

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 533**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07764849 .1**
96 Fecha de presentación: **26.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2046354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **PREPARACIÓN DE APHANIZOMENÓN FLOS-AQUAE, EXTRACTOS Y COMPONENTES PURIFICADOS DE LOS MISMOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS NEUROLÓGICOS, NEURODEGENERATIVOS Y DEL ÁNIMO.**

30 Prioridad:
27.06.2006 US 816593 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.12.2011

73 Titular/es:
NUTRATEC S.R.L.
VIA MAGGETTI 14
61029 URBINO, IT

72 Inventor/es:
SCOGLIO, Stefano;
CANESTRARI, Franco;
BENEDETTI, Serena;
BENEDETTI, Yanina y
DELGADO-ESTEBAN, Maria

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 533 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

Preparación de *Aphanizomenon flos-aquae*, extractos y componentes purificados de los mismos para el tratamiento de trastornos neurológicos, neurodegenerativos y del ánimo

5 La presente invención se refiere a la microalga *Aphanizomenon flos-aquae Aquae Ralfs ex Born. y Flah. Var. flos-aquae* (AFA Klamath). Más concretamente, la invención proporciona extractos de AFA Klamath útiles para la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones neurológicas, neurodegenerativas y del ánimo específicas.

Antecedentes de la invención

10 La feniletilamina (PEA) es una amina endógena sintetizada por descarboxilación de la fenilalanina en neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriado, y puede actuar como neuromodulador de la neurotransmisión de catecolamina en el cerebro (1). La acción más importante de la PEA es promover la neurotransmisión de las catecolaminas. Se sabe que la PEA estimula la liberación de acetilcolina, así como de dopamina (2). Además, la PEA aumenta la neurotransmisión de norepinefrina (NE) (6) e incluso la neurotransmisión de serotonina.

15 Recientemente se ha demostrado que la PEA también puede funcionar como neurotransmisor autónomo con sus receptores neuronales específicos; y que actúa como un verdadero neuromodulador, siendo también capaz de deprimir la neurotransmisión si es necesario. (8)

De aquí se derivan una serie completa de efectos: estimulación de la atención y de la memoria; mejora del ánimo, con actividad antidepresiva significativa; estimulación de la empatía y por tanto de la sociabilidad, incluido el comportamiento emocional y sexual; inhibición del hambre; reducción de la necesidad de abuso de sustancias y dependencia de drogas.

20 La relación entre la PEA y el ánimo emocional se ha confirmado por estudios por los que se han descubierto niveles significativamente menores de PEA, medida como tal o a través de su metabolito PAA (ácido fenilacético) en el plasma u orina, en sujetos deprimidos. (9)

25 Se ha observado que los pacientes con Parkinson tienen niveles significativamente menores de PEA, según se mide directamente en el plasma (12). La reducción progresiva de la neurotransmisión, particularmente dopaminérgica, en estos pacientes, está relacionada con la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia negra*.

30 Esta reducción en los niveles de PEA va de la mano con un aumento paralelo en los niveles de MAO-B en pacientes parkinsonianos, por lo tanto los fármacos usados en el Parkinson son inhibidores de la MAO-B tales como selegilina. (14) Además, una vez ingerida, la PEA puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y estimular la liberación de dopamina a partir del tejido nigroestriado incluso a bajas dosificaciones. Éste es un carácter distintivo importante debido a que el fármaco usado actualmente, la selegilina, al tiempo que inhibe la MAO-B y la recaptación de dopamina, no tiene ninguna acción sobre su liberación a partir del tejido nigroestriado y, por tanto, no contribuye a producir más dopamina, una limitación sería en una patología tal como el Parkinson, por lo que la misma generación de dopamina está muy comprometida.

35 La enfermedad de Alzheimer implica una degeneración del mecanismo de producción y recaptación de dopamina y la destrucción progresiva de las neuronas del área estriada, que con el tiempo lleva a un bajo número de neuronas dopaminérgicas y, por consiguiente, de transmisión de dopamina. (15)

40 Aunque no existen datos claros sobre el hecho de que el TDAH (trastorno de déficit de atención e hiperactividad) sea una patología neurodegenerativa, algunos estudios han intentado demostrar que la destrucción neuronal es una causa principal de TDAH tanto en niños como en adultos. (19)

45 Lo que es más importante, existen pruebas por las que los niños afectados por TDAH y discapacidades del aprendizaje tienen niveles significativamente menores de PEA (21), y por tanto una reducción en la neuromodulación de la atención (dopamina) y la sedación (serotonina). Es por eso que el fármaco de elección para el TDAH es el metilfenidato, un derivado sintético de la PEA, que también actúa estimulando una mayor producción de PEA (22) y, por tanto, de dopamina y norepinefrina, dos neurotransmisores directamente implicados en la etiología del TDAH.

50 Es bien conocido el uso de anfetaminas para controlar el hambre y, por consiguiente, el peso. Su uso en esta área ha sido siempre controvertido debido a sus efectos secundarios que, dada también su tolerancia, tienden a convertirse en potencialmente muy graves con el tiempo. Esto se confirma por el hecho de que los fármacos principales actualmente usados para el control del hambre y del peso son antidepresivos dopaminérgicos de tipo anfetaminas tales como venlafaxina y bupropión. Estas moléculas, como todas las anfetaminas, son derivados sintéticos de la PEA. La última actúa como un potente supresor del apetito en la medida en que se impide su degradación por enzimas MAO-B.

La monoaminooxidasa (MAO) A y B catalizan la degradación de aminas neuroactivas y vasoactivas en el SNC y en tejidos periféricos. La MAO-B en particular, dada su importancia directa e indirecta para la transmisión

dopaminérgica, está implicada en trastornos neurológicos en los que la dopamina es esencial, tales como una depresión y trastornos del ánimo, enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Por esta razón, se usan inhibidores de la MAO-B en el tratamiento de dichos trastornos neurológicos. (26)

Descripción de la invención

5 La invención se basa en la identificación, en la microalga *Aphanizomenon flos-aquae* *Aquae* Ralfs ex Born. y Flah. Var. *flos-aquae* (*AFA Klamath*), de sustancias que, en combinación, ejercen efectos beneficiosos sobre diversas enfermedades, afecciones, disfunciones o trastornos neurológicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, en concreto sobre Alzheimer y Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), autismo, depresión, déficit de memoria y alteraciones del ánimo. En particular, se ha descubierto que la
10 microalga AFA Klamath contiene, aparte de feniletilamina, que es un neuromodulador caracterizado por actividad dopaminérgica y noradrenérgica, moléculas específicas que bastante sorprendentemente demostraron ser inhibidores muy eficaces de la enzima monoaminooxidasa B (MAO-B), en concreto: a) el fitocromo de AFA específico; b) el complejo de ficobiliproteína de AFA, que contiene un ficobilisoma formado por C-ficocianina (C-PC) y ficoeritrocianina (PEC, incluyendo su cromóforo ficoviolobilina o PVB) ("ficocianinas de AFA"); c) aminoácidos de tipo micosporina o MAA. Este descubrimiento es muy importante puesto que la PEA contenida en las algas, a menos que
15 esté protegida por inhibidores de la MAO-B, se destruiría rápidamente tras la ingestión por la enzima MAO-B.

Las mismas moléculas que actúan como inhibidores selectivos de la MAO-B también realizan un potente papel neuroprotector, por tanto aumentan significativamente la capacidad del extracto para promover la salud neurológica.

Por consiguiente, la invención proporciona un uso para la fabricación de una composición para prevenir, controlar o
20 tratar las enfermedades, afecciones, disfunciones o trastornos neurológicos mencionados anteriormente, de un extracto de AFA Klamath enriquecido en dichos componentes activos, que se prepara mediante las etapas siguientes:

- a) congelar el alga AFA recién recogida y descongelarla o, si el material de partida es polvo de AFA seco, sonicar el polvo de AFA diluido en agua para romper las células;
- 25 b) centrifugar el producto de la etapa a) para separar el sobrenadante (que conserva la mayor parte de la porción citoplasmática) del precipitado (que conserva la mayor parte de la fracción de pared celular);
- c) recoger el sobrenadante que contiene los componentes solubles en agua.

