

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 902**

21 Número de solicitud: 201831296

51 Int. Cl.:

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.12.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.06.2020

Fecha de concesión:

27.11.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.12.2020

73 Titular/es:

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

C/ Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

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

72 Inventor/es:

GUTIERREZ MIRANDA, Beatriz;

NIETO CALLEJO, M^a Luisa y

MAGIATIS, Prokopios

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de secoiridoides para el tratamiento de la neuritis óptica**

57 Resumen:

Uso de secoiridoides para el tratamiento de la neuritis óptica.

La presente invención se refiere al uso de secoiridoides oleaceína y oleocantal para prevenir o tratar las neuropatías que conducen a una lesión del nervio óptico tales como neuritis óptica. Asimismo, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o a una composición nutracéutica que comprende dichos secoiridoides.

ES 2 769 902 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

USO DE SECOIRIDOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE LA NEURITIS ÓPTICA

5 La presente invención se refiere al uso de los secoiridoides, tales como oleaceína y oleocantal, para prevenir o tratar neuropatías que conducen a una lesión del nervio óptico, tal como neuritis óptica (en adelante, NO). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que contienen dichos secoiridoides. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo técnico de la medicina así como a la industria alimentaria.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La neuritis óptica (NO) es una inflamación desmielinizante que daña el nervio óptico, un conjunto de fibras nerviosas que transmite información visual de su ojo a su cerebro. Los cambios patológicos que involucran varias estructuras retinianas pueden preceder a esta ocurrencia. NO es una enfermedad inflamatoria neuro-oftalmológica común que produce un deterioro de la visión persistente y generalmente afecta a un ojo. Los síntomas pueden incluir: dolor, pérdida de la visión en un ojo, pérdida del campo visual, pérdida de visión del color, luces intermitentes (Wu GF *et al.*, *Curr Immunol Rev.* 2015; 11: 85-92; Beck RW *et al.*, *Am J Ophthalmol.* 2004; 137: 77-83).

25 La inflamación ocular suele tener una etiología infecciosa o autoinmune. La NO con afectación unilateral se asocia más comúnmente con la esclerosis múltiple (EM). De hecho, al menos un 50 % de los pacientes con EM desarrollaron NO, aunque no todos los pacientes con NO desarrollaron EM. Sin embargo, la NO atípica puede estar asociada con trastornos del espectro de neuromielitis óptica (con presencia de anticuerpos anti-acuaporina-4 o anti-glicoproteína de la mielina del oligodendrocito, MOG), encefalomiopatía aguda diseminada y otras afecciones autoinmunes, tales como sarcoidosis, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren o enfermedad de Behçet. Se ha demostrado que MOG está presente en abundancia en el interior del nervio óptico, y las células inflamatorias reaccionan probablemente al antígeno MOG del nervio óptico para causar daño tisular. Por ende, el antígeno MOG tiene una posibilidad elevada de causar neuritis óptica.

35 La terapia de pulsos con metilprednisolona ha sido el pilar del tratamiento para la fase aguda de NO. Los corticosteroides aceleran la recuperación de la visión; sin embargo, no mejoran el pronóstico visual. Numerosos efectos secundarios indeseables están asociados con los corticosteroides. Un estudio incluso indica que la metilprednisolona

acelera la apoptosis de las neuronas en el sistema nervioso central. Con los graves efectos secundarios de los corticosteroides y su falta de efecto neuroprotector, los pacientes con NO necesitan con urgencia un nuevo medicamento con propiedades antiinflamatorias, regulación inmunitaria y efectos neuroprotectores.

5

La presente invención se refiere a la búsqueda de nuevos tratamientos para las alteraciones relacionadas con la EM, en particular, preferentemente neuritis óptica y describe una nueva aplicación farmacológica de la oleaceína y oleocantal como agentes que reducen notablemente los rasgos clínicos e inmunológicos/oxidativos de la neuritis óptica experimental (NOE). Los estudios de electroretinograma y de potenciales visuales evocados han demostrado que la función visual está alterada en pacientes con EM y en animales con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal que imita muchas de las características de la EM. Además, dado que los cambios patofisiológicos que ocurren en la médula espinal de EAE también ocurren en el nervio óptico de los ratones con EAE; el modelo animal de EAE es considerado un modelo ideal para estudiar NO (Shields *et al.* Brain Res. 1998; 784:299-304). Al igual que en la EM, los ratones con EAE a menudo desarrollan NO. Se utiliza el modelo de ratón bien establecido producido por la inmunización de ratones hembra C57BL/6 con un fragmento peptídico de MOG, MOG₃₅₋₅₅. Todos los ratones C57BL/6 con signos clínicos de EAE también tienen evidencia histológica de NOE. (Kuertén S. *et al.*, Ann Anat 2008, 190:1-15; Chaudhary P. *et al.*, J Neuroimmunol. 2011; 233:90-96).

10

15

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25

En la presente invención, los inventores han hallado que los secoiridoides, tales como oleaceína y oleocantal, poseen efectos protectores sobre la integridad y la función de la barrera hematoencefálica (BHE), así como sobre los eventos oxidativos e inmunoinflamatorios relacionados con la neuritis óptica.

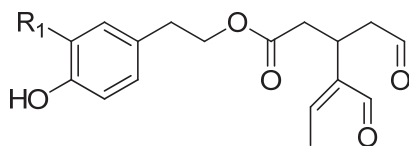
30

35

Los secoiridoides son monoterpenoides, derivados de iridoides en plantas, basados en el esqueleto 7,8-seco-ciclopenta[c]-piranoide. La mayoría de los secoiridoides e iridoides se han aislado de las plantas y se conocen aproximadamente 600 estructuras diferentes. Casi todos los secoiridoides son glucósidos. Este grupo de fitoquímicos se encuentra muy extendido en la naturaleza, y exhibe un amplio intervalo de actividades biológicas y farmacológicas, que incluyen actividades antibacterianas, anti-cancerígenas, anticoagulantes, anti-fúngicas, antioxidantes, anti-protozoarias y hepatoprotectoras (Dinda B. *et al.*, Chem Pharm Bull (Tokio). Agosto de 2009; 57(8):765-96).

