de naturaleza genética o ambiental todavía mal conocidas, y que producen deterioro físico y cognitivo agravado con el paso del tiempo.

20 Los principales procesos patofisiológicos generados en derrames cerebrales conllevan la falta de energía, pérdida de homeostasis celular, acidosis, aumento del calcio intracelular, excitotoxicidad y toxicidad mediada por radicales libres. La isquemia cerebral transitoria, un modelo animal de paro cardíaco y derrame cerebral, induce alteraciones moleculares que causan hiperexcitabilidad neuronal y muerte celular en regiones vulnerables del cerebro tales como el área del hipocampo CA 1 (Choi, *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 667, 1996). La isquemia da como resultado la pérdida de ATP lo que merma la función de los transportadores de glutamato que normalmente eliminan el glutamato liberado de la hendidura sináptica. El aumento resultante de glutamato en el espacio extracelular provoca la activación excesiva de los receptores de glutamato y la subida patológica en los niveles de calcio intracelular que culmina con la muerte de las neuronas y de las células gliales (Choi, *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 667, 1996; Matute *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 447, 239, 2002). Sin embargo, los receptores antagonistas de glutamato no han resultado eficientes en estados clínicos de derrame cerebral (Ikonomidou and Turski, *Lancet Neurol.* 1, 383, 2002).

30 Al igual que las neuronas, los oligodendrocitos son sensibles a estímulos excitotóxicos mediados por la sobreactivación de sus receptores de glutamato ionotrópicos AMPA/kainato (Matute *et al. Trends Neurosc.* 24, 224, 2001). La sobreactivación de los receptores de glutamato en neuronas y oligodendrocitos causa aumentos bruscos en la concentración de los iones Ca^{2+} citoplásmicos en ambos tipos de células. Una importante diana intracelular para la toxicidad mediada por los iones Ca^{2+} es la mitocondria, que puede aceptar grandes cargas de este catión en una manera dependiente del potencial eléctrico, que ocurre como consecuencia de estímulos excitotóxicos (Carriedo *et al.*, *J. Neurosci* 20, 240, 2000; Sánchez-Gómez *et al.*, *J. Neurosci.* 23, 9519, 2003).

40 Dado que, tanto los estímulos de excitotoxicidad como la isquemia/reperfusión generan estrés oxidativo, es concebible que la administración de antioxidantes puede limitar el daño oxidativo y reducir la progresión de la enfermedad. De hecho, numerosos antioxidantes administrados exógenamente han resultado ser neuroprotectores en modelos experimentales de isquemia cerebral; sin embargo, la mayoría de ellos no mostraron efectos beneficiosos en ensayos clínicos (Gilgun-Sherki *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 4, 71, 2002). El problema para convertir los resultados experimentales con antioxidantes en tratamientos efectivos para derrames cerebrales se debe, al menos en parte, al acceso inadecuado de los fármacos seleccionados en las regiones recuperables de la zona de isquemia, y a una caracterización insuficiente de la alteración de las funciones cognitivas en modelos animales enfermos.

45 Adicionalmente, se ha ensayado el potencial terapéutico de nuevos antioxidantes, especialmente aquéllos de origen natural. En este sentido, los flavonoides y otros antioxidantes polifenólicos presentes como moléculas bioactivas en vegetales, frutas y vino tinto han resultado ser potencialmente beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas asociadas con el estrés oxidativo (Mandel *et al.*, *J. Neurochem.*, 88, 1555, 2004).

50 Asimismo, el documento JP2005104850 describe el empleo de algunos polifenoles específicos para la prevención de la enfermedad de Alzheimer, mediante un mecanismo de control y supresión de la deposición de fibras β -amiloides en tejido cerebral. Sin embargo, no se especifica su acción frente a enfermedades neurodegenerativas causadas por muerte celular u oligodendrial.

55 Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de encontrar otros compuestos que presenten propiedades neuroprotectoras y terapéuticas adecuadas para el tratamiento de enfermedades mediadas por muerte celular y que sean capaces de acceder adecuadamente a las regiones del cerebro afectadas por dicho mecanismo.

60 **Compendio de la invención**

Los inventores han encontrado de forma sorprendente que los compuestos de fórmula (I), en concreto la morina o la manguiferina, reducen el estrés oxidativo y que esta propiedad reduce la muerte neuronal y oligodendrial de manera eficaz en modelos celulares y animales de enfermedades neurodegenerativas. Los resultados se pueden extrapolar con fines terapéuticos o profilácticos en la población de riesgo. Dado que son compuestos con un perfil de toxicidad muy bajo, su uso como fármaco o en una composición alimentaria es muy adecuado y no requiere de ensayos clínicos complejos como ocurre con los fármacos convencionales.

Esta nueva aplicación de los compuestos de fórmula (I) se basa en las investigaciones llevadas a cabo por los inventores sobre modelos celulares en cultivos de neuronas y de oligodendrocitos en donde se ha puesto de manifiesto la reducción, de forma eficaz, del estrés oxidativo causado por estímulos letales, protegiendo a estas células de la muerte. Asimismo, en animales experimentales sometidos a isquemia cerebral transitoria, se ha observado que la administración de antioxidantes como morina y manguiferina a la media hora de la isquemia reduce el daño cerebral postisquémico y atenúa el deterioro cognitivo que produce dicha circunstancia patológica. Por lo tanto, estos antioxidantes tienen una gran eficacia en la reducción del daño tisular y los síntomas neurológicos causados por las lesiones del sistema nervioso central. Además, la capacidad neuroprotectora de los compuestos de fórmula (I), y muy especialmente de la morina y la manguiferina, es superior a la de otros antioxidantes ensayados en el estado de la técnica. Asimismo, dado que muchos de los síntomas relacionados con el envejecimiento, están mediados por la muerte celular y oligodendrial, estos compuestos pueden ser de gran utilidad para tratar los mencionados síntomas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto de fórmula (I) en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

En un aspecto adicional, la invención se dirige al empleo de un compuesto de fórmula (I) en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de los síntomas asociados al envejecimiento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en un individuo que padece dicha enfermedad neurodegenerativa, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) a dicho individuo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de los síntomas asociados al envejecimiento, en un individuo que padece dichos síntomas, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) a dicho individuo.

El empleo de un compuesto de fórmula (I) en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas supone una forma eficaz de evitar los problemas planteados por las estrategias actuales, tales como la imposibilidad de obtener resultados eficaces en ensayos clínicos así como la toxicidad presentada por alguno de los compuestos empleados en el tratamiento de dichas enfermedades neurodegenerativas.

En un aspecto adicional la invención se relaciona con una composición alimentaria que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo alimentario.

35 Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra el porcentaje de muerte de neuronas producida por estímulos excitotóxicos (glutamato o NMDA) en cultivos celulares y el efecto que provoca la adición de morina y manguiferina. Por su parte, la Figura 1B muestra el porcentaje de muerte de oligodendrocitos normalizada \pm S.E.M. producida por estímulos excitotóxicos (glutamato o NMDA) en cultivos celulares y el efecto que provoca la adición de morina y manguiferina a diferentes concentraciones.