El producto resultante es un extracto (indicado como "Extracto Básico") que concentra la PEA así como otras moléculas sinérgicas tales como el fitocromo de AFA, las ficocianinas de AFA y los MAA. Por ejemplo, mientras que las microalgas Klamath tienen un contenido natural de PEA que varía de 2 a 4 mg/g, el Extracto Básico aumenta esta concentración hasta un nivel que varía de 9 a 11 mg/g (análisis de HPLC).
30

Es posible purificar adicionalmente el extracto pasándolo a través de un sistema de ultrafiltración, preferentemente a través de una membrana con un límite de peso molecular de 30.000 Daltons. El material retenido de ultrafiltración (Extracto A) contiene como componentes activos principales tanto las ficocianinas de AFA (peso molecular = 121.000) como el fitocromo de AFA (peso molecular 480.000). Curiosamente, aun cuando los MAA tienen un peso molecular bien por debajo del tamaño límite empleado, el material retenido también aumenta la concentración de MAA.
35

El Extracto Básico obtenido por las etapas a) a c), es decir, sin ultrafiltración, se prefiere generalmente ya que contiene las cantidades más apropiadas de PEA, fitocromo de AFA, AFA-PC y MAA. Además, este Extracto Básico también incluye sustancias tales como clorofila y carotenos, aun cuando en una proporción reducida, que contribuyen a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
40

La inhibición observada de la monoaminooxidasa B es particularmente relevante ya que permite aumentar la transmisión dopaminérgica y minimizar el catabolismo de la PEA. Significativamente, tanto el fitocromo como la ficocianina de AFA inhiben la MAO-B de una forma reversible y mixta, mientras que la inhibición de la MAO-B por MAA es competitiva y reversible; por lo tanto, las tres moléculas aseguran una alta eficacia en condiciones fisiológicas y en ausencia de efectos secundarios.
45

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición nutracéutica o farmacéutica que contiene un extracto de AFA Klamath para su uso como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, las composiciones nutricionales son complementos dietéticos en forma de comprimidos, cápsulas, bebidas; en una
50 realización preferida adicional, las composiciones farmacéuticas están en forma de comprimidos, cápsulas, sobrecitos, jarabes, supositorios, viales y pomadas, para su uso para la prevención o tratamiento de las enfermedades o afecciones neurológicas o neurodegenerativas indicadas anteriormente. Los extractos líquidos de AFA Klamath para su uso de acuerdo con la invención pueden usarse como tales o pueden secarse a través de metodologías tales como secado por congelación, secado por pulverización o similares.

La dosis de principio activo dependerá del uso deseado de las composiciones, ya sea como complemento nutricional o como preparación farmacéutica. La cantidad eficaz de cada componente estará generalmente comprendida en los intervalos siguientes: PEA = 0,1-100 mg, preferentemente 5-30 mg; fitocromo = 0,1-1000 mg, preferentemente 0,8-
55

10 mg; MAA = 0,1-1000 mg, preferentemente 10-100; ficocianinas = 1-2500 mg, preferentemente 50-1000 mg.

Descripción detallada de la invención

Identificación de "fitocromo de AFA", un fitocromo único típico de algas Klamath

5 Los fitocromos son fotorreceptores, pigmentos que usan las plantas para detectar la luz y que son sensibles a la luz en la región del rojo y del rojo lejano del espectro visible. Realizan muchas funciones diferentes en plantas, incluyendo la regulación de la floración (a través de ritmos circadianos), la germinación y la síntesis de clorofila. Esta última es particularmente relevante en relación con las algas AFA, debido a que la presencia de este tipo único de fitocromo en AFA puede explicarse por su carencia de la otra ficobiliproteína comúnmente usada por otras cianobacterias para complementar la C-ficocianina en el proceso de fotosíntesis, en concreto la alo-ficocianina. 10 Aunque el lugar de la alo-ficocianina en las algas Klamath lo ocupa la ficoeritrocianina o PEC (véase a continuación), es probable que la PEC solamente no sea suficiente, considerando especialmente que las algas Klamath viven en un entorno no tropical que necesita una elevada eficacia de recogida de luz y, por tanto, las algas AFA parecen integrar sus mayores necesidades con el fitocromo.

15 El fitocromo de AFA que tiene una estructura peculiar, se describe en el presente documento por primera vez. A lo largo de los años, se han descubierto diferentes tipos de fitocromos en plantas, que no sólo tienen diferentes genes de fitocromo (3 en el arroz y 6 en el maíz, por ejemplo), sino que en la mayoría de los casos tienen componentes proteicos y estructuras significativamente diferentes. Lo que hace que todos sean fitocromos es que todos usan la misma biliproteína, denominada fitocromobilina, como un cromóforo de absorción de luz. Este cromóforo es similar al cromóforo de la ficocianina ficocianobilina, y se caracteriza por una sola molécula de bilina que consiste en una 20 cadena abierta de cuatro anillos pirrol (tetrapirroles). Más específicamente, en su estado normal P_r , esta biliproteína absorbe luz a un máximo de 650-670 nM, mientras que cuando se activa por luz roja se transforma en P_{fr} , con un máximo de absorbancia de 730 nM.

25 El primer fitocromo cianobacteriano que se descubrió, el de *Synechocystis*, demostró tener una débil similitud estructural con fitocromos de plantas. No obstante, la biliproteína de *Synechocystis* se considera generalmente un fitocromo en la medida en que es una cromoproteína reversible de rojo/rojo lejano. (48)

Purificación y caracterización de fitocromo de AFA

El fitocromo de AFA tiene una biliproteína como su cromóforo que absorbe luz en el espectro rojo/rojo lejano. Para establecer su estructura y actividades los presentes inventores han purificado el fitocromo con el protocolo siguiente:

- 30 - Suspender 1 g de extracto en 10 ml de 1 tampón K-fosfato, pH 7,0.
- Agitar vorticialmente dos veces durante 1 min con la mitad de su volumen.
- Incubar las células durante 35' con Triton X 100 al 2%.
- Centrifugar a 28000 rpm durante 16-18 h.
- Recoger el sobrenadante en un gradiente de densidad por etapas de sacarosa.
- 35 - Centrifugar el gradiente usando rotores oscilantes a 150000 g durante 12 h.
- Almacenar a -20°C.

40 El fitocromo corresponde a la banda de lisado de un color naranja intenso que es visible a aproximadamente 1 M de sacarosa, mientras que el ficobilisoma se encuentra a aproximadamente 0,75 M. Esta relación de las dos bandas también proporciona indicios fiables acerca del peso molecular del fitocromo presente en las algas, que es aproximadamente 4 veces el de la AFA-PC trimérica; siendo este último de 121 Kd, los presentes inventores pueden establecer de forma preliminar el PM del fitocromo de AFA a aproximadamente 480 Kd (Figura 22).

Ensayado por sus propiedades de absorción de luz, el fitocromo demuestra absorber luz con dos picos a 672 nM y 694 nM, que corresponden respectivamente a las formas P_r (de absorción de luz roja) y P_{fr} (de absorción de luz roja lejana) en un estado de equilibrio (Figura 23).

45 En relación con la cantidad de fitocromo contenida en AFA, la primera evaluación de los presentes inventores proporciona el siguiente resultado preliminar: 2 mg/g (o 0,2% DW). En relación con los extractos, la concentración aumenta hasta aproximadamente el 0,5% en el Extracto Básico y aproximadamente el 1% en el Extracto B. Estas son concentraciones bajas, aunque la potencia antioxidante/antiinflamatoria de esta molécula es tan fuerte que incluso una cantidad muy pequeña puede producir efectos muy relevantes.

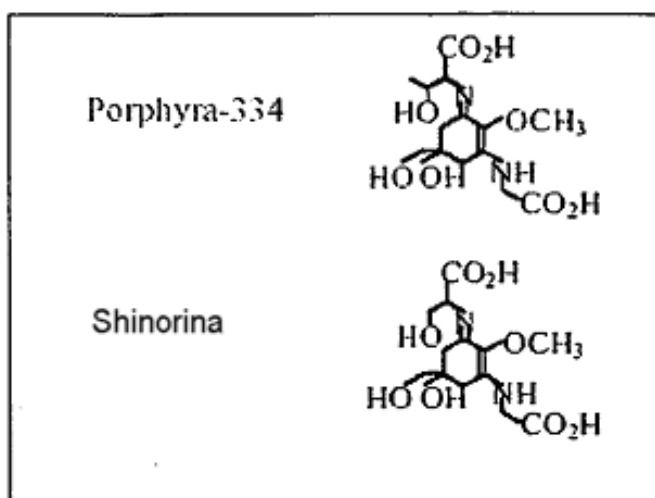
Actividad antioxidante

50 El fitocromo de AFA purificado ha demostrado ser un antioxidante muy potente. De hecho, en términos absolutos, la molécula más potente descubierta hasta la fecha en algas Klamath. La incubación durante 2 h de muestras de plasma humano con el agente oxidante $CuCl_2$ a 100 μM genera niveles aumentados de malondialdehído (MDA), un subproducto tardío de la peroxidación de lípidos que se mide mediante el espectrofotómetro a 535 nm después de una reacción con ácido tiobarbitúrico (ensayo de TBA). Cuando el plasma se incubaba durante 2 h a 37°C con $CuCl_2$ 100 μM junto con cantidades crecientes de fitocromo de AFA (2-16 nM) extraído de algas AFA, se observa una 55

reducción dependiente de la dosis muy intensa de los niveles de MDA (Figura 24). De hecho, se obtiene una inhibición casi completa de la lipoperoxidación con niveles de MDA próximos al control, con sólo 16 nM de fitocromo de AFA. Significativamente, la CI50 de 3,6 nM es 45 veces menor que la obtenida para la PCB. El fitocromo es el principal responsable de los efectos antioxidante y neuroprotector del Extracto Básico, que son superiores a los de la AFA-PC.