Estos productos son sustancias naturales que se pueden aislar de las aceitunas, estos compuestos podrían utilizarse como suplemento de la dieta o en preparaciones nutracéuticas.

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



(I)

10 sus sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros y/o solvatos del mismo donde R₁ es -OH o H, para el tratamiento y/o prevención de la neuritis óptica.

15 El término "sales farmacéuticamente aceptables o solvatos del mismo" se refiere a sales o solvatos que, al ser administrados al receptor, son capaces de proporcionar un compuesto tal como el descrito en la presente memoria. La preparación de sales y derivados se puede llevar a cabo por métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferentemente, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como malestar gástrico, mareos y efectos secundarios similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recopilado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

25 Los compuestos utilizados en la invención pueden presentarse en forma cristalina, ya sea como compuestos libres o como solvatos (p. ej., hidratos), y se entiende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, el solvato es un hidrato.

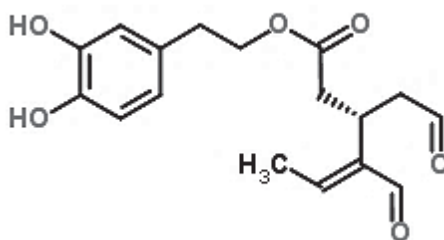
30 Se entiende que los "tautómeros" son los dos isómeros que difieren solo en la posición de un grupo funcional porque entre las dos formas hay un equilibrio químico en el que se produce una migración de un grupo o átomo.

35 A menos que se indique lo contrario, los compuestos utilizados en la invención tienen por objeto incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos

enriquecidos con isótopos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto la sustitución de un átomo de hidrógeno con un átomo de deuterio o un átomo de tritio, o la sustitución de un átomo de carbono con un átomo de carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un átomo de nitrógeno enriquecido en ^{15}N , caen dentro del alcance de esta invención.

5

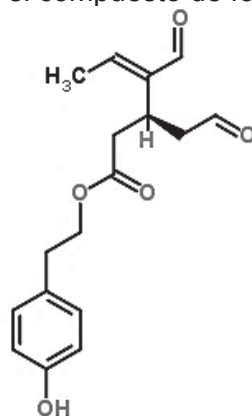
En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) es oleaceína:



Oleaceína

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

10



Oleocantal

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

15

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo: oral, parenteral (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), intranasal inhalada, etc.

20

La invención también se refiere a una composición que comprende los compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la neuritis óptica.

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

5 El término composición nutracéutica, como se utiliza en la presente memoria, incluye un producto alimenticio, un alimento, un suplemento dietético, un suplemento nutricional o una composición de suplemento para un producto alimenticio o un alimento.

10 En una realización particular, la composición es una composición farmacéutica que comprende excipientes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 El término "excipientes, adyuvantes y/o vehículos" se refiere a entidades moleculares o sustancias a través de las cuales se administra el principio activo. Dichos excipientes, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y aceites similares, excipientes, agentes de desintegración, humectantes o diluidos. Los excipientes y vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

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

25 En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden presentarse en una forma farmacéutica de administración oral, ya sea sólida o líquida. Los ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, diluidos, agentes de desintegración, lubricantes, humectantes, etc., y pueden prepararse por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles en la forma de dosificación adecuada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se eligen de acuerdo con la forma farmacéutica de administración seleccionada.

35 Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y su preparación se pueden encontrar en el libro "Treatise on Galenic Pharmacy" de C. Faulí i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, o cualquier libro de características similares en cada país.

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

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

Como se ha dicho anteriormente, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros y/o solvatos del mismo o composiciones para el tratamiento y/o la prevención de neuritis óptica. Alternativamente, la invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir la neuritis óptica que comprende administrar un compuesto o una composición de la invención a un sujeto en necesidad del mismo. Alternativamente, la invención se refiere al uso de un compuesto o una composición de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la neuritis óptica.

El término "tratamiento" se entiende ampliamente, refiriéndose a la reducción del potencial de una determinada enfermedad, a la reducción de la ocurrencia de una determinada enfermedad y/o a una reducción de la gravedad de una determinada enfermedad en particular, en la medida en que el sujeto ya no sufre molestias y/o función alterada debido a ella. "Tratamiento" se refiere a proporcionar un beneficio terapéutico o un resultado clínico deseado, que no es necesariamente una cura para una enfermedad o trastorno particular, sino que abarca un resultado que normalmente incluye el alivio de la enfermedad, la eliminación de la enfermedad, la reducción o el alivio de un síntoma asociado con la enfermedad, la prevención de una enfermedad secundaria como resultado de la ocurrencia de una enfermedad primaria, la disminución de la extensión de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable de la enfermedad.

"Prevención" tiene por objeto evitar la aparición de dicha enfermedad. La prevención puede ser completa (p. ej., la ausencia total de una enfermedad). La prevención también puede ser parcial, de modo que, por ejemplo, la ocurrencia de una enfermedad en un sujeto es menor que la que habría ocurrido sin la administración de los compuestos de la presente invención. La prevención también se refiere a la susceptibilidad reducida a una condición clínica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no tienen por objeto excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no tiene por objeto ser limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1. El tratamiento con oleaceína (OLE) disminuye la producción específica de auto-anticuerpos en ratones con EAE. Títulos de IgG1 específica de MOG en muestras de suero a una dilución de 1/60. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. Neuritis óptica experimental (en adelante, NOE), ratones inducidos. NOE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 5-8 animales. $\ddagger p < 0,001$ vs control y $*p < 0,001$ vs EAE.

Fig. 2. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce la inflamación en el nervio óptico durante la NOE. Para examinar si el tratamiento con OLE previene la infiltración de células inflamatorias, se aislaron nervios ópticos de ratones a los 21-23 días después de la inmunización y se tiñeron con H y E (hematoxilina y eosina). El análisis histológico del nervio óptico de ratones control, C; de ratones control tratados con OLE, C+OLE; de ratones inducidos, NOE; y de ratones inducidos tratados con OLE, NOE+OLE, mostró infiltración inflamatoria. El tratamiento con oleaceína mejoró todos estos parámetros.