La Figura 2 muestra la producción de superóxido en la región CA1 del hipocampo tras la isquemia. En concreto, las Figuras 2 A-D corresponden con una vista panorámica que muestra la fluorescencia emitida por hidroetidina oxidada en la capa piramidal de la región CA1 tras la isquemia; A: para ratas control; B: para ratas tratadas con placebo; C: para ratas tratadas con manguiferina; D: para ratas tratadas con morina.

Por su parte, las Figuras 2 a-d corresponden con una vista detallada de los niveles de fluorescencia detectados dentro del citoplasma de las células en la capa piramidal de la región CA1; A: para ratas control; B: para ratas tratadas con placebo; C: para ratas tratadas con manguiferina; D: para ratas tratadas con morina.

La Figura 2E muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (% respecto a ratas control) tras 1 y 2 días postisquemia (*p <0,001 comparado con ratas control, n=4; **p <0,001 comparado con ratas tratadas con placebo, n=3).

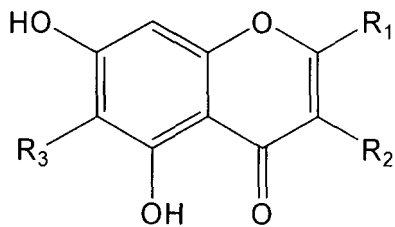
La Figura 3A representa la cantidad de células NeuN⁺ en animales control y en animales sometidos a isquemia tras 7 y 70 días de la operación tratados con placebo, con manguiferina y con morina. La Figura 3B muestra el porcentaje de células NeuN⁺ tras 7 y 70 días de la isquemia en animales tratados con placebo, con manguiferina y con morina.

La Figura 4A muestra la respuesta electromiográfica obtenida para: (C) ratas control; (ISCH): ratas con isquemia; (I+MNG): ratas con isquemia tratadas con manguiferina; (I+MOR): ratas con isquemia tratadas con morina. La Figura 4B muestra el porcentaje promedio de respuestas condicionadas sobre 10 sesiones condicionadas para los grupos condicionados (líneas continuas) y pseudocondicionados (líneas discontinuas): (círculos negros): ratas control; (círculos blancos): ratas con isquemia; (cuadrados): ratas con isquemia tratadas con manguiferina; (triángulos): ratas con isquemia tratadas con morina.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto de fórmula (I):

5



10

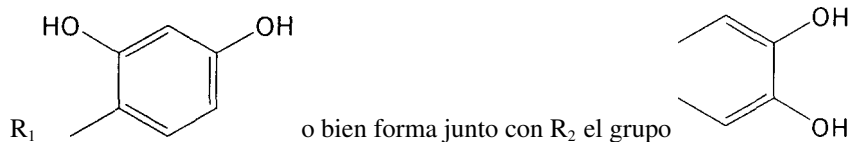
15

(I)

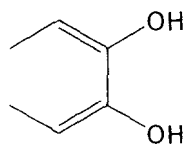
20

donde

25



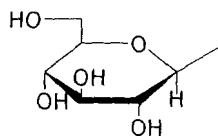
30



35

R₂ es bien OH o bien forma junto con R₁ el grupo

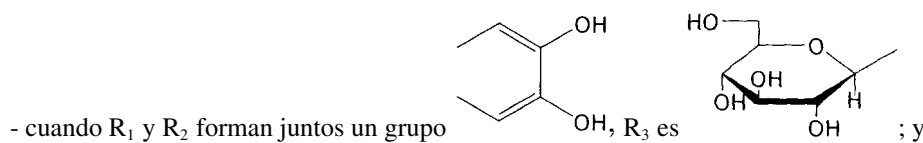
40



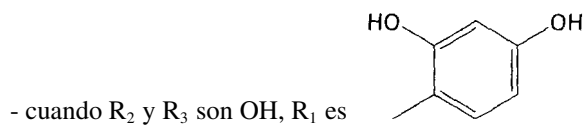
R₃ es bien OH o bien el grupo

de tal forma que:

45



50



55

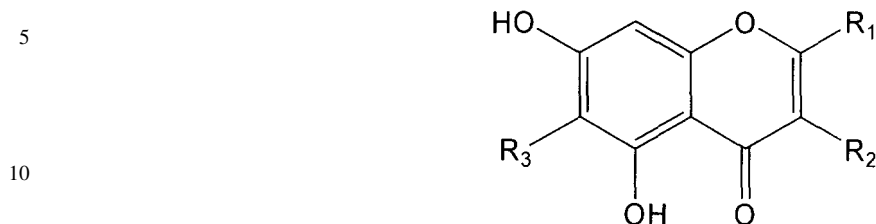
- cuando R₂ y R₃ son OH, R₁ es

60 sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

65

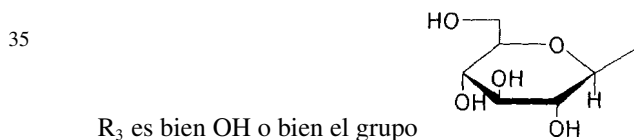
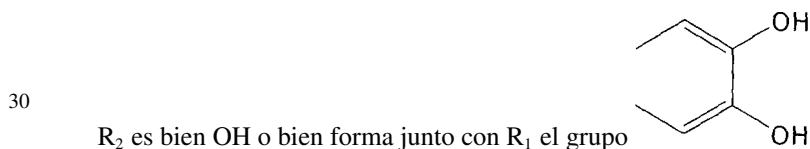
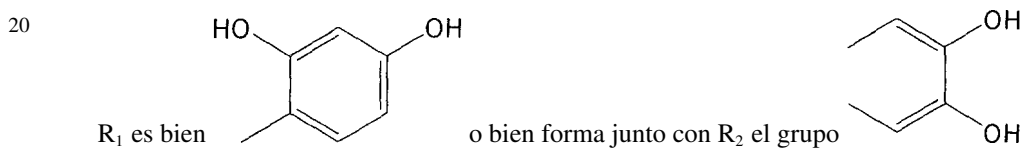
ES 2 277 567 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto de fórmula (I):

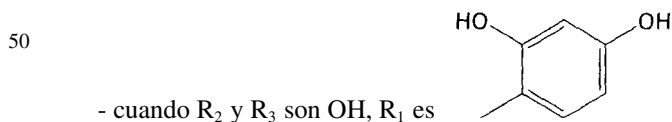
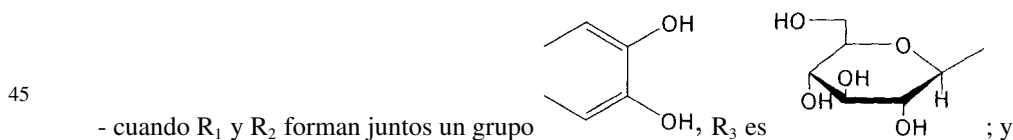


(I)

donde



de tal forma que:



55 sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de síntomas asociados al envejecimiento.