Extracción, purificación y cuantificación de MAA

Los presentes inventores ensayaron la presencia de MAA en la cianofita *Aphanizomenon flos-aquae* del lago Klamath, generalmente conocidas como algas Klamath. Hasta donde sabemos, sólo existe un informe muy reciente sobre la aparición de MAA en cualquier especie de *Aphanizomenon* (47); sin embargo, dicho informe solamente identifica la Porphyrina como los MAA presentes, mientras que la investigación de los presentes inventores muestra la presencia de dos MAA, tanto Porphyrina como shinorina. Por otro lado, en relación con la bibliografía global sobre algas, mientras que la mayoría de las cianobacterias descritas hasta la fecha contienen shinorina como sus MAA primarios, los presentes inventores han descubierto una aparición poco frecuente de Porphyrina-334 como MAA primario en *Aphanizomenon flos-aquae* además de shinorina.



Las MAA se extrajeron como se ha descrito anteriormente. (29) En resumen, se extrajeron 20 mg de polvo de AFA o 20 mg de extracto acuoso en 2 ml de metanol acuoso al 20% (v/v) (calidad de HPLC) por incubación en un baño de agua a 45°C durante 2,5 h. Después de la centrifugación (5000 g; GS-15R Centrifuge, Beckman, Palo Alto, Estados Unidos), el sobrenadante se evaporó hasta sequedad y se volvió a disolver en 2 ml de metanol al 100%, se agitó vorticialmente durante 2-3 min y se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante se evaporó y el extracto se volvió a disolver en el mismo volumen de ácido acético al 0,2% para el análisis en HPLC o en 200 µl de tampón fosfato (PBS) para la evaluación de las propiedades antioxidantes. Las muestras se filtraron a través de filtros de jeringa de tamaño de poro de 0,2 µm (VWR International, Milán, Italia) antes de someterse a análisis de HPLC o al ensayo de las propiedades antioxidantes (véase a continuación).

Los MAA de algas Klamath tienen un máximo de absorción de 334 nm. La purificación adicional de MAA se realizó usando un sistema de HPLC (Jasco Corporation, Tokio, Japón) equipado con una columna y guarda Alltima C18 (4,6 x 250 nm, d.i., envase 5 µm, Alltech, Milán, Italia), de acuerdo con la bibliografía (30). La longitud de onda para la detección era de 330 nm; la fase móvil era de ácido acético al 0,2% a un caudal de 1,0 ml min⁻¹. La identificación de MAA se realizó por comparación de los espectros de absorción y de los tiempos de retención con patrones tales como *Porphyrina* y *Pterocladia* sp., que contienen principalmente Porphyrina-334, shinorina y palitina, suministrados por cortesía del Dr Manfred Klisch, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen, Alemania. Se midieron los espectros de absorción de las muestras de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro de un solo haz (DU 640, Beckman, Palo Alto, Estados Unidos). Los espectros brutos se transfirieron a un ordenador y se trataron matemáticamente para los análisis de picos de MAA.

Los MAA se purificaron parcialmente a partir de la muestra de AFA y del extracto acuoso como se ha descrito anteriormente. La extracción de muestras con metanol al 20% a 45°C durante 2,5 h dio como resultado un pico prominente a 334 nm (MAA); incluso si se extrajeron también pequeñas cantidades de pigmentos fotosintéticos (tales como ficocianina a 620 nm) con este procedimiento (véase la Figura 1, línea discontinua). Las muestras de MAA se trataron adicionalmente con metanol al 100% para eliminar proteínas y sales y, por último, con ácido acético al 0,2% para eliminar pigmentos fotosintéticos no polares. Los MAA parcialmente purificados resultantes tenían un máximo de absorción a 334 nm (Figura 1, línea continua).

El análisis y purificación adicional de MAA se realizó por HPLC con el fin de descubrir si los compuestos que absorbían a 334 nm eran un solo MAA o una mezcla de más de un MAA. El cromatograma de la muestra (Figura 2) muestra la presencia de dos MAA con tiempos de retención de 4,2 (pico 1) y 7,6 min (pico 2) que se identificaron como shinorina y Porphyrina-334, respectivamente. La Porphyrina-334 parece ser el MAA principal en AFA puesto que la shinorina estaba presente sólo en pequeñas cantidades (proporción de área de picos 1:15).

Los espectros UV de los MAA purificados confirmaron su máximo de absorción a 334 nm (Figura 3).

Teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción molar a 334 nm para shinorina y Porphyrina-334 son de 44700 y 43200 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, los presentes inventores calcularon:

- a) para algas AFA, concentraciones de 0,49 mg g⁻¹ DW para shinorina y 7,09 mg g⁻¹ DW para Porphyrina-334; siendo por tanto el contenido de MAA total igual al 0,76% de algal DW;
- b) para el Extracto Básico, concentraciones de 17-21 mg de MAA (es decir, 1,7-2,1% DW).

Estos son datos significativos, ya que el AFA completo contiene niveles constitutivos elevados de MAA (0,76% DW), próximos a la concentración máxima encontrada bajo exposición a UV, es decir, del 0,84% (31). Además, los presentes inventores descubrieron que el extracto tiene una concentración mayor que las algas completas, alcanzando niveles que son mucho mayores que la concentración máxima potencial.

Los MAA (shinorina y Porphyrina-334) son moléculas estructuralmente simples con un peso molecular de 300. Esto permite que estas moléculas solubles en agua atraviesen fácilmente la barrera hematoencefálica, confirmando su capacidad para expresar su potencial inhibidor de la MAO-B en el área en el que es más necesario, el cerebro.

Ficocianinas

Las ficocianinas están presentes en el extracto a una concentración del 8-10% (para la cuantificación, véase a continuación). Las ficocianinas son los pigmentos azules típicos de todas las cianobacterias o algas azul-verdes, aunque con características peculiares para cada microalga específica. (32) En relación con las propiedades funcionales y terapéuticas de las ficocianinas, las investigaciones se han centrado principalmente hasta ahora en las de la microalga Spirulina. Las ficocianinas purificadas a partir de Spirulina han demostrado poseer propiedades antioxidantes (33) y antiinflamatorias (34, 35, 36) sobre sistemas fisiológicos diferentes tales como el hígado (37), el sistema respiratorio (39) y el cerebro (39, 40). Dichas propiedades de las PC purificadas a partir de Spirulina pueden atribuirse en general también a las ficocianinas de otras algas, dada su similitud sustancial. No obstante, pueden existir diferencias específicas de especie en las diferentes ficocianinas de diferentes microalgas que pueden conducir a una potencia diferente en la explicación de las propiedades funcionales y terapéuticas descritas anteriormente.

Determinación estructural y características específicas de los ficobilisomas de algas Klamath

Hablando en general, en las células cianobacterianas intactas están presentes ficocianinas (PC) en el interior del ficobilisoma en la forma funcional ($\alpha\beta$)₆ (41). Después de la rotura de la célula, la proteína puede encontrarse en diferentes estados de agregación (monómeros, dímeros, trímeros, hexámeros) de acuerdo con el organismo analizado. En el caso de algas Klamath, el análisis electroforético de las PC, tanto contenidas en el extracto como purificadas a partir del propio extracto, ha demostrado que la proteína se encuentra en su mayor parte en su forma trimérica ($\alpha\beta$)₃, con un peso molecular total de 121000. Un monómero $\alpha\beta$ pesa aproximadamente 40000 (18500 subunidad α + 21900 subunidad β). La mayoría de los estudios sobre las FC purificadas a partir de Spirulina nos cuentan en su lugar que la proteína se encuentra en la Spirulina en la forma monomérica $\alpha\beta$ con un peso molecular de aproximadamente 37500, mostrando de este modo un estado de agregación diferente respecto a la PC purificada a partir de AFA.

El análisis cromatográfico de los ficobilisomas de AFA también ha demostrado que, como en otras especies cianobacterianas, la subunidad α de la PC se une a un grupo prostético, mientras que la subunidad β se une a dos. El grupo prostético o cromóforo se denomina ficocianobilina (PCB) y es responsable tanto del color azul de la proteína como de su poder antioxidante (42).

Una diferencia fundamental entre la AFA y la Spirulina reside en la estructura diferente del ficobilisoma. Al contrario que la Spirulina, el ficobilisoma de AFA Klamath no contiene el pigmento alo-ficocianina, sino sólo el pigmento c-ficocianina unido a un componente estructural que está ausente en la Spirulina, en concreto ficoeritrocianina (PEC). La FEC es un pigmento fotosintético que hasta el día de hoy se ha identificado solamente en un número limitado de especies cianobacterianas (43). La PEC tiene una estructura química muy similar a la de la FC, estando compuesta por las dos subunidades α y β que se asocian para formar monómeros y trímeros. No obstante, aunque cada monómero de PC se une a 3 moléculas de PCB, la PEC posee la característica única de unir dos moléculas de PCB a la subunidad β y una molécula de ficoviolobilina (PVB) a la subunidad α , que es responsable del color púrpura del pigmento.