Fig. 3. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce la inflamación en NOE. La expresión en suero de parámetros relacionados con la inflamación se utilizó como medida

de respuestas protectoras: los niveles del factor de necrosis tumoral- α , TNF α (A), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, GM-CSF (B), galectina-3, Gal 3 (C) e interleucina-1 β , IL-1 β (D) en suero se utilizaron como medidas de respuestas protectoras. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. NOE, ratones inducidos. NOE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 5-8 animales. ‡p <0.001 y ‡‡p <0,01 vs control y **p <0,01 y ***p <0,05 vs EAE.

Fig. 4. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce la desmielinización en el nervio óptico durante la NOE. Para examinar si el tratamiento con OLE previene la desmielinización, se aislaron nervios ópticos de ratones a los 21-23 días después de la inmunización y se tiñeron con LFB. El análisis histológico del nervio óptico de ratones control, C; de ratones control tratados con OLE, C+OLE; de ratones inducidos, NOE; y de ratones inducidos tratados con OLE, NOE+OLE, mostró la desmielinización. El tratamiento con oleaceína mejoró todos estos parámetros.

Fig. 5. El tratamiento con oleaceína (OLE) reduce el estrés oxidativo en el nervio óptico durante NOE. Para examinar si el tratamiento con OLE previene la generación de ión superóxido, se aislaron nervios ópticos de ratones a los 21-23 días después de la inmunización y se tiñeron con la sonda fluorescente oxidativo, dihidroetidio, DHE. (A) Imágenes representativas de la tinción con DHE, y (B) gráfico de barras que muestra la cuantificación de fluorescencia roja de secciones de nervio óptico de ratones control, C; de ratones control tratados con OLE, C+OLE; de ratones inducidos, NOE; y de ratones inducidos tratados con OLE, NOE+OLE, demostraron una acumulación de anión superóxido. El tratamiento con oleaceína mejoró todos estos parámetros.

Fig. 6. El tratamiento con oleaceína (OLE) aumenta la neuroprotección en la NOE. Los niveles de expresión de malondialdehído, MDA (A), de productos de oxidación avanzada de proteínas, AOPP (B), el poder antioxidante/reductor férrico, FRAP (C) y el depurador de ROS, sestrina-3 (D), en suero se utilizaron como medidas de respuestas protectoras. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. NOE, ratones inducidos. NOE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE.

Fig. 7. El tratamiento con oleaceína (OLE) protege de la alteración de la barrera hematoencefálica y disminuye la extravasación molecular en ratones con NOE. La extravasación de IgG endógena se utilizó como una medida de la alteración de la barrera hematoencefálica y de la extravasación de proteínas plasmáticas en el cerebro. A) Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia. B) Cuantificación de la

intensidad de fluorescencia. C, ratones sanos. C+OLE, ratones sanos tratados con OLE. NOE, ratones inducidos. NOE+OLE, ratones inducidos tratados con OLE. Los gráficos de barras representan la media \pm DE de 5 animales. $\ddagger p < 0,001$ vs control y $***p < 0,05$ vs EAE.

5 **Fig. 8. La oleaceína (OLE) inhibe las respuestas de la microglía activada,** incluida la producción de especies reactivas de oxígeno, ROS (A); inducción de reguladores inflamatorios (B); y síntesis y liberación de citoquinas inflamatorias (C).

10 Las células de microglia BV-2 se trataron previamente durante 30 minutos con las dosis indicadas de OLE: (A) Después de 24 horas de estimulación con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, se evaluó la producción de ROS intracelular mediante análisis de citometría de flujo. El panel muestra la cuantificación expresada en unidades arbitrarias (UA), ($\ddagger p < 0,001$ vs control, $**p < 0,01$ y $*p < 0,001$ vs estímulos sin OLE; $n = 3$). (B) Después de 4 o 24 h de estimulación con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, se identificó la expresión de COX-2, iNOS, p-p65-NF κ B y NLRP3 en lisados celulares mediante Western blot; (C) La presencia de TNF α e IL-1 β en el medio de cultivo celular de 24 h se cuantificó mediante ELISA comercial ($\ddagger p < 0,001$ vs control, $*p < 0,001$ vs estímulos sin OLE; $n = 3$).

20 **Fig. 9. Oleocantal inhibe las respuestas de la microglía activada,** incluida la inducción de reguladores inflamatorios (A); y síntesis y liberación de citoquinas inflamatorias (B). Las células de microglia BV-2 se pretrataron durante 30 minutos con las dosis indicadas de oleocantal: (A) Después de 4 o 24 horas de estimulación con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, se identificó la expresión de COX-2, iNOS, p-p65-NF κ B y NLRP3 en lisados celulares mediante Western blot; y (B) la presencia de TNF α e IL-1 β en el medio de cultivo celular de 24 h se cuantificó mediante ELISA comercial ($\ddagger p < 0,001$ vs control, $*p < 0,001$ vs estímulos sin OLE; $n = 3$).

EJEMPLOS

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

35 En los experimentos, los inventores utilizaron quince animales por grupo. Se indujo neuritis óptica experimental (NOE) en ratones C57BL como se describe (Quinn TA *et al.* Front Neurol. 2011;2:50; Chaudhary P. *et al.*, J Neuroimmunol. 2011; 233:90-96).

La inmunización se llevó a cabo con 100 μg de un péptido parcial de glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG33-55) en adyuvante completo de Freund que contenía 4

mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en 1 ml. Los ratones se inmunizaron mediante inyección subcutánea de esta emulsión en el día 0. Además, en los días 0 y 2, se les administró por vía intraperitoneal 300 ng/200 µl de toxina de *Bordetella pertussis*. La administración de 10 mg/kg de ácido oleaceína (OLE) se realizó por vía intraperitoneal una vez al día, a partir del día de la inmunización. La oleaceína se aisló de un extracto de aceite de oliva preparado utilizando el método de extracción descrito por Karkoula E. (Karkoula E. *et al.*, J Agric Food Chem. 2012;60:11696-11703). Brevemente, la oleaceína pura, así como el oleocantal, se aislaron a partir de un extracto de aceite de oliva preparado utilizando el método de extracción similar al descrito a continuación para la preparación de la muestra. El aceite de oliva (5,0 g) se mezcló con ciclohexano (20 ml) y acetonitrilo (25 ml). La mezcla se homogeneizó utilizando un mezclador vorticial durante 30 segundos y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos. Se recogió una parte de la fase de acetonitrilo (25 ml), se mezcló con 1,0 ml de una solución de siringaldehído (0,5 mg/ml) en acetonitrilo y se evaporó a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio (Buchi, Flawil, Suiza).