El compuesto de fórmula (I) con el resto cresol como R₁ se denomina morina (compuesto de fórmula Ia) y el compuesto de fórmula (I) con el resto glucósido como R₃ se denomina manguiferina (compuesto de fórmula Ib).

60 Tal como aquí se utiliza, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal del compuesto de fórmula (I) que puede ser utilizada en la elaboración de un medicamento. La naturaleza de la sal no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Entre las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) se encuentran, por ejemplo, las sales alcalinas, las cuales pueden formarse a partir de la reacción de un compuesto de fórmula (I) con una cantidad estequiométrica de la base apropiada en agua, en un disolvente orgánico o

65 en una mezcla de ambos. Entre las sales alcalinas se incluyen las sales inorgánicas tales como por ejemplo las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de un compuesto de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado del compuesto de fórmula (I), por ejemplo un éster, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación de dicho compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione un compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

El compuesto de fórmula (I) se puede obtener en forma de base libre o de sal. En ambos casos se obtiene preferentemente en forma cristalina, tanto como compuestos libres como solvatos (por ejemplo, hidratos) quedando ambas formas incluidas dentro del ámbito de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica. En un caso particular de la presente invención el compuesto de fórmula (I) denominado morina se encuentra coordinado con dos moléculas de agua.

De entre los compuestos de fórmula (I), la morina (Ia) se encuentra presente en la madera de la especie denominada *Chlorophora tinctoria*, *Moraceae*. Alternativamente, dicho compuesto puede ser obtenido por métodos conocidos, por ejemplo, a partir de la reacción de condensación de floracetofenona dimetil éter con 2,4-dimetoxibenzaldehído mediante el procedimiento descrito por von Kostanecki *et al.*, Ver. 39, 625, 4014 (1906).

Por su parte, la manguiferina (Ib) es el C-glucósido de la tetrahidroxi-1,3,6,7-xantona. Aunque se puede extraer de numerosas especies vegetales, está más ampliamente distribuida en la también denominada planta manguiferina y en especial en los angiospermas.

En una realización particular, para su administración en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas así como de síntomas asociados al envejecimiento, el compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, se formularán en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter crónico de la enfermedad a tratar.

En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “*Tratado de Farmacia Galénica*”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Para su aplicación en terapia el compuesto de fórmula (I) se encontrará preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que el compuesto de fórmula (I) tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y no incluyendo material considerado tóxico a los niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para un compuesto de fórmula (I) son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95%.

En general, la cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (I) a administrar dependerá, entre otros factores, del individuo que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar un compuesto de fórmula (I), una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 5 y 20 mg/kg masa corporal/día, preferentemente 10 mg/kg masa corporal/día.

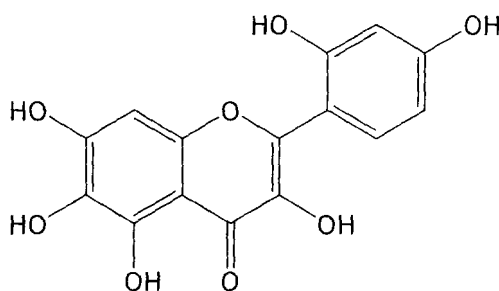
El compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, con inhibidores de la trombina, para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 277 567 B1

Asimismo, el compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos, y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de síntomas asociados al envejecimiento, para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular, la invención va dirigida al empleo de un compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la administración de manguiferina y morina, compuestos de fórmula (I), a ratones en los cuales se ha inducido isquemia cerebral transitoria, provoca un aumento significativo de las células positivas NeuN⁺ en la capa piramidal del hipocampo CA1 tras 7 y 70 días post-isquemia (Ejemplo 3). A los efectos de la presente invención se entiende por enfermedad neurodegenerativa cualquier enfermedad ocasionada como consecuencia de la muerte neuronal y/o oligodendrial en regiones vulnerables del cerebro y mediada por estímulos excitotóxicos, tales como isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria o demencia por infartos múltiples. Asimismo, estarían comprendidas en la definición de enfermedad neurodegenerativa aquellas enfermedades ocasionadas por la deposición de fibras β -amiloides en el tejido cerebral, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer.

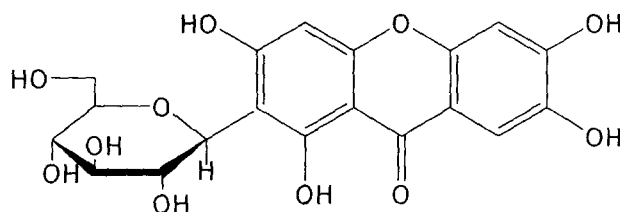
En una realización particular, se emplea un compuesto de fórmula (Ia) denominado morina:



(Ia)

sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos en la elaboración de una composición para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa provocada como consecuencia de la muerte neuronal y/o oligodendrial, seleccionada entre isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria y demencia por infartos múltiples.

En otra realización particular, se emplea un compuesto de fórmula (Ib) denominado manguiferina:



(Ib)

sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos en la elaboración de una composición para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa provocada como consecuencia de la muerte neuronal y/o oligodendrial así como para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa provocada por la deposición de fibras β -amiloides, seleccionada entre isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria, demencia por infartos múltiples y enfermedad de Alzheimer.

ES 2 277 567 B1

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en un individuo que padece dicha enfermedad neurodegenerativa, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, a dicho individuo. Las características de la administración, composición farmacéutica y cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (I) han sido definidas previamente.

10 En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa, que es prevenida y/o tratada según el método de la presente invención, está provocada como consecuencia de la muerte neuronal y oligodendrial así como por la deposición de fibras β -amiloides en tejido cerebral. En una realización concreta, dicha enfermedad neurodegenerativa es isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria, demencia por infartos múltiples o enfermedad de Alzheimer, preferentemente es la isquemia cerebral.

15 En otra realización particular dicha enfermedad neurodegenerativa, que es prevenida y/o tratada según el método de la presente invención, está provocada como consecuencia de la muerte neuronal y oligodendrial. En una realización concreta, dicha enfermedad neurodegenerativa es isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria o demencia por infartos múltiples, preferentemente es la isquemia cerebral.

20 En otra realización particular, la invención va dirigida al empleo de un compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de los síntomas asociados al envejecimiento. Algunos ejemplos de estos síntomas serían la pérdida de memoria, dificultad para el aprendizaje, disminución de las funciones cognitivas, entre otros.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de los síntomas asociados al envejecimiento, en un individuo que padece dichos síntomas, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, a dicho individuo. Las características de la administración, composición farmacéutica y cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (I) han sido definidas previamente.

35 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "individuo" se refiere a cualquier mamífero, e incluye, aunque no se limita a, animales domésticos, roedores, primates y humanos. Preferentemente, dicho individuo es un ser humano, macho o hembra, de cualquier edad o raza.