Esta es absolutamente la primera vez que el ficobilisoma de algas Klamath se define como peculiarmente constituido por la unión de c-ficocianina y ficoeritrocianina, y esta estructura cualitativa diferente del ficobilisoma de algas AFA

Klamath añade un factor decisivo adicional que distingue AFA de Spirulina.

La Figura 4 confirma lo que se ha dicho, comparando los componentes del lisado celular de AFA con los de otra cianobacteria bien conocida, *Synechocystis* PCC 6803. En ambas cianobacterias es posible ver la banda azul que representa el ficobilisoma, pero en algas AFA el ficobilisoma presenta una menor masa molecular, confirmando que, al contrario que las microalgas comunes tales como Spirulina, en el ficobilisoma de AFA solamente están presentes ficocianinas, pero no alo-ficocianinas. Además, la Figura muestra que en AFA también está presente una banda púrpura claro (mostrada mediante la flecha) que es típica de las ficoceritrocianinas, proporcionando de este modo su presencia en el ficobilisoma de algas Klamath.

Para profundizar en la definición, cada banda azul se ha analizado adicionalmente a través de HPLC conectada a un espectrómetro de masas (RP-HPLC-IEN-EM). Gracias a los diferentes tiempos de retención, las proteínas del ficobilisoma se han separado e identificado basándose en su masa molecular. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes. En primer lugar, los presentes inventores observan que mientras que en *Synechocystis* (Tabla 1) está presente tanto ficocianina (cpcA a 28,2 min y cpcB a 28,9 min) como aloficocianina (apcA a 30,7 min y apcB a 31,2 min), en AFA (Tabla 2) sólo está presente ficocianina (cpcA a 28,8 min y cpcB a 30,0 min). En segundo lugar, en AFA se ha identificado una proteína con una masa molecular de 19469 que no está presente en *Synechocystis* y que corresponde a la subunidad beta de la ficoeritrocianina con dos bilinas unidas (pecB a 25,0 min).

TABLA 1: proteínas presentes en el ficobilisoma de *Synechocystis*

Tiempo de retención (min)	Masa molecular medida	Masa molecular esperada	Proteína [organismo homólogo]	Número de acceso del NCBI
14,5	9322	9322	cpcD	gi 6329820
22,6	32505	32520	CpcC	gi 6329821
	32388	30797	cpcC	gi 6329822
24,6	28770	27392	cpcG	gi 16329710
24,8	28885	28522	cpcG	gi 16332194
28,2	18173	17586	cpcA (sub α ficocianina)	gi 2493297
28,9	19313	18126	cpcB (sub β ficocianina)	gi 2493300
30,7	17866	17280	apcA (sub α aloficocianina)	gi 266765
31,2	17816	17215	apcB (sub β aloficocianina)	gi 266766

TABLA 2: proteínas presentes en el ficobilisoma de algas AFA Klamath

Tiempo de retención (min)	Masa molecular medida	Masa molecular esperada	Proteína [organismo homólogo]	Número de acceso del NCBI
15,2	9031	8925	proteína hipotética Avar03000795 [Anabaena variabilis ATCC 29413]	gi 45510540
		8895	cpcD [Nostoc sp. PCC 7120]	gi 131740
25,0	19469	18284	pecB: cadena beta de ficoeritrocianina [Nostoc sp. PCC 7120]	gi 548504
	19308	18370	proteína hipotética Avar03000787 (pecB) [Anabaena variabilis ATCC 29413]	gi 45510532
26,4	31044	32078	cpcC [Nostoc sp. PCC 7120]	gi 20141679
		32219	proteína hipotética Avar03000794 (engarce tipo varilla Pm 32000) [Anabaena variabilis ATCC 29413]	gi 45510539
		31295	pecC [Nostoc sp. PCC 7120]	gi 464511

(continuación)

Tiempo de retención (min)	Masa molecular medida	Masa molecular esperada	Proteína [organismo homólogo]	Número de acceso del NCBI
	30124	31304 29333	proteína hipotética Avar03000789 (pecC) [Anabaena variabilis ATCC 29413] proteína hipotética Avar03000801 (cpcG4) [Anabaena variabilis ATCC 29413]	gi 145510534 gi 46135436
26,8	26119	28637	proteína hipotética Avar03000799 (cpcG2) [Anabaena variabilis ATCC 29413]	gi 45510544
27,8	10994	10986	fdxH2: ferredoxina vegetativa [Anabaena variabilis]	gi 1169673
28,8	17714	17457	cpcA [Nostoc sp, PCC 7120]	gi 9957319
30,0	19222	18332	cpcB [Nostoc sp, PCC 7120]	gi 38894

Esta estructura única es un elemento importante para explicar la más intensa acción antioxidante y antiinflamatoria de la AFA-PC completa respecto a su PCB. Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias se vuelven relevantes en este contexto en la medida en que generan una fuerte neuroprotección; la PC completa es más potente que su PCB también en los términos de la neuroprotección, lo que claramente indica que el otro componente activo aparte de PCB en el ficobilisoma, en concreto la PEC con su cromóforo PVB específico, es muy probablemente el principio potenciador de la salud más activo en la AFA-PC. Que la AFA-PC purificada contiene de hecho no sólo la C-PC con su cromóforo PCB, sino también la PEC y su cromóforo PVB, es evidente al mirar la espectrometría del extracto resultante de la purificación (Figura 5). De hecho, el máximo de absorción de C-PC es de 620 nm, que en la espectrometría de la Figura 5 representa la parte superior del pico. Pero se sabe que el máximo de absorción de la PEC es de 566 nm para la subunidad α (ficoviolobilina o PVB) y de 593 nm y 639 nm respectivamente para las dos PCB de la subunidad β . Los tres valores están de hecho incluidos en el pico en forma de campana que constituye el perfil espectrométrico de la PC purificada. Teniendo en cuenta el fuerte enlace, muy difícil de romper, entre C-PC y PEC en algas AFA, esto confirma que aparte de la C-PC, también la PEC es necesariamente parte del extracto de PC purificada. Esto a su vez significa que la PC de AFA es significativamente diferente, tanto estructuralmente como funcionalmente, de las PC de otras cianobacterias, incluyendo la de Spirulina, sobre la que se han realizado más estudios; y que esta diferente consiste en tener solamente una parte en común, en concreto C-PC, pero no la otra; con la consecuencia de que, aunque las propiedades de la C-PC también pueden atribuirse al componente de C-PC de la AFA-PC, las propiedades de la PC completa de AFA, siendo un complejo de C-PC/PEC (incluyendo sus cromóforos PCB y PVB), son exclusivamente atribuibles a la misma (así como a cualquier complejo de C-PC/PEC presente en cualquier otra microalga).

Metodologías de purificación (Figura 5)

La PC se purificó a partir del extracto seco de AFA de la forma siguiente:

- suspender 500 mg de extracto en 50 ml de tampón Na-fosfato 100 mM pH 7,4;
- centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4°C;
- reunir el sobrenadante y añadir sulfato de amonio sólido a una saturación del 50%;
- precipitar las proteínas durante 60 min a 4°C mientras se mantiene la muestra en agitación;
- centrifugar a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C;
- desechar el sobrenadante incoloro transparente y resuspender el precipitado azul en un volumen pequeño de tampón Na-fosfato 5 mM pH 7,4;
- dializar durante una noche a 4°C contra el mismo tampón;
- poner la PC dializada en una columna de hidroxapatita equilibrada con tampón Na-fosfato 5 mM pH 7,4;
- eluir la muestra con tampón Na-fosfato pH 7,0 de fuerza iónica creciente (de 5 a 150 mM);
- reunir las fracciones y leer la absorbancia a 620 nm y 280 nm con el espectrofotómetro;
- combinar las fracciones en las que $Ab_{620}/Ab_{280} > 4$ (índice de PC pura);
- precipitar la PC con sulfato de amonio a una saturación del 50% durante 1 hora a 4°C;
- centrifugar a 10.000 rpm durante 30' a 4°C;
- desechar el sobrenadante y suspender de nuevo la PC en un tampón Na-fosfato 150 mM pH 7,4;
- dializar contra el mismo tampón a 4°C;
- transferir la PC purificada en un matraz y almacenar en la oscuridad a +4°C o -20°C.

Cuantificación de ficocianina

Para medir la concentración molar de PC pura los presentes inventores usaron su coeficiente de extinción molar ϵ a 620 nm, que para la forma trimérica $(\alpha\beta)_3$ es igual a $770000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esto significa que una solución de 1 M de PC a 620 nm tiene un valor de absorción de 770000.

- 5 Para medir la concentración de PC en el extracto los presentes inventores usan el coeficiente de extinción específica $E^{1\%}$ a 620 nm de $70 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esto significa que una solución que contiene el 1% de PC (que es de 1 g/100 ml) a 620 nm absorbe 70. Basándose en estos cálculos, el contenido promedio de PC en el extracto es igual a 80-100 mg/g DW (8-10% DW).