Los ratones se sacrificaron a los 21-23 días después de la inmunización con MOG. La inducción fue de auto-anticuerpos MOG-IgG1 se cuantificó en suero de ratones de los cuatro grupos experimentales. Como era de esperar, los niveles de auto-anticuerpos MOG-IgG1 aumentaron significativamente en el suero de ratones con NOE en comparación con el grupo de control sano. En ratones con NOE tratados con OLE, los niveles de auto-anticuerpos fueron significativamente menores (Fig. 1).

Para determinar si la OLE podría modular la respuesta inflamatoria en NOE, los inventores evaluaron en primer lugar la presencia de infiltración de células inflamatorias en los tejidos de neuritis óptica (NO) recogidos en el día 21-23 posterior a la inmunización (Fig. 2). El examen de las secciones del nervio óptico teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) mostró infiltrados celulares pronunciados en los tejidos de ratones con NOE en comparación con los de ratones control sanos. En cambio, en los tejidos de ratones con NOE tratados con OLE la infiltración de células se redujo notablemente, siendo comparable a la observada en los tejidos de ratones control sin tratar. El tratamiento con OLE en ratones control sanos no tuvo un efecto importante.

Los inventores también determinan los niveles circulantes de las proteínas inflamatorias, factor de necrosis tumoral- α (TNF α), galectina-3 (Gal-3) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en muestras de suero. Como era de esperar, la expresión de los mediadores inflamatorios aumentó significativamente en el suero de ratones con NOE en comparación con el grupo control sano. Sin embargo, su sobreexpresión se previno en el suero de ratones con EAE tratados con OLE: sus niveles

no aumentaron significativamente en comparación con los encontrados en el suero de ratones control con o sin tratamiento. Además, altos niveles de IL-1 β activa, un mediador que conecta la inmunidad innata y adaptativa, se detectaron en el suero de ratones con NOE y este aumento se redujo hasta en un 80 % en los animales tratados con OLE.

5

A continuación, se evaluó si OLE protege el nervio óptico de la desmielinización. La desmielinización del nervio óptico comienza después del inicio de la inflamación y puede detectarse mediante la tinción con azul rápido de luxol (LFB) de la mielina. Los ratones con EAE sin tratar mostraron un aumento notable en la desmielinización en comparación con los ratones de control. Se observaron regiones no teñidas que indican la destrucción de la vaina de mielina en el nervio óptico de ratones con NOE. (Fig. 4). Los nervios ópticos de los ratones con NOE tratados con OLE mostraron una mayor tinción de LFB en comparación con los nervios ópticos de los ratones con EAE no tratados, lo que significa una supresión en la desmielinización de los nervios ópticos.

10

15

Es bien sabido que la inflamación aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a un estrés oxidativo que media el daño tisular. Para investigar si la administración profiláctica de OLE a ratones con NOE también resultó en una reducción de la acumulación de ROS, los inventores utilizaron como un indicador inicial de la actividad de ROS la sonda fluorescente sensible a redox DHE que detecta el anión superóxido (O $_2^-$). Las secciones criogénicas del nervio óptico de ratones de los diferentes grupos experimentales se incubaron con la sonda DHE y se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. La intensidad de las señales de fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) (Fig. 5). En ratones control sanos, la tinción con DHE era básicamente indetectable en el nervio óptico. En cambio, el nervio óptico de los ratones con NOE mostró un aumento de la intensidad de fluorescencia roja en todo el tejido. Sin embargo, el tratamiento con OLE inhibió la producción de ROS inducida por NOE: la fluorescencia roja del etidio se atenuó ampliamente, siendo similar a la observada en tejidos de ratones control sanos.

20

25

30

Dado que el anión superóxido también se ha implicado en la peroxidación lipídica y en la oxidación proteica, los inventores evaluaron los niveles séricos de productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) y de malondialdehído (MDA), como productos finales de la peroxidación lipídica (Fig. 6A y B). El grupo con NOE mostró un aumento significativo de los niveles séricos de MDA y AOPP en comparación con el grupo control. Mientras tanto, el tratamiento con OLE previno de manera eficaz estos aumentos. Del mismo modo, la capacidad antioxidante del suero, evaluada mediante un ensayo de poder antioxidante/reductor férrico (FRAP), como un marcador del estado de antioxidantes no

35

enzimáticos, y los niveles de sestrina-3, como un disruptor de ROS, se redujeron significativamente en ratones con NOE en comparación con los del grupo control (Fig. 6C y D). El tratamiento con OLE mostró una atenuación significativa de esta disminución en comparación con los ratones con EAE no tratados.

5

El nervio óptico se considera parte del SNC. Durante la neuritis óptica aguda, la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), así como la ruptura de la barrera hematorretiniana (BHR) y la activación de la microglía residente en la retina y el nervio óptico son indicadores patológicos de la enfermedad. En consecuencia, los inventores caracterizaron el daño de BHR inducido por la NOE en ratones tratados con OLE y no tratados mediante el análisis de la extravasación de la IgG endógena del suero al cerebro utilizando inmunohistoquímica. La intensidad de las señales de fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). Como se muestra en la Fig. 7, el cerebro de ratones con NOE no tratados mostró un aumento notable en la extravasación de IgG (c, g) en comparación con los animales control sanos (a, b). Sin embargo, este aumento de la permeabilidad se previno mediante la administración de OLE. El tratamiento con OLE no modificó la integridad de BHR en los animales control.