40 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición alimentaria que comprende un compuesto de fórmula (I) como el descrito en la presente invención y un vehículo alimentario. A los efectos de la presente invención, se entiende por vehículo alimentario cualquier producto susceptible de ser usado en alimentación humana o animal. La elección del vehículo alimentario adecuado para cada caso podrá realizarse por un experto en la materia a partir de los vehículos alimentarios convencionales existentes en el estado de la técnica.

45 Dicha composición alimentaria puede estar en forma de polvo soluble, un concentrado líquido, un snack o ser una formulación lista para usar adecuada para el consumo oral o la administración enteral. Ejemplos de estas composiciones pueden ser, entre otras, un producto lácteo o derivado del mismo tal como un batido, leche, incluyendo leche aromatizada y fermentada, un yogurt, etc.; un zumo; un producto harinoso o derivado del mismo tal como una tarta, un pan, una galleta; un aceite, una golosina, tal como un chicle, un caramelo, etc.

50 En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición alimentaria para la prevención y/o mejora de una enfermedad neurodegenerativa. Asimismo, la invención también se dirige al uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición alimentaria para la prevención y/o mejora de síntomas asociados al envejecimiento.

55 La cantidad del compuesto de fórmula (I) incluido en la composición alimentaria que puede ser ingerido por un paciente dependerá de numerosos factores tales como el estado del paciente, su peso corporal, edad, entre otros. Sin embargo, la cantidad adecuada deberá ser prescrita por un especialista y se ajustará en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar un compuesto de fórmula (I) en varias dosis, por ejemplo de 2 a 5 veces al día, con el fin de administrar la cantidad diaria recomendada o puede tomarse en una sola dosis.

60 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 *Valoración del efecto de los compuestos manguiferina y morina en la muerte de cultivos celulares de neuronas y oligodendrocitos causada por activación submaximal de receptores glutamato*

Los cultivos de neuronas se obtuvieron a partir de corteza cerebral de embriones de rata Sprague Dawley de 18 días de gestación (Larm *et al.*, 1996, *Eur J Pharmacol* **314**: 249-54; Cheung *et al.*, 1998, *Neuropharmacol* **37**: 1419-29). Las células se nutrieron con medio Neurobasal suplementado con el suplemento B27 (Invitrogen). Estos cultivos no contenían astrocitos ni microglía y se emplearon tras 8 y 10 días *in vitro*.

Se aplicaron los agonistas glutamato o NMDA (N-metil-D-aspartato), ambos a una concentración 50 μ M, durante 10 minutos. Los antioxidantes, morina y manguiferina, se adicionaron durante la exposición del agonista a una concentración 100 nM y se mantuvieron en el medio durante 3 horas hasta que se midió la viabilidad celular mediante diacetato de fluoresceína. La Figura 1A muestra cómo la adición de manguiferina o morina atenúa significativamente la muerte neuronal excitotóxica (* $p < 0,001$, comparada con las neuronas tratadas sólo con agonista). Los valores se muestran como la media \pm S.E.M. de los cuadruplicados a partir de 3-4 experimentos diferentes.

Por su parte, los cultivos de oligodendrocitos se incubaron con agonistas AMPA [ácido (RS)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico hidrobromuro], a una concentración 10 μ M durante 5 minutos. Los polifenoles, manguiferina y morina, se adicionaron 24 horas antes de la exposición del agonista y hasta el final de los experimentos a concentraciones comprendidas entre 10 y 100000 nM, y se midió la viabilidad celular mediante fluorimetría calceína 24 horas después. Los valores mostrados en la Figura 1B representan el porcentaje de muerte celular normalizada \pm S.E.M. de los triplicados en función del logaritmo de la concentración a partir de tres experimentos diferentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

En su conjunto estos resultados indican que la manguiferina y la morina protegen de la muerte neuronal y oligodendroglial inducida por estímulos excitotóxicos que son relevantes a los que ocurren en las enfermedades neurodegenerativas.

Ejemplo 2

- 35 *Efecto de la manguiferina y morina en la reducción de la producción de superóxido en la región hipocampal CA1 tras isquemia*

Animales

Se seleccionaron de forma aleatoria cuatro grupos experimentales de ratas Sprague-Dawley (cada grupo contenía 20 animales): control (C), isquémicos (ISCH), animales isquémicos tratados con manguiferina (I+MNG), y animales isquémicos tratados con morina (I+MOR). La isquemia cerebral transitoria se indujo mediante oclusión de las arterias carótida común y vertebral durante 10 minutos. Los criterios para determinar la isquemia cerebral fueron la pérdida bilateral del reflejo de estiramiento, la rigidez de extremidades y la midriasis. La temperatura rectal y corporal se mantuvo a 37°C durante la cirugía y la isquemia. Los animales que no sufrieron pérdida total de sus reflejos o que sufrieron un ataque tras la oclusión de la arteria carótida fueron excluidos del estudio. El grupo de animales control se trató de manera similar al grupo con isquemia, pero ninguna de sus arterias carótidas comunes fue ocluida.

Tratamiento

50 La manguiferina y la morina se administraron intraperitonealmente a una concentración de 10 mg/kg de masa corporal, 30 minutos después del estímulo isquémico y a continuación a una concentración de 5 mg/kg cada 12 horas durante 7 días.

Medición del estrés oxidativo in vivo

55 Se siguió el método descrito por Chan *et al.*, 1998 (*J Neurosci* **18**: 8292-99). Tras 24 y 48 postisquemia, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral (350 mg/kg) y se les administró hidroetidina (8 mg/kg) a través de la vena yugular, sacrificándose 2 h después. La fluorescencia se examinó en cortes de criostato (10 μ m) y se analizó con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot). Las imágenes se tomaron con una cámara digital (Axio Vision, Zeiss) y se analizaron con el programa Image Pro Plus.

Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D ilustran una visión panorámica de los niveles de fluorescencia emitidos por la hidroetidina oxidada en las neuronas de la capa piramidal de la región CA1 tras 1 día de isquemia global transitoria, y su reducción por manguiferina y morina. Las Figuras 2a, 2b, 2c y 2d muestran en detalle los niveles observados en el citoplasma de esas neuronas. En la Figura 2E se cuantifica la fluorescencia (* $p < 0,001$ comparado con el control, $n=4$; ** $p < 0,001$ comparado con ratas tratadas con placebo, $n=3$), lo que corresponde con la barra 50 y 10 μ m en las columnas izquierda y derecha, respectivamente.