Purificación del cromóforo PCB (Figura 6)

- 10
- Suspender 500 mg de extracto en 50 ml de H₂O destilada.
 - Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4°C.
 - Decantar el sobrenadante azul oscuro y precipitar la PC con ácido tricloroacético al 1%.
 - Incubar durante 1 h en la oscuridad a 4°C al tiempo que se agita.
 - Centrifugar a 10000 rpm durante 30' a 4°C.

15

 - Reunir el sedimento que contiene PC y lavar 3 veces con metanol.
 - Resuspender el sedimento en 10 ml de metanol que contiene 1 mg/ml de HgCl₂.
 - Incubar durante 20 h a 42°C en la oscuridad para liberar la PCB de la PC.
 - Centrifugar a 2500 rpm durante 10' para eliminar las proteínas.
 - Añadir al sobrenadante que contiene PCB β -mercaptoetanol (1 $\mu\text{l/ml}$) para precipitar el HgCl₂.

20

 - Incubar a -20°C durante 24 h.
 - Centrifugar a 10000 rpm durante 30' a 4°C para eliminar el precipitado blanco.
 - Añadir al sobrenadante 10 ml de cloruro de metileno/butanol (2:1, v/v).
 - Lavar con 20 ml de H₂O destilada y centrifugar a 3000 rpm durante 10'.
 - Eliminar la fase superior, recoger la parte inferior que contiene PCB.

25

 - Lavar la PCB en 15 ml de H₂O 3 veces.
 - Secar bajo nitrógeno y almacenar a -20°C.

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA MAO-B POR EXTRACTO DE AFA KLAMATH Y POR SUS PRINCIPIOS ACTIVOS CONSTITUTIVOS FITOCROMO, FICOCIANINA Y MAA

- Los presentes inventores han ensayado la actividad inhibidora de la MAO-B del Extracto Básico usando el sustrato específico bencilamina (1 mM). El ensayo se realizó mediante un espectrofotómetro a 30°C con una longitud de onda de 250 nm, por preincubación de la MAO-B (2 $\mu\text{g/ml}$) con diferentes concentraciones de los componentes solubles en agua y solubles en lípidos del extracto básico, según se produjeron mediante las etapas a) a c) descritas anteriormente (concentración inicial 10 mg/ml). El extracto enriquecido en componente soluble en agua se ha preparado por resuspensión del extracto acuoso en agua y recogida del sobrenadante después de la centrifugación.
- 30
- 35 El extracto soluble enriquecido en componente lipófilo se ha obtenido por resuspensión del extracto en acetona; después de eso el sobrenadante se ha secado y el sedimento se ha resuspendido en DMSO, un disolvente compatible con la dosificación de MAO-B.

- Como se muestra en la Figura 7A, la fracción soluble en agua inhibe la MAO-B de una forma dependiente de la dosis, mientras que la fracción lipófila no inhibe la enzima. La fracción soluble en agua del Extracto Básico de AFA es un inhibidor selectivo potente de la MAO-B, con una CI_{50} de 6,9 μl . Su selectividad de MAO-B es de 4 ($CI_{50} \text{ MAO-B}/CI_{50} \text{ MAO-A} > 4,05$) (Figura 7B).
- 40

- La representación de Lineweaver-Burk en la Figura 8 muestra que dicha inhibición es reversible y de un tipo mixto en relación con la competición, con una disminución en la $V_{\text{máx}}$ y un aumento de la constante de Michaelis-Menten K_m . Por representación de la pendiente frente a la concentración de la fracción hidrosoluble del extracto de AFA se obtiene una constante de inhibición K_i de 1 μl . En comparación con la fracción hidrosoluble del Extracto Básico, este bajo valor de K_i indica una gran afinidad por la enzima MAO-B.
- 45

- El hecho de que la inhibición del extracto sea reversible significa que realiza una actividad fisiológica plausiblemente desprovista de efectos secundarios. En relación con la competición mixta, muy probablemente se debe a la naturaleza compleja del extracto, incluyendo diferentes moléculas funcionales, algunas competitivas y otras no competitivas. Los componentes activos principales del extracto son el fitocromo de AFA (0,5% DW); ficocianinas (8-10% DW); y los MAA o aminoácidos tipo micosporina (1,7-2,1% DW), que los presentes inventores han ensayado individualmente como inhibidores de la MAO-B.
- 50

Inhibición de MAO-B por ficocianinas

- El ensayo se ha realizado a través de un espectrofotómetro a 30°C con una longitud de onda de 250 nm, usando bencilamina como sustrato, por preincubación de la MAO-B con diversas concentraciones de PC purificada a partir de AFA (0,5-4 μM). Como se muestra en la Figura 9, la AFA-PC causa una disminución dependiente de la dosis de
- 55

la actividad de MAO-B, con una CI_{50} de 1,44 μ M. La selectividad de MAO-B de la AFA-PC es superior a 3,5 ($CI_{50}MAO-B/CI_{50}MAO-A > 3,5$).

La representación de Lineweaver-Burk en la Figura 10 muestra que, como con el extracto, la inhibición es reversible y de un tipo mixto (competitiva y no competitiva) con modificación tanto de la $V_{m\acute{a}x}$ como de la K_m .

- 5 Por representación de la pendiente frente a la concentración de PC los presentes inventores obtienen el valor de la constante de inhibición K_i , que en el presente documento es de 1,06 μ M. La constante de inhibición mide la afinidad del inhibidor por la enzima: una alta K_i indica una baja afinidad por la enzima y viceversa. En este caso, el bajo valor de K_i indica una alta afinidad de AFA PC hacia MAO-B.

Inhibición de MAO-B por MAA

- 10 La actividad de la MAO-B sobre un sustrato de bencilamina se ha evaluado en relación con concentraciones crecientes de MAA (0,5-8 μ M), previamente purificadas a partir del Extracto Básico con metanol al 20%. La Figura 11 muestra la inhibición de la MAO-B dependiente de la dosis por MAA, con una CI_{50} de 1,98 μ M. La selectividad de MAO-B de los MAA es superior a 2 ($CI_{50}MAO-B/CI_{50}MAO-A > 2,02$).

- 15 La representación de Lineweaver-Burk (Figura 12) muestra que la inhibición es tanto reversible como competitiva, con un aumento de la K_m pero sin variación de la $V_{m\acute{a}x}$. Esto significa que los MAA, gracias a su estructura química, compiten por el sustrato por la unión al sitio activo de la enzima. Por representación de la pendiente frente a la concentración de MAA (Figura 13) los presentes inventores obtienen el valor de la constante de inhibición K_i , que es de 0,585 μ M, que demuestra un grado muy elevado de afinidad por la enzima.

Inhibición de la MAO-B por fitocromo de AFA

- 20 El ensayo se ha realizado a través de un espectrofotómetro a 30°C con una longitud de onda de 250 nm, usando bencilamina como sustrato, por preincubación de la MAO-B con diversas concentraciones de fitocromo de AFA purificado (8,3-66,4 nM). Como se muestra en la Figura 15, el fitocromo de AFA causa una disminución dependiente de la dosis de la actividad de la MAO-B, con una CI_{50} tan baja como de 20,2 nM.

- 25 La representación de Lineweaver-Burk en la Figura 16 muestra que, como con el extracto, la inhibición es reversible de un tipo mixto (competitiva y no competitiva) con modificación tanto de la $V_{m\acute{a}x}$ como de la K_m .

Por representación de la pendiente frente a la concentración de fitocromo de AFA los presentes inventores obtienen el valor de la constante de inhibición K_i , que aquí es de 10,48 nM. La constante de inhibición mide la afinidad del inhibidor por la enzima: una alta K_i indica una baja afinidad por la enzima y viceversa. En este caso, el valor de K_i extremadamente reducido indica una afinidad muy elevada del fitocromo de AFA hacia la MAO-B.

- 30 La acción competitiva y reversible de los MAA hace que estas moléculas sean muy potentes en la inhibición de la MAO-B. De hecho, el carácter competitivo y reversible de la inhibición de la MAO-B asegura al mismo tiempo una elevada eficacia y una actividad fisiológica y sin efectos secundarios. En este sentido, los MAA contenidos en el extracto, también debido a su peso molecular y a su consiguiente capacidad para atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, constituyen un componente decisivo, incluso *in vivo*, para generar los efectos terapéuticos derivados de la inhibición de la MAO-B.

- 35 Aún más que los MAA, el fitocromo ha demostrado ser el inhibidor de la MAO-B más potente de todas las sustancias conocidas hasta la fecha. Su afinidad muy elevada por la enzima MAO-B y su inhibición eficaz a dosificaciones de pocos nanomolares hacen que esta molécula no sólo sea un agente terapéutico perfecto por sí misma, sino el factor que parece proporcionar la contribución más importante a la alta eficacia neurológica del extracto o extractos de AFA.