10

15

20

A continuación, los inventores evalúan si los efectos protectores encontrados *in vivo* en los ratones con NOE tratados con OLE implican acciones directas en las células inflamatorias relevantes del SNC, los inventores estudiaron los efectos de OLE en las células de microglía BV-2 activadas para imitar las respuestas observadas en los trastornos neuroinflamatorios (Fig. 8).

25

Dado que la producción de ROS puede configurar programas inflamatorios específicos, los inventores investigaron la acumulación de ROS intracelular. El análisis de citometría de flujo mostró que la acumulación de ROS intracelular, que aumentó significativamente en las células BV-2 tratadas con LPS, se suprimió drásticamente en las células pre-tratadas con diferentes dosis de OLE (Fig. 8A).

30

35

Para determinar si la OLE era capaz de modular directamente la actividad inflamatoria en la microglía, las células BV-2 se trataron previamente con 1, 10 y 20 μ M de OLE durante 30 minutos y luego se estimularon con LPS (0,1 μ g/ml) durante 4 y 24 horas. Como se muestra en la Fig. 8B, el análisis mediante Western blot de las células BV2 activadas por LPS, mostró un aumento en la expresión de iNOS y COX-2 después de 4 y 24 h en comparación con las células control no estimuladas. Sin embargo, el pre-tratamiento celular con OLE condujo a una inhibición dependiente de la dosis de la producción de iNOS y COX-2 inducida por LPS, mientras que OLE per se no afectó su expresión basal. La

5 presencia de OLE también redujo la capacidad de LPS para inducir la secreción de TNF α y IL-1 β de una manera dependiente de la dosis (Fig. 8C). Del mismo modo, también se redujo la activación de los mediadores/mecanismos de señalización que influyen en estas respuestas inflamatorias, tales como fosforilación de p65-NF κ B y sobreexpresión de NLRP3 (Fig. 8B).

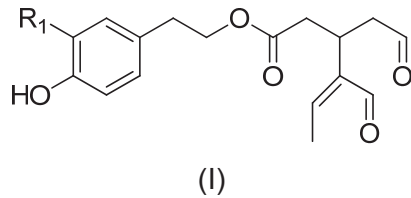
Esta invención también se refiere a métodos de uso de compuestos naturales, oleaceína y oleocantal, para inhibir las respuestas de la microglía activada.

10 Finalmente, los inventores también evalúan los efectos protectores de otro sercoiridoide natural: el oleocantal en células inflamatorias relevantes del SNC. Los inventores estudiaron los efectos del oleocantal en células de microglía BV-2 activadas para imitar las respuestas observadas en trastornos neuroinflamatorios (Fig. 9). Oleocantal se aisló de un extracto de aceite de oliva preparado utilizando el método de extracción descrito
15 por Karkoula E. (Karkoula E. *et al.*, J Agric Food Chem. 2012;60:11696-11703) como se ha descrito anteriormente.

Para determinar si el oleocantal fue capaz de modular directamente la actividad inflamatoria en la microglía, las células BV-2 se pre-trataron con 1, 10 y 20 μ M de oleocantal durante 30 minutos y luego se estimularon con LPS (0,1 μ g/ml) durante 4 y 24 horas. Como
20 se muestra en la Fig. 9A, el análisis mediante Western blot de células BV2 activadas con LPS, mostró un aumento en la expresión de iNOS y COX-2 después de 4 y 24 h en comparación con las células control no estimuladas. Sin embargo, el pre-tratamiento celular con oleocantal condujo a una inhibición dependiente de la dosis de la producción de iNOS y
25 COX-2 inducida por LPS, mientras que el oleocantal per se no afectó su expresión basal. La presencia de oleocantal también redujo la capacidad de LPS para inducir la secreción de TNF α y de IL-1 β de manera dependiente de la dosis (Fig. 9B). Del mismo modo, también se redujo la activación de los mediadores/mecanismos de señalización que influyen en estas respuestas inflamatorias, tales como fosforilación de p65-NF κ B y sobreexpresión de NLRP3
30 (Fig. 9A).

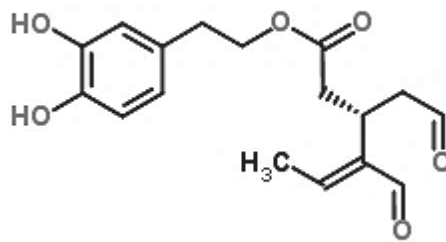
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):

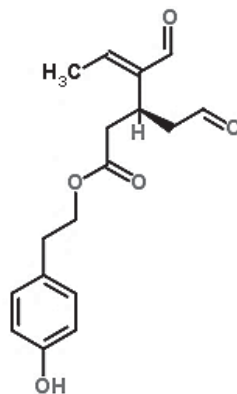


10 sus sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros y/o solvatos, donde R₁ es -OH o H para el tratamiento y/o la prevención de la neuritis óptica.

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (I) es oleaceína:



3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (I) es oleocantal:



4. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el

compuesto es administrado por vía oral, parenteral o intranasal.

5. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto es administrado a una dosis entre 5 mg/día y 20 mg/día.

5

6. Una composición que comprende el compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la neuritis óptica.

10

7. La composición para su uso según la reivindicación 6, donde la composición es una composición farmacéutica o una composición nutracéutica.

8. La composición para su uso según la reivindicación 6 o 7, que comprende además otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia combinada.