Ejemplo 3

Valoración del efecto de los compuestos manguiferina y morina en el tratamiento de isquemia cerebral transitoria en ratas

5 Las ratas, tratadas tal y como se ha mencionado en el Ejemplo 2, fueron profundamente anestesiadas con hidrato de cloral y se perfundieron transcárdialmente con un fijador a los 7 y 70 días post-isquemia (n=4-5 en cada grupo). La solución fijadora consistió en 4% de paraformaldehído en 0,1 M de tampón fosfato sódico, pH 7,4. Posteriormente los cerebros una vez extraídos se postfijaron durante dos horas a 4°C en la misma solución. Se obtuvo tejido de las ratas control operadas y no operadas (n=4-5 en cada grupo). Se recogieron secciones criostáticas (10 µm) en el nivel del hipocampo dorsal en platinas (portas) gelatinizadas y se procesaron para los ensayos de inmunohistoquímica tal y como se ha descrito previamente (Gottlieb and Matute, 1997, *J Cereb Blood Flow Metab.*:290-300). Se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón NeuN (2 µg/ml; Chemicon, Temecula CA) para proteína 2 asociada a microtúbulo (MAP2; 4 µg/ml; Sigma) y CD11b (OX42; 10 µg/ml; Serotec Ltd., Oxford, England). Como control negativo, se incubaron en todos los experimentos diversas secciones con inmunoglobulinas de ratón normales no inmunes (0,5 mg/ml). Se llevó a cabo una evaluación preliminar del daño postisquémico en cada cerebro empleando como tinte histológico el azul de toluidina.

20 Se cuantificó el número de células positivas NeuN en la capa piramidal del hipocampo CA1 en ratas control y ratas operadas, y en animales sometidos a isquemia cerebral transitoria después de 7 y 70 días de la reperusión (n=4-5 animales por cada grupo experimental). Las cantidades se recogieron tanto del hemisferio izquierdo como del derecho de cada sección analizada por inmunohistoquímica, con dos secciones por cada experimento a partir de al menos tres experimentos independientes. Los niveles de inmunotinción con anticuerpos anti-MAP2 se midieron a partir de fotografías tomadas con una cámara digital (AxioVision, Zeiss) con un aumento de 4x, las cuales fueron posteriormente procesadas por un programa de análisis de imágenes (Image Pro Plus v4.5) para obtener una imagen de grises de 8 bits de toda la región CA1 con el fin de determinar el valor de la densidad específica de grises.

30 La Figura 3 muestra cómo el número de neuronas NeuN marcadas con anticuerpos en regiones CA1 postisquémicas aumenta después del tratamiento con polifenoles. Las columnas izquierda y derecha de la Figura 3A representan las células NeuN⁺ tras los 7 y 70 días de la operación. Las filas primera a cuarta muestran la aparición de tinción en animales operados (control) y en animales tratados con placebo, manguiferina o morina tras la isquemia. Señalar que el área y el número de neuronas en la capa piramidal observada en las ratas operadas (fila superior) disminuye drásticamente en animales sometidos a isquemia y consiguiente tratamiento con placebo a los tiempos postisquemia estudiados. Por el contrario, el estímulo isquémico seguido del tratamiento con manguiferina o bien con morina provoca un mayor número de neuronas en la capa piramidal. La barra de calibración es 100 µm. La Figura 3B muestra el número de células NeuN⁺ en animales tratados con placebo en comparación con las ratas operadas (100%). El número de células NeuN⁺ es mayor en animales tratados con manguiferina o con morina en comparación con los animales tratados con placebo (*p<0,05, ++p<0,01) tras 7 y 70 tras la isquemia. El número de células NeuN⁺ se refiere al 100%. Cada barra representa la media ± S.E.M. de cuentas obtenidas a partir de dos secciones del hipocampo derecho e izquierdo provenientes de 4-5 animales.

Ejemplo 4

45 *Valoración del efecto de los compuestos manguiferina y morina en un análisis cuantitativo de respuestas de párpado condicionadas*

El estudio de las respuestas palpebrales mediante condicionamiento clásico se realizó en 10 ratas Sprague-Dawley por grupo experimental. Cada animal se anestesió con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg). Los electrodos estimuladores se situaron en la rama supraorbitaria izquierda del nervio trigémino, y los de registro en el músculo orbicular ipsilateral, tal y como se ha descrito en detalle en Gruart *et al.*, 1995, *J Neurophysiol* **74**: 226-49. El condicionamiento clásico se consiguió mediante el paradigma ilustrado en la parte superior de la Figura 4.

55 Un análisis cuantitativo de las respuestas del párpado clásicamente condicionadas a partir de ratones control (C, línea punteada) y ratones con isquemia (ISCH, círculos), y a partir de ratones con isquemia tratados con manguiferina (I+MNG, cuadrados) o morina (I+MOR, triángulos), se muestran en la Figura 4. En concreto, la Figura 4A corresponde a las respuestas electromiográficas (EMG, en mV) obtenidas de animales representativos de cada uno de los grupos experimentales indicados recogidas durante la novena sesión. Para la señal de condicionamiento se aplica un tono (600 Hz, 90 dB) durante 20 ms como estímulo de condicionamiento (EC). El tono va seguido de un shock eléctrico (500 µs, 2 x umbral) aplicado al nervio supraorbital como un estímulo no condicionado (ENC). Las flechas hacia abajo indican la presencia de respuestas condicionadas (RCs). Las cabezas de flecha indican la aparición de respuestas no condicionadas en párpados. La Figura 4B muestra el porcentaje promedio (± S.E.M.) de respuestas condicionadas sobre 10 sesiones condicionadas para los cuatro grupos experimentales. Los resultados obtenidos para los grupos condicionados se indican con líneas continuas, mientras que los resultados correspondientes a los grupos pseudocondicionados se indican con líneas discontinuas.

65 Los resultados de estos experimentos indican que la manguiferina y la morina preservan la capacidad de aprendizaje tras su administración a ratas sometidas a isquemia global, y que por tanto las propiedades neuroprotectoras de ambas tienen consecuencias funcionales, preservando funciones cognitivas.

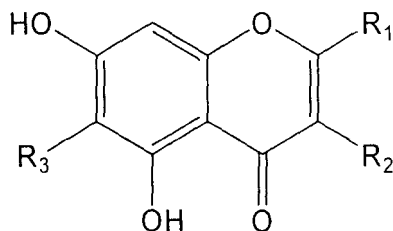
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):

5

10

15

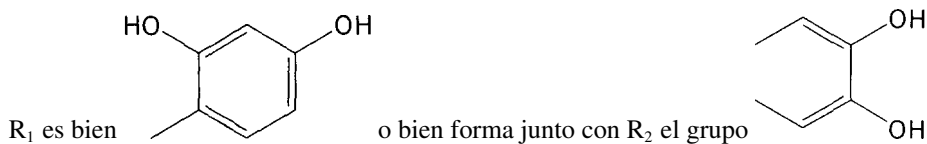


(I)