- 40 Debería añadirse que algunas de las consideraciones en relación con los MAA y el fitocromo también pueden aplicarse al comportamiento *in vivo* de las ficocianinas. Se sabe que las PC generan efectos neuroprotectores en el cerebro *in vivo* y, por tanto, que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. (44) Esto significa que también son capaces de realizar *in vivo* su actividad inhibidora de la MAO-B en el cerebro. El peso molecular del cromóforo es de hecho de sólo 700, que no es mucho más que el peso molecular de los MAA. Esto mismo también es cierto para el cromóforo del fitocromo, la fitocromobilina, estructuralmente similar a la ficocianobilina.

- 45 En conclusión, la actividad de inhibición de la MAO-B en la parte de extracto y sus componentes activos, fitocromo de AFA, AFA-PC y MAA, es extremadamente relevante, ya que tanto las moléculas como el extracto se ponen de por sí al nivel más alto de actividad, igual o superior al de las sustancias farmacológicas, y enormemente superior a cualquier molécula natural ensayada, como se muestra en la tabla siguiente (45):

50

Tabla 3: Parámetros cinéticos comparativos (IC_{50} y K_i) de la inhibición de la MAO-B a partir de inhibidores naturales y sintéticos conocidos.

Inhibidores de la MAO-B	IC_{50}	K_i	Tipo de inhibición
Deprenilo	0,31 μ M	0,002 μ M	Irreversible
Epicatequina	58,9 μ M	21 μ M	Mixta
Catequina	88,6 μ M	74 μ M	Mixta
Alcaloide no Harman	6,47 μ M	1,12 μ M	Mixta
Piperina	91,3 μ M	79,9 μ M	Competitiva
Paeonol	42,5 μ M	38,2 μ M	Competitiva
Emodina	35,4 μ M	15,1 μ M	Mixta
<i>Ficocianina de AFA</i>	<i>1,44 μM</i>	<i>1,06 μM</i>	<i>Mixta</i>
<i>MAA de AFA</i>	<i>1,98 μM</i>	<i>0,585 μM</i>	<i>Competitiva</i>
<i>Fitocromo de AFA</i>	<i>0,02 μM</i>	<i>0,010 μM</i>	<i>Mixta</i>

Como se muestra mediante la tabla, sólo las ficocianinas y los MAA tienen una IC_{50} ligeramente superior a 1 μ M, por lo tanto muy próxima a la del Deprenilo (0,31 μ M) y diez veces inferior a la IC_{50} de las otras moléculas consideradas. Por otro lado, el fitocromo de AFA tiene una IC_{50} 15 veces inferior que la del Deprenilo. Esto mismo es cierto para la constante de inhibición K_i que mide la afinidad del inhibidor por la enzima. Las ficocianinas de AFA tienen una K_i de aproximadamente 1 μ M, como los alcaloides no Harman del café y del tabaco (pero por supuesto sin ninguno de los problemas asociados con esas dos sustancias). Por otro lado, los MAA y el fitocromo de AFA son las únicas moléculas junto con el Deprenilo que tienen una K_i inferior a 1 μ M, y por tanto una afinidad muy elevada por la MAO-B. De hecho, el fitocromo de AFA es la única molécula natural aparte de selegilina/Deprenilo cuya K_i está en el orden de unos pocos nanomolares. Y sin embargo hay una diferencia esencial entre la selegilina/Deprenilo y las moléculas del extracto de AFA: el primero es un inhibidor irreversible, caracterizado por tanto por efectos secundarios potenciales; mientras que las moléculas inhibitoras de MAO-B de AFA Klamath son todas reversibles, caracterizadas por una actividad fisiológica desprovista de los problemas asociados con las moléculas sintéticas.

La Figura 14 muestra gráficamente la actividad inhibitora de la MAO-B de las tres moléculas de AFA en relación con el Deprenilo. Dada la sinergia de las tres moléculas en el Extracto Básico (y otros extractos de AFA), la actividad inhibitora de la MAO-B global del Extracto Básico resulta ser muy elevada. Algo que se vuelve particularmente relevante considerando también la alta cantidad de PEA presente en el mismo. Si se compara el extracto básico con el deprenilo en base a su contenido de PC, se obtiene que el Extracto Básico alcanza la IC_{50} a una dosificación de PC tan reducida como de 0,05 μ M, que indicaría una potencia 7,5 veces superior al Deprenilo (y decenas de veces superior a las sustancias naturales). Esto tiene sentido a la luz de la potencia del fitocromo contenido en el Extracto Básico: de hecho, 7,5 veces es un promedio entre la potencia inhibitora de la PC y los MAA, que es ligeramente inferior al Deprenilo, y la del fitocromo, que es 15 veces superior (Figura 17). Esto también muestra que la mayor potencia del extracto respecto a la AFA-PC purificada es en su mayor parte debida al fitocromo.

Además, el extracto todavía mantiene la ventaja de ser una sustancia natural que actúa fisiológicamente, cuya inhibición de la MAO-B es reversible y principalmente competitiva, por tanto desprovista de los efectos secundarios potencialmente asociados con moléculas irreversibles tales como Deprenilo y otras sustancias sintéticas (46).

La ventaja adicional del extracto es su alto contenido de feniletilamina, un neuromodulador dopaminérgico potente que funciona en sinergia total con otras moléculas, una actividad sinérgica que por lo tanto los presentes inventores pueden resumir:

- La feniletilamina o PEA tiene una actividad dopaminérgica de dos veces, tanto porque estimula la liberación de dopamina a partir del tejido nigroestriado como porque inhibe la recaptación post-sináptica de la propia dopamina;
- El fitocromo, los MAA y las ficocianinas, como potentes inhibidores de la MAO-B, también aumentan la transmisión dopaminérgica en la medida en que una actividad reducida de MAO-B implica una vida más prolongada de las neuroaminas, incluyendo la dopamina;
- El fitocromo, los MAA y las ficocianinas como inhibidores de la MAO-B, también prolongan la vida y actividad de la feniletilamina que es de por sí el objeto de la actividad de desaminación de la enzima MAO-B, con la creación consiguiente de un círculo virtuoso de soporte adicional a la transmisión y actividad

- dopaminérgica y a la neuromodulación más general producida por PEA.
- Por último, la potente actividad antioxidante y antiinflamatoria de las ficocianinas, junto con su capacidad o la capacidad de su cromóforo para atravesar la barrera hematoencefálica; así como la actividad antioxidante extremadamente elevada del fitocromo y la menos fuerte pero todavía significativa actividad antioxidante de los MAA, generan una neuroprotección que protege a las diferentes moléculas activas y más en general al ciclo virtuoso neurológico que crean, de cualquier daño oxidativo e inflamatorio.

NEUROPROTECCIÓN

Los presentes inventores han ensayado las propiedades neuroprotectoras del extracto de AFA, la AFA-PC específica y su cromóforo PCB, así como los MAA contra el efecto neurotóxico del glutamato.

- 10 El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central de mamíferos pero la sobreestimulación de su receptor de subtipo NMDA en neuronas desencadena una acumulación intracelular masiva de Ca^{2+} , conduciendo a la muerte celular. Además de la acumulación de Ca^{2+} intramitocondrial, después de la estimulación del receptor de NMDA, los aumentos transitorios en el Ca^{2+} citosólico libre activan la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (NOS) (49), una enzima que forma óxido nítrico (NO) o, principalmente en neuronas primarias, su producto reacción de superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peroxinitrito (ONOO⁻).

- 15 La exposición de neuronas a glutamato se llevó a acabo de acuerdo con un procedimiento ligeramente modificado (50): se eliminó el medio de cultivo y las neuronas se lavaron una vez con solución de Hanks tamponada precalentada a 37°C (KCl 5,26 mM, $KH_2H_2PO_4$ 0,43 mM, NaCl 132,4 mM, $NaHCO_3$ 4,09 mM, Na_2HPO_4 0,33 mM, glucosa 20 mM, $CaCl_2$ 2 mM y HEPES 20 mM, pH 7,4) y se preincubaron en ausencia o presencia de varias concentraciones de extracto de AFA (1-50 nM), PC (10-1000 nM) y MAA (1-10 μ M) en solución de Hanks tamponada precalentada a 37°C. Después de 30 min de preincubación, se añadió L-glutamato a partir de soluciones concentradas a la concentración final indicada de 100 μ M más glicina 10 μ M. Las neuronas se incubaron a 37°C durante 15 min, el tampón se aspiró, se sustituyó con DMEM y las células se incubaron a 37°C durante 24 h adicionales en ausencia de efectores.

- 25 La apoptosis se evaluó por tinción de los núcleos de células con DAPI (50), un colorante fluorescente permeable a membrana que se une al ADN y permite la cuantificación de las neuronas apoptóticas, es decir, las neuronas que presentan núcleos fragmentados o condensados. En resumen, 24 h después de la exposición a glutamato, los cultivos neuronales se lavaron con PBS caliente (37°C) y se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/vol) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavarse con PBS, las células se expusieron a DAPI 3 μ M durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se lavaron después dos veces con PBS. Las células se puntuaron para determinar la condensación de cromatina por microscopía de fluorescencia, usando un filtro de fluoresceína (excitación 330-380; 30X aumentos). Se contaron los núcleos totales y apoptóticos. En todos los casos, se contaron aproximadamente 600-1.000 células por pocillo por un operario que desconocía el diseño del protocolo. Se realizaron mediciones de cultivos individuales por duplicado y los resultados se expresan como los valores medios con E.T.M. para el número de preparaciones de cultivo indicadas. El análisis estadístico de los resultados se determinó por ensayo de Kruskal-Wallis seguido por el ensayo multirango de diferencia mínima significativa. En todos los casos, $p < 0,05$ se consideró significativa.