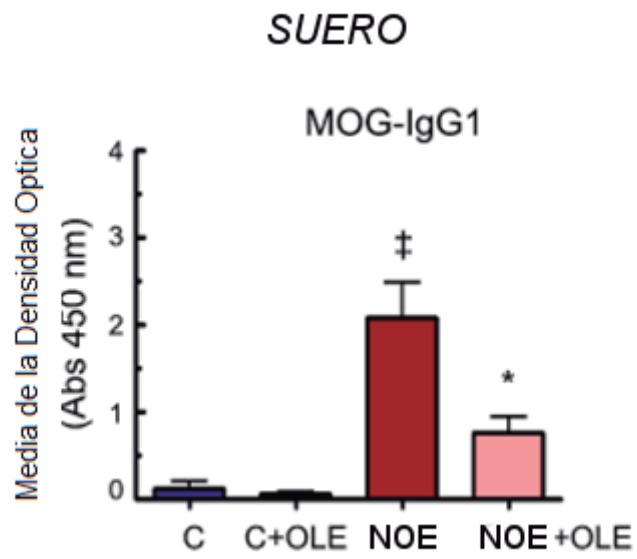


FIG. 1

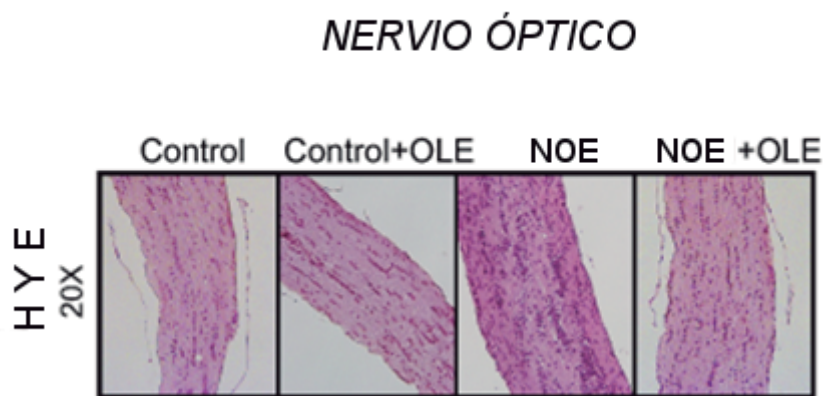


FIG. 2

SUERO

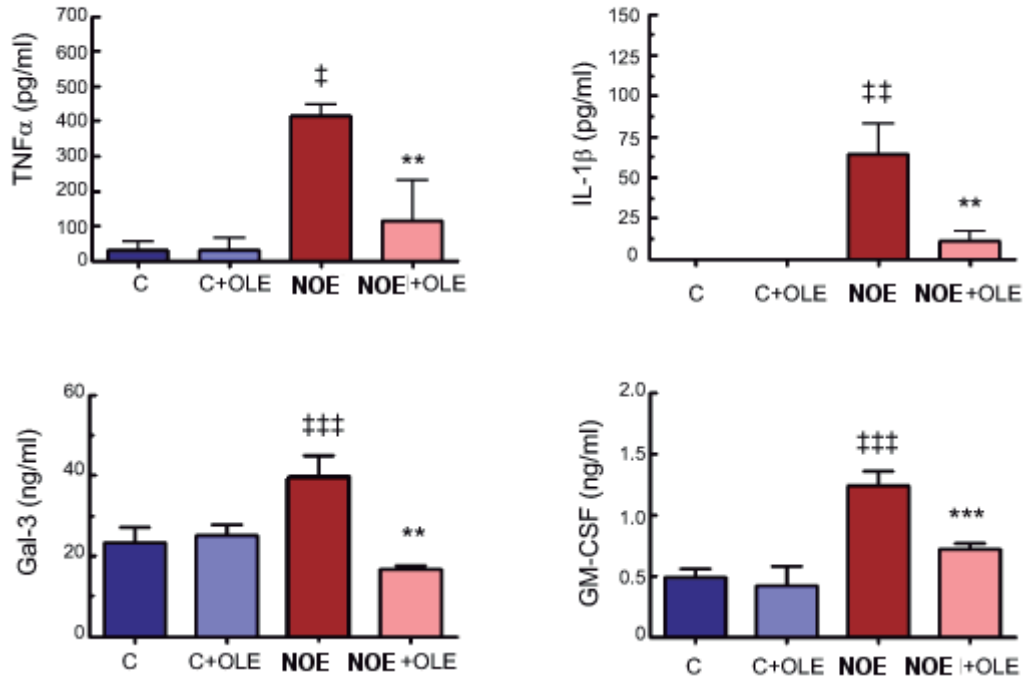


FIG. 3

NERVIO ÓPTICO

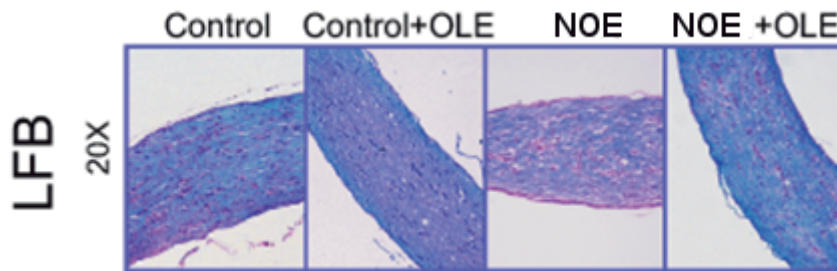
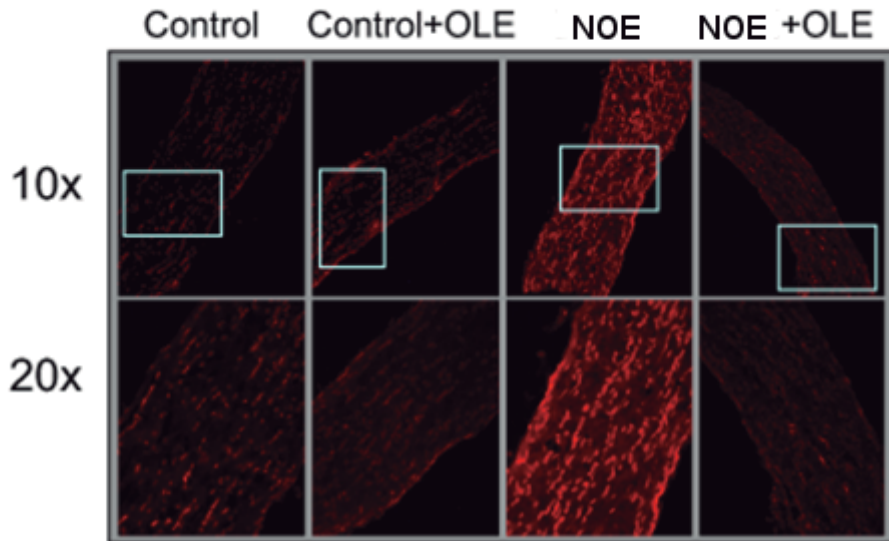