20

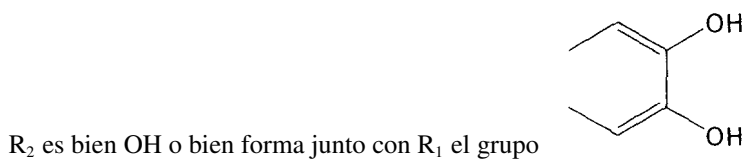
donde

25

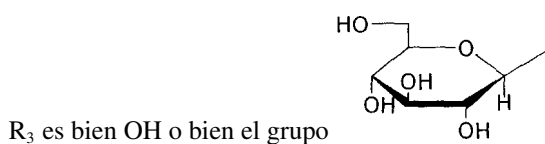


30

35



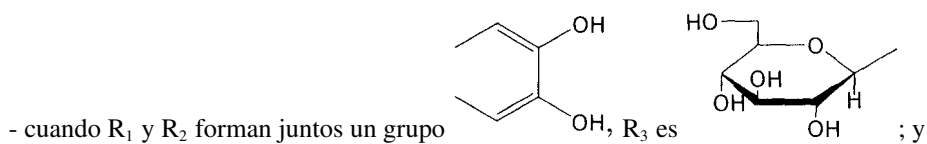
40



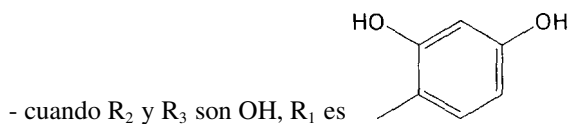
45

de tal forma que:

50



55



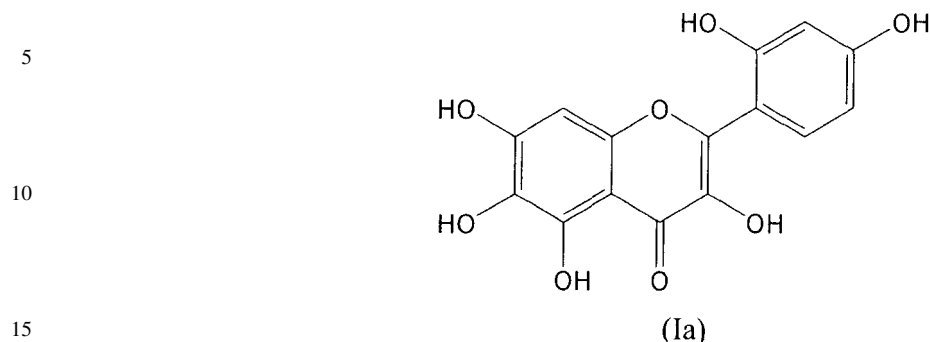
60

sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

65

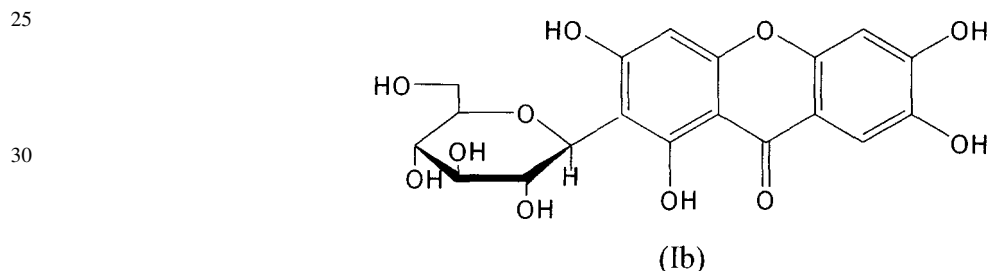
ES 2 277 567 B1

2. Uso según la reivindicación 1 de un compuesto de fórmula (Ia):



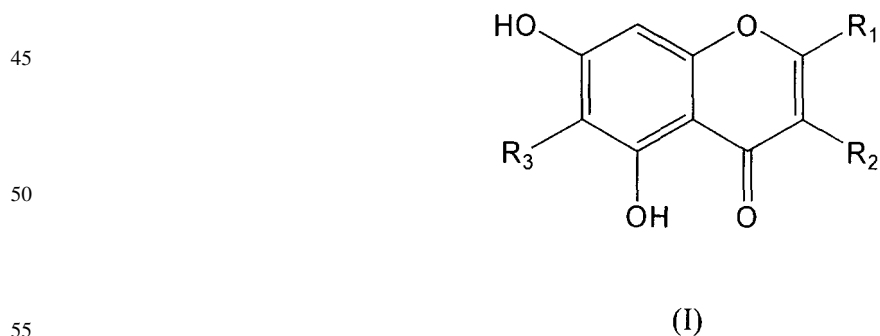
20 en el que dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria y demencia por infartos múltiples.

3. Uso según la reivindicación 1 de un compuesto de fórmula (Ib):

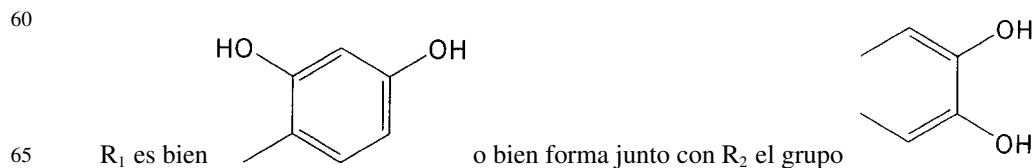


40 en el que dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre isquemia cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, neurofibromatosis, lesión cerebral, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, pérdida de memoria y demencia por infartos múltiples.

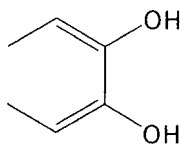
4. Uso de un compuesto de fórmula (I):



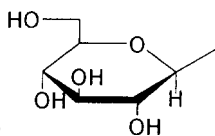
donde



ES 2 277 567 B1



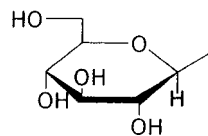
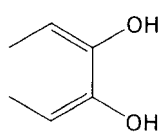
5 R_2 es bien OH o bien forma junto con R_1 el grupo



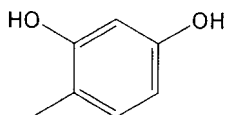
10 R_3 es bien OH o bien el grupo

de tal forma que:

15



20 - cuando R_1 y R_2 forman juntos un grupo OH, R_3 es ; y



25 - cuando R_2 y R_3 son OH, R_1 es

30 sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de síntomas asociados con el envejecimiento.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicha composición farmacéutica está destinada a su administración por vía oral, parenteral o rectal.

35 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición farmacéutica es administrada en combinación con otro fármaco adicional útil en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

40 7. Uso según la reivindicación 4, en donde dicha composición farmacéutica es administrada en combinación con otro fármaco adicional útil en la prevención y/o tratamiento de síntomas asociados al envejecimiento.

45 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en donde dicho fármaco adicional útil en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o en la prevención y/o tratamiento de síntomas asociados al envejecimiento se administra en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I).

9. Una composición alimentaria que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo alimentario.

50 10. Composición alimentaria según reivindicación 10 seleccionada entre un producto lácteo o derivado del mismo tal como un batido, leche, incluyendo leche aromatizada y fermentada, un yogurt; un zumo; un producto harinoso o derivado del mismo tal como una tarta, un pan, una galleta; un aceite; una golosina, tal como un chicle o un caramelo.

11. Uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 para la prevención y/o mejora de una enfermedad neurodegenerativa.

55 12. Uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 para la prevención y/o mejora de síntomas asociados al envejecimiento.