- 40 Mediante este ensayo de daños por glutamato los presentes inventores han demostrado por primera vez la capacidad neuroprotectora del Extracto Básico de AFA, AFA-PC, su PCB y MAA. Como se muestra mediante la Figura 18, la adición de glutamato a las células neuronales cultivadas ha aumentado el nivel de apoptosis hasta un porcentaje del $22,9\% \pm 3$ $n = 4$ ($p < 0,05$); mientras que la adición simultánea del Extracto Básico de AFA ha generado una protección muy elevada contra la toxicidad del glutamato, disminuyendo el nivel de apoptosis por debajo del nivel de control de ($6,3\% \pm 1$ $p > 0,05$) ya con una cantidad de extracto tan baja como de 1 nM (los resultados son medias \pm ETM de 3 a 8 cultivos celulares diferentes. # Significativamente diferente en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$); * Significativamente diferente en comparación con el control de glutamato ($p < 0,05$). En relación con la protección proporcionada por los MAA, también disminuyen el nivel de apoptosis por debajo del nivel de control, siendo los resultados de la mayor dosificación de 1 μ M (Figura 19) medias \pm ETM de 3 a 8 cultivos celulares diferentes. # Significativamente diferente en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$); * Significativamente diferente en comparación con el control de glutamato ($p < 0,05$). En la relación con la AFA-PC y PCB, los presentes inventores observan que su inhibición de la apoptosis es muy similar; su adición al cultivo celular disminuye el grado de apoptosis por debajo del control con una dosificación de aproximadamente 10 nM (Figuras 20 y 21 —los resultados son las medias \pm ETM de 3 a 8 cultivos celulares diferentes. # Significativamente diferente en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$); * Significativamente diferente en comparación con el control de glutamato ($p < 0,05$).

- 55 El grado de inhibición de AFA-PC es aproximadamente igual al de PCB. Esto es algo sorprendente dado que la PCB, supuestamente su principio más activo, una vez purificada y por tanto más concentrada, debería ser significativamente más fuerte que la molécula completa de la cual es el componente activo. El hecho de que tenga prácticamente la misma potencia significa que en la PC completa hay otros factores que pueden ser en realidad incluso más potentes que la propia PCB. Se sabe que la PC completa está compuesta, aparte de C-PC y su cromóforo PCB, de PEC, que incluye como sus cromóforos tanto PCB como PVB (ficoviolobilina). Por lo tanto, en el

presente documento los presentes inventores pueden asumir que el factor que crea una diferencia significativa en la potencia entre la PCB purificada y la PC completa es precisamente el componente PEC, particularmente su cromóforo PVB, que se asume que es un antioxidante muy intenso.

5 En términos de neuroprotección, los MAA parecen desempeñar un papel, pero significativamente menor que la PC y PCB. Sin embargo, el neuroprotector más potente es claramente el extracto completo de AFA, que es capaz de inhibir completamente la apoptosis celular a solo 1 nM (nanomolar). Esto es 10 veces la potencia de la PC y PCB. Esto puede explicarse seguramente con la sinergia de muchos factores antioxidantes diferentes presentes en el extracto completo de AFA; sin embargo, puesto que los presentes inventores han observado anteriormente que el fitocromo de AFA es posiblemente el antioxidante más potente hasta la fecha, siendo capaz de inhibir casi
10 completamente la formación de MDA (un subproducto tardío de la peroxidación lipídica) con solo 16 nanomolares, es muy probable que el fitocromo de AFA sea el factor más importante para explicar la mayor potencia del Extracto Básico. Por lo tanto, los presentes inventores pueden concluir que el fitocromo de AFA, así como cualquiera de y todos los fitocromos son importantes agentes neuroprotectores.

BIBLIOGRAFÍA

- 15 1. Zhou G. y col., Platelet monoamine oxidase B and plasma β -phenylethylamine in Parkinson's disease, en J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001; 70: 229-231, 229.
2. Ispida K. y col., β -phenylethylamine stimulates striatal acetylcholine release through activation of the AMPA glutamate-gate pathway, en Biol Pharm Bull/ Sep 2005.; 28(9): 1626-9.
- 20 3. Barroso N., Rodríguez M., Action of β -phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission, en European Journal of Pharmacology, 297 (1996), 195-203, 200.
4. Dyck L. E., Release of monoamines from striatal slices by phenelzine and β -phenylethylamine, en Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1983, 7: 797-800; Philips S.R., Robson A.M., In vivo release of endogenous dopamine from rat caudate nucleus by phenylethylamine, en Neuropharmacology 1983, 22: 1297-1301; Raitieri m., y col., Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine, en Eur J Pharmacol 1977, 41: 133-143.
- 25 5. Janssen P.A.J, y col., Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients?, en International Journal of Neuropsychopharmacology 1999, 2: 229-240, 232.
6. Paterson I.A. y col., 2-phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system?, en Journal of Neurochemistry (1990), 55: 1827-1837.
- 30 7. Sabelli H.C., Javaid I.J., Phenylethylamine Modulation of Affect: Therapeutic and Diagnostic Implications, en Journal of Neuropsychiatry (1995), 7(1): 6-14, 7.
8. Mauro Federici y col., Trace Amines Depress Gabab Response In Dopaminergic Neurons By Inhibiting Girk Channels, en Molecular Pharmacology Fast Forward. Publicado el 11 de enero de 2005 como doi:10.1124/mol.104.007427.
- 35 9. Gusovsky F. y col., A high pressure liquid chromatography method for plasma phenylacetic acid, a putative marker for depressive disorders, en Anal Biochem, 15 feb 1985.; 145(1): 101-5. En este estudio, los pacientes deprimidos tenían un nivel de PAA en el plasma de 327,64 +/- 45,44 ng/ml, frente a 536,18 +/- 54,99 ng/ml del grupo de control. En otro estudio, en la orina de los pacientes deprimidos se encontró un promedio de PAA de 66 +/- 23 mg/colorante frente a los 104 +/-23 mg/colorante de pacientes no deprimidos. Véase Sabelli HC. y col., Urinary phenylacetic acid in panic disorder with and without depression, en Acta Psychiatr Scand Jul 1990; 82(1): 14-6.
- 40 10. Szabo A. y col., Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise?, en Br J Sports Med Oct 2001; 35(5): 342-3.
11. Sabelli H y col., Sustained antidepressant effect of PEA replacement, en J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 8(2): 168-71.
- 45 12. Miura Y., Plasma beta-phenylethylamine in Parkinson's disease, en Kurume Med J 2000; 47(4): 267-72.
13. *Ibidem*.
14. Ebadi M. y col., Neuroprotective actions of selegiline, en J Neurosci Res 1 Feb 2002; 67(3): 285-289.
- 50 15. Kempainen N. y col., Different pattern of reduction of striatal dopamine reuptake sites in Alzheimer's disease and ageing, en J Neural Transm 2001; 108(7): 827-36.
16. Knoll J., (-)Deprenyl (Selegiline): past, present and future, en Neurobiology (Bp) 2000; 8(2): 179-99.
17. Knoll J., The pharmacological basis of the beneficial effects of (-)deprenyl (selegiline) in Parkinson's and Alzheimer's diseases, en J Neural Transm Suppl 1993; 40: 69-91.
- 55 18. Rimbau V., y col., Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, en Neurosci Lett 3 dic 1999; 276(2): 75-8. En este estudio se han usado ficocianinas a partir de la microalga Spirulina. Las ficocianinas de algas Klamath son diferentes y están dotadas con una mayor actividad antioxidante. Véase Benedetti S., Scoglio S., Canestrari F., y col., Antioxydant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga Aphanizomenon Flos Aquae, en Life Sciences, 75 (2004): 2353-2362.
19. Swanson J. y col., Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder, en Curr Opin Neurobiol. Abr 1998; 8(2): 263-71.
- 60 20. Citazione solo di Benedetti y col. LifeScience; o menzione del parallelo brevetto? Attendere l'anno provisional in attesa di effettuare studi sulla neuroprotezione?
21. Kusaga A., Decreased beta-phenylethylamine in urine of children with attention deficit hyperactivity disorder