FIG. 4

NERVIO ÓPTICO

A



B

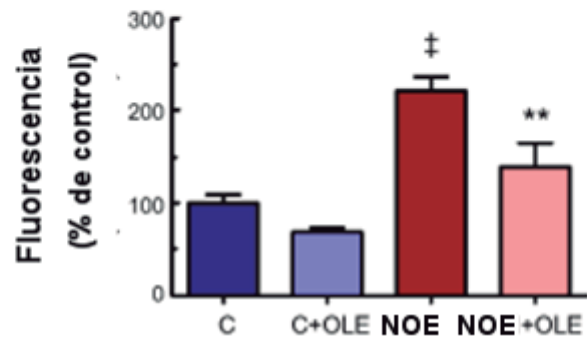


FIG. 5

SUERO

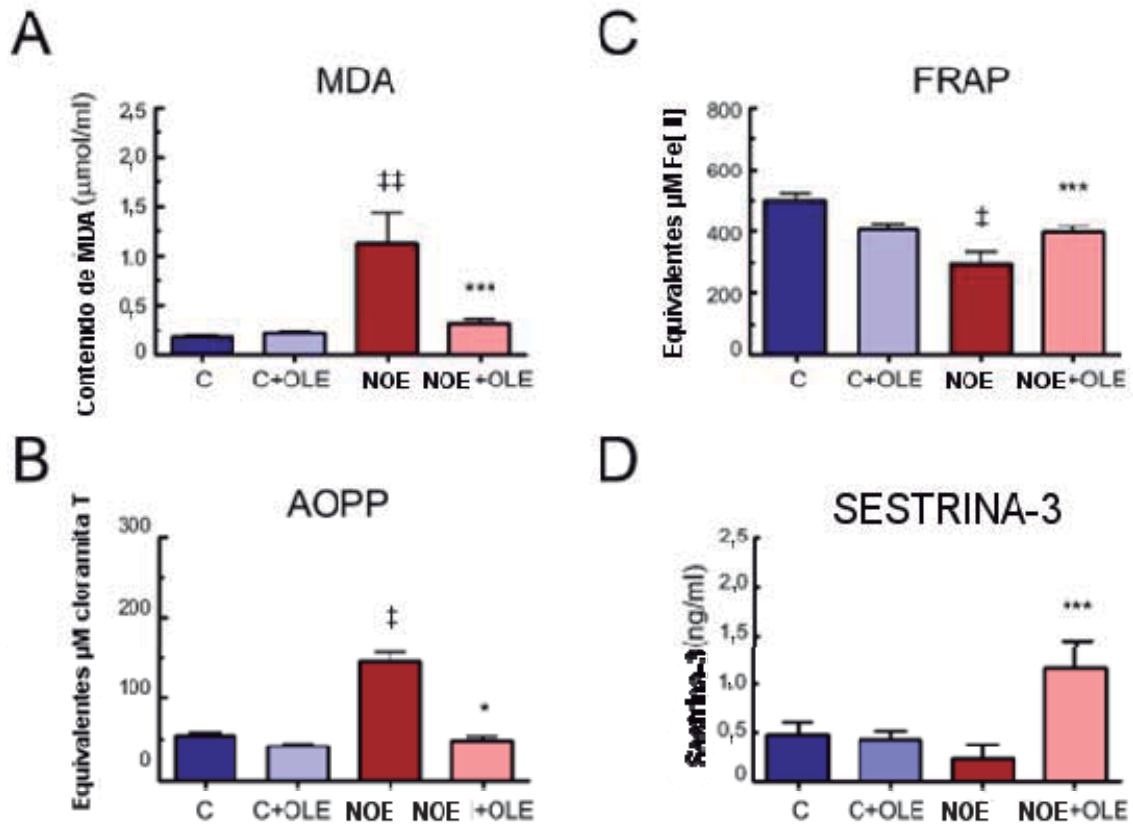


FIG. 6

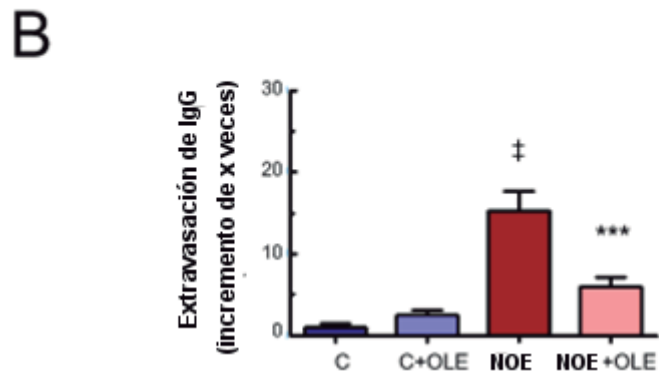
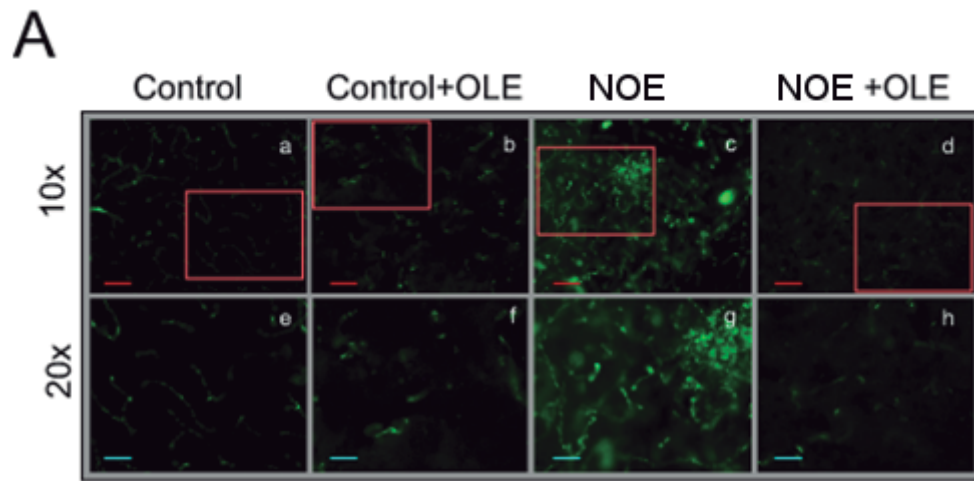
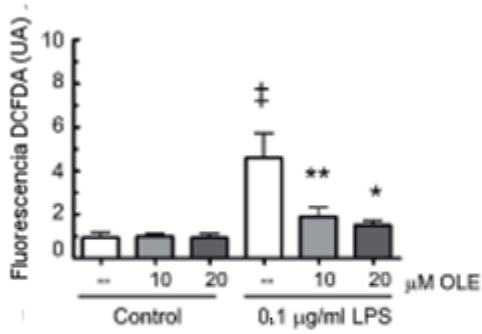