60

65

Figura 1A

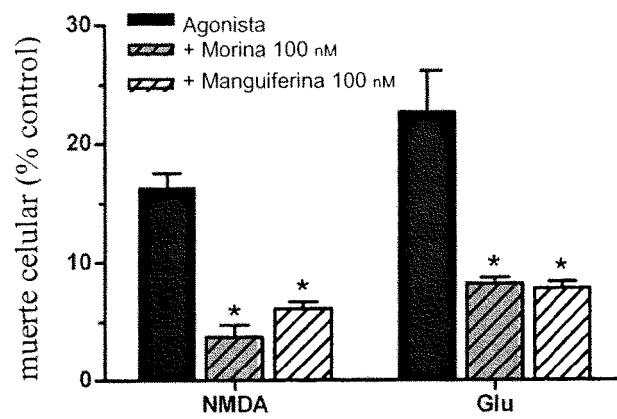
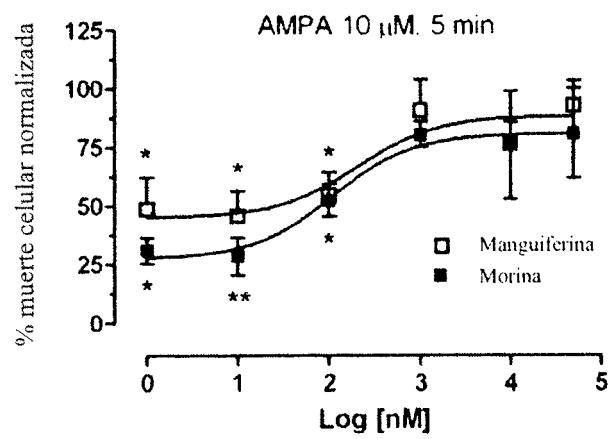


Figura 1B



Figuras 2 A-D, a-d

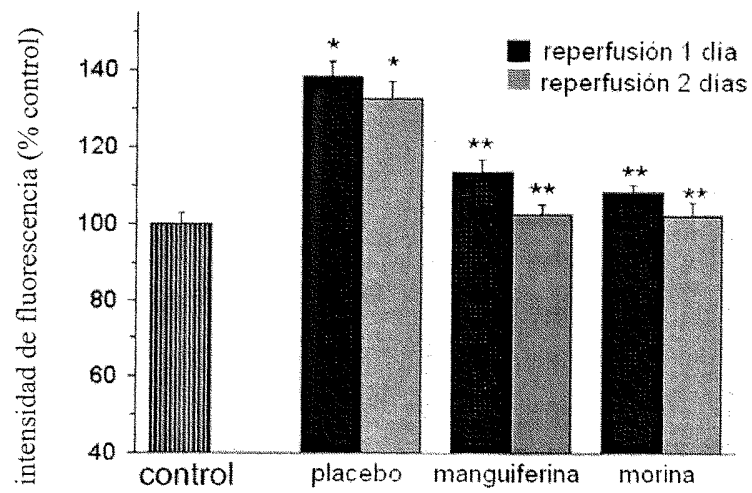
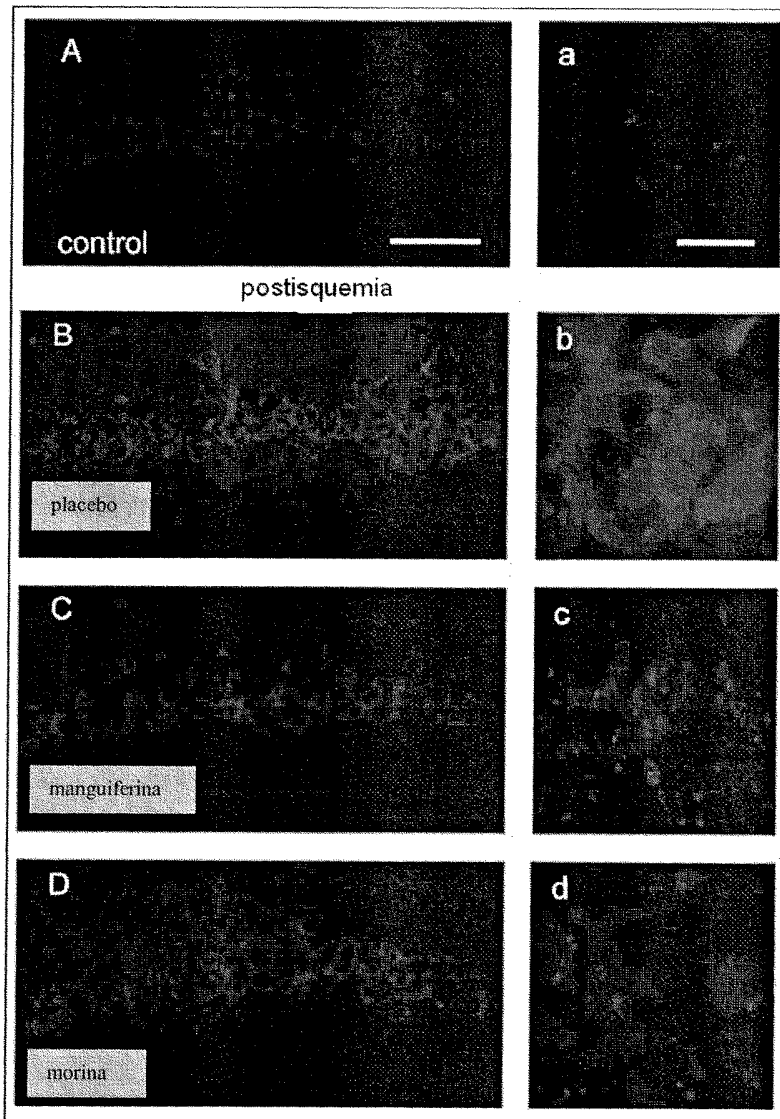


Figura 2E.