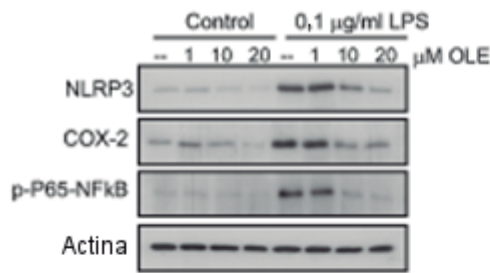
FIG. 7

A. Producción de ROS

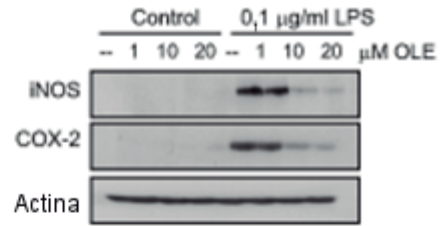


B. Reguladores inflamatorios

i) 4 h de estimulación



ii) 24 h de estimulación



C. Citoquinas inflamatorias

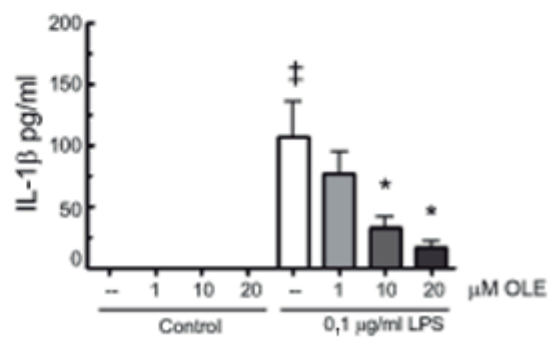
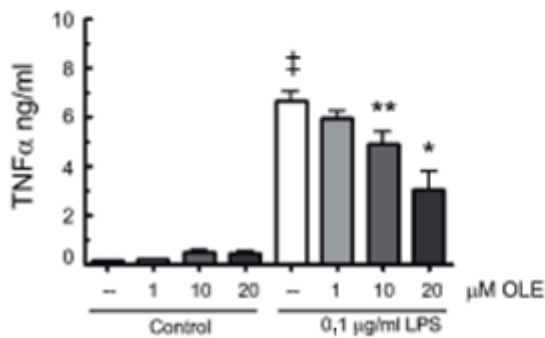


FIG. 8

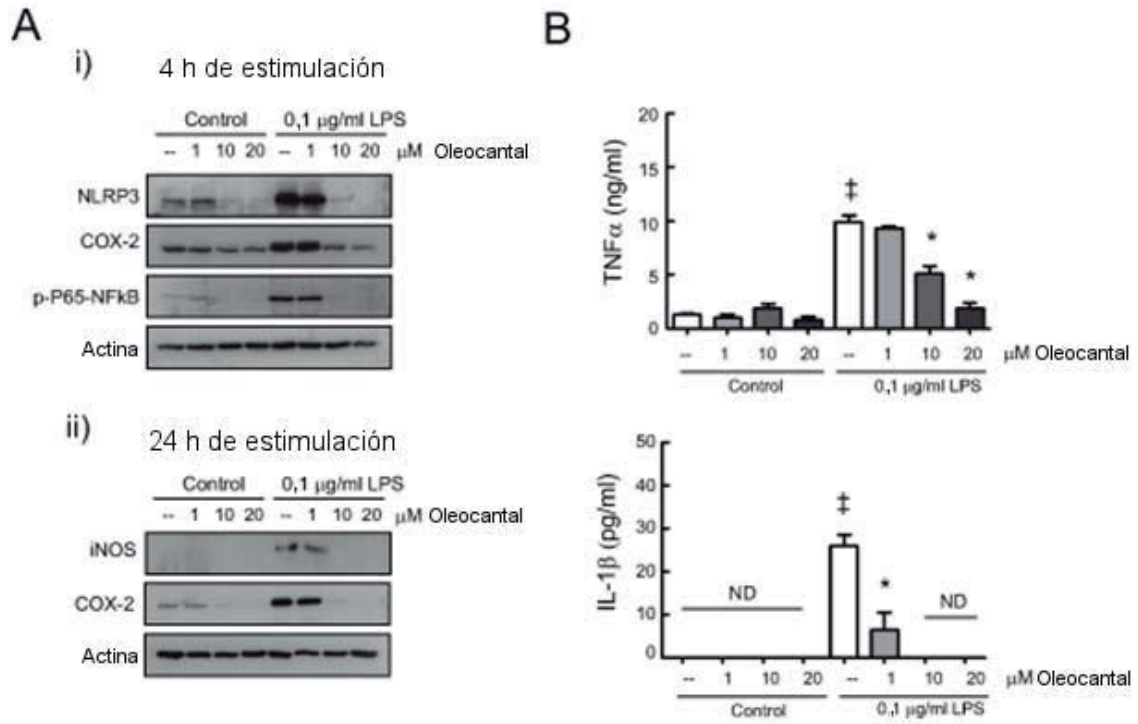


FIG. 9