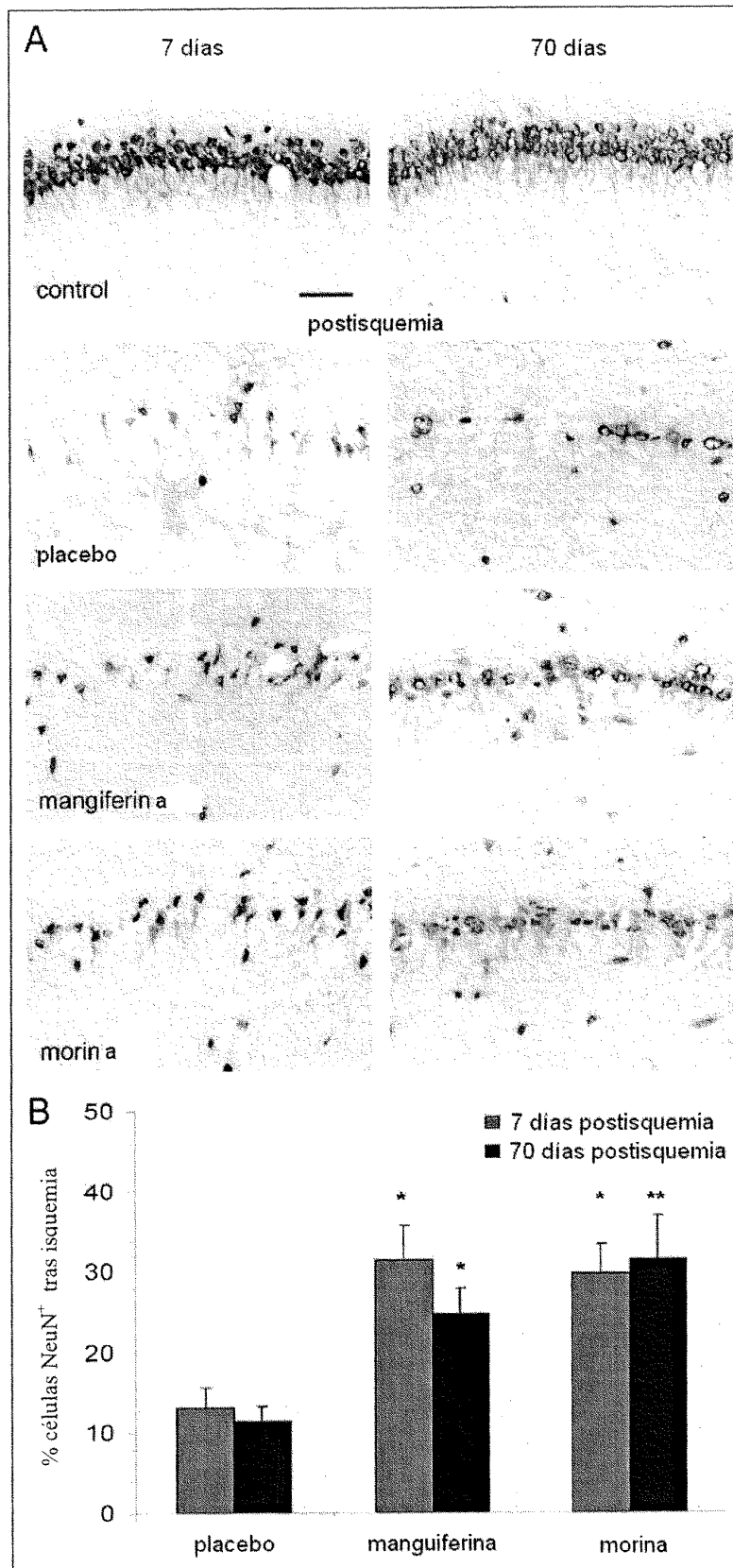


Figura 3.

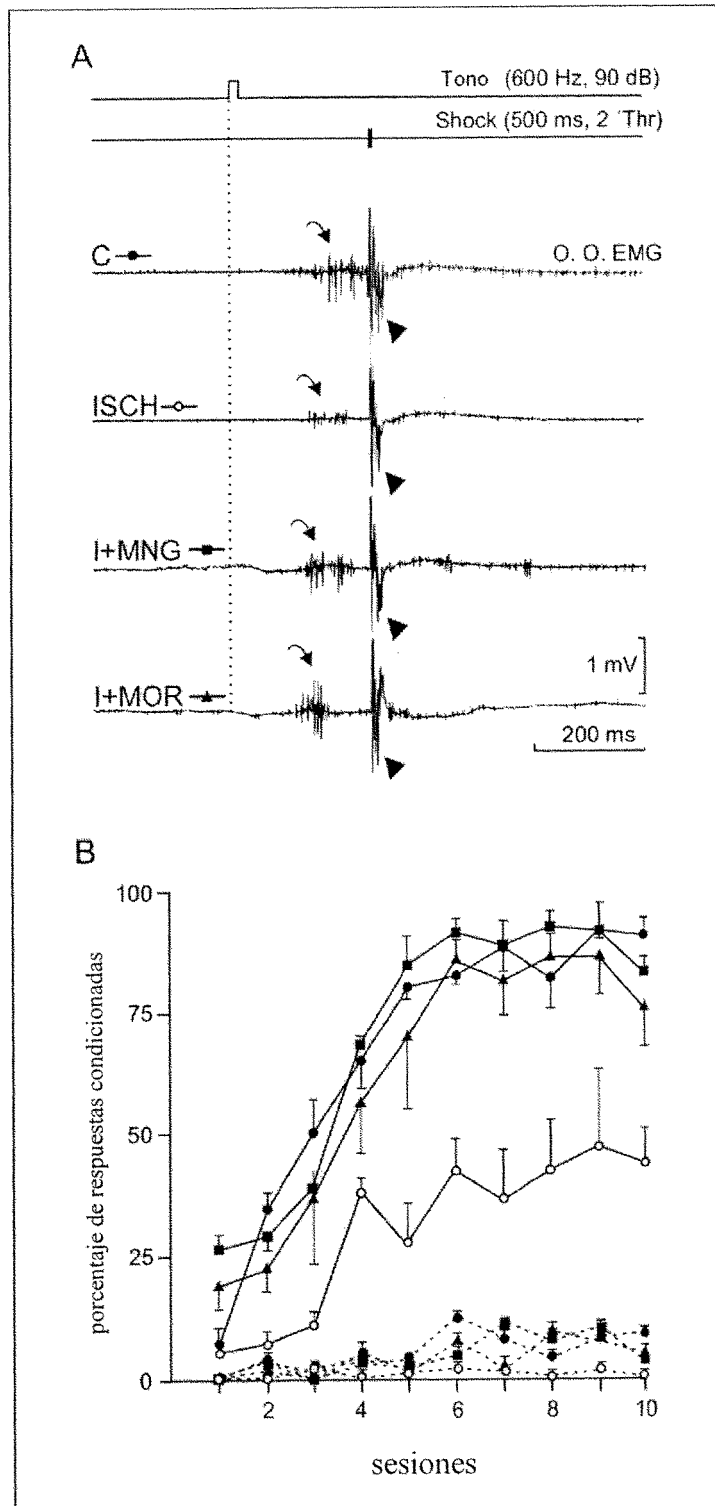


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 277 567

② Nº de solicitud: 200503262

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/352** (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20030055103 A1 (HEINZEN et al.) 20.03.2003, fórmula 1; figura 7; reivindicaciones 1,5.	1-12
A	Base de datos EPODOC en EPOQUE, JP 2005104850 (KANAZAWA UNIV, UNIV FUKUI) 21.04.2005, resumen.	1-12
A	WO 0149281 A2 (PROTEO TECH) 12.07.2001, reivindicación 1; fórmula C.	1-12
A	Base de datos CAS en STN, nº de acceso 2005:1046406. KIM et al., Journal and Agricultural and Food Chemistry, 2005, vol. 53, páginas 8537-8541. "Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid".	1

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

16.03.2007

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/1