- and autistic disorder, en *No To Hattatsu* mayo 2002; 34(3): 243-8; Matsuishi T, Yamashita Y., Neurochemical and neurotransmitter studies in patients with learning disabilities, en *No To Hattatsu* mayo 1999; 31 (3): 245-8.
22. Kusaga A. y col., Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD, en *Ann Neurol* sept 2002; 52(3): 372-4.
- 5 23. Jain AK., Y col., Bupropion SR vs. placebo for weight loss in obese patients with depressive symptoms, en *Obes Res.* oct. 2002; 10(10): 1049-56.
24. Rudolph y col., A randomized, placebo-controlled, dose-response trial of venlafaxine hydrochloride in the treatment of major depression, en *J Clin Psychiatry* (1998); 59(3): 116-22.
- 10 25. PEA es una molécula liposoluble bastante sujeta a ser dañada por calor. Esto significa que los métodos de secado usando altas temperaturas, tales como secado por congelación, habitualmente tienen menor concentración de PEA. El mayor contenido de PEA se encuentra en las algas secadas con el procedimiento Refractance Window®. Es a partir de este tipo de algas que se produce el Extracto Básico.
26. Yamada M. y col., Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future, en *Neurotoxicology* 2004; 25: 215-21; Youdim M., y col., Therapeutic Applications of Selective and Non-Selective Inhibitors of Monoamine Oxidase A and B that do not Cause Significant Tyramine Potentiation, en *Neurotoxicology* 2004; 25: 243-50.
- 15 27. Groniger A y col., Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae-a database, en *J Photochem Photobiol B.* nov 2000; 58(2-3): 115-22.
28. Suh HJ y col., Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency, en *Photochem Photobiol. Ag* 2003; 78(2): 109-13.
- 20 29. Groniger A y col., Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae-a database, en *J Photochem Photobiol B.* nov 2000; 58(2-3): 115-22.
30. Sinha RP y col., Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation, en *J Photochem Photobiol B.* Jul 2001; 60(2-3): 129-35.
31. Garcia-Pichel F y col., Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity, en *Appl Environ Microbiol.* En 1993; 59(1): 163-169.
- 25 32. Glazer A.N., Phycobiliproteins, en *Methods Enzymol.* 1988, 167: 291-303.
33. Bhat V.B., y col., C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro, en *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(1): 20-25; Romay, C. y col., Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae, en *Inflamm Res.* En 1998.; 47(1): 36-41.
- 30 34. Reddy C.M., y col., Selective Inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, en *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(3): 599-603.
- 35 35. Gonzales R., y col., Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid induced colitis in rats, en *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 55-9.
36. Gonzales R., y col., Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid induced colitis in rats, en *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 55-9.
37. Vadiraja BB. y col., Hepatoprotective effect of C-phycoerythrin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats, en *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249(2): 4 28-31.
38. Romay C., y col., Phycocyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic induced mouse-ear inflammation test, en *J Pharm Pharmacol.* 1999, 51(5): 641-42. Como è noto, il leucotriene B4 è uno dei fattori principalmente responsabili di patologie respiratorie quali asma e allergie.
- 40 39. Rimbau V., y col., Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, en *Neurosci Lett* 1999, 276(2): 75-8.
40. Rimbau V. y col., C-phycoerythrin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis, en *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364(2): 96-104.
- 45 41. Glazer A.N., Phycobilisomes, en *Methods Enzymol* 1988, 167; 304-312.
42. Hirata T., y col., Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*, en *J Appl Phycol* 2000, 12: 435-439.
43. Fuglistaller P., y col., Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, en *Arch Microbiol* 1981, 129: 268-274.
- 50 44. Rimbau V., y col., Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, en *Neurosci Lett* 1999, 276(2): 75-8.
45. Los datos de esta tabla se extraen de los estudios siguientes: Magyar K. y col., Pharmacological aspects of (-)-deprenyl, en *Curr Med Chem.* Ag 2004, 11 (15): 2017-31; Hou y col., Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*, en *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 216-220; Herraiz T, Chaparro C., Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors, en *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (2005) 378-386; Kong LD y col., Inhibition MAO-A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones, en *Journal of Ethnopharmacology* 91 (2004) 351-355.
- 60 46. Yoshida S. y col., Fluorinated phenylcyclopropylamines. Part 3: Inhibition of monoamine oxidase A and B, en *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 2645-2652.
47. Torres A. y col., Porphyra-334, a potential natural source for UVA protective sunscreens, en *Photochem. Photobiol. Sci.* 5 (2006) 432-435.
48. Hughes J, Lamparter T., Prokaryotes and Phytochrome. The Connection to Chromophores and Signaling, en *Plant Physiology*, Diciembre 1999, Vol. 121, págs. 1059-1068.
- 65 49. Garthwaite y col., Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain, en *Nature.* Nov 1988 24; 336(6197): 385-8.

50. Delgado-Esteban M. y col., D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurone, en J Neurochem. Oct 2000;75(4): 1618-24.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un extracto de la microalga *Aphanizomenon flos-aquae Aquae* Ralfs ex Born. y Flah. Var. *flos-aquae (AFA Klamath)*, en el que el extracto se prepara mediante las etapas siguientes:
- 5 a) congelar el alga AFA recién recogida y descongelarla o, si el material de partida es polvo de AFA seco, sonicar el polvo de AFA diluido en agua para romper las células;
- b) centrifugar el producto de la etapa a) para separar el sobrenadante del precipitado;
- 10 c) recoger el sobrenadante que contiene los componentes solubles en agua para la fabricación de una composición para prevenir, controlar o tratar una de las siguientes enfermedades, afecciones, disfunciones o trastornos neurológicos: enfermedad de Alzheimer, enfermedades de Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), autismo, depresión, déficit de memoria y alteraciones del ánimo.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto contiene los siguientes componentes de la microalga *Aphanizomenon flos-aquae Aquae* Ralfs ex Born. y Flah. Var. *flos-aquae (AFA Klamath)*: complejo de C-ficocianina/ficoeritrocianinas (C-PC/PEC), sus cromóforos separados ficocianobilina (PCB) y ficoviolobilina (PVB), el fitocromo de AFA, aminoácidos de tipo micosporina (MAA) y feniletilamina (PEA).
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto de AFA Klamath se purifica adicionalmente sometiendo dicho sobrenadante a ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración con un límite de peso molecular de 30.000 Daltons.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición es adecuada para su administración a seres humanos.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho extracto se formula con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

FIGURA 1

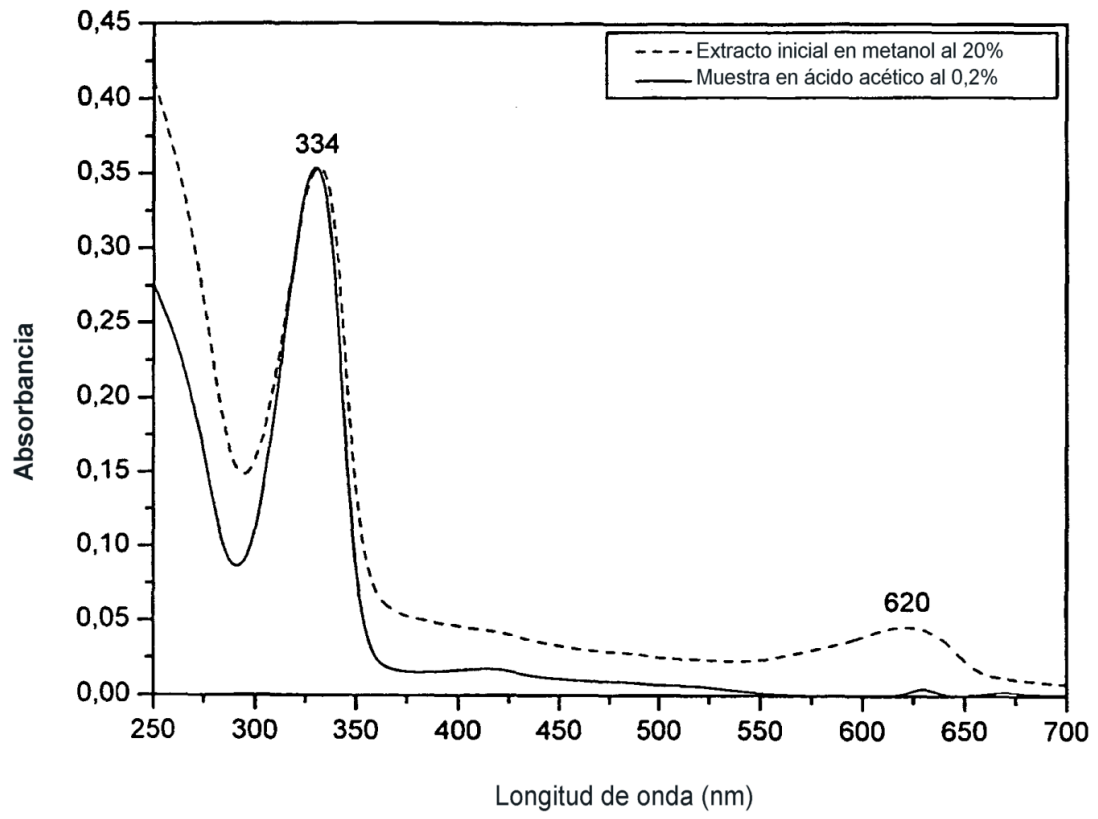


FIGURA 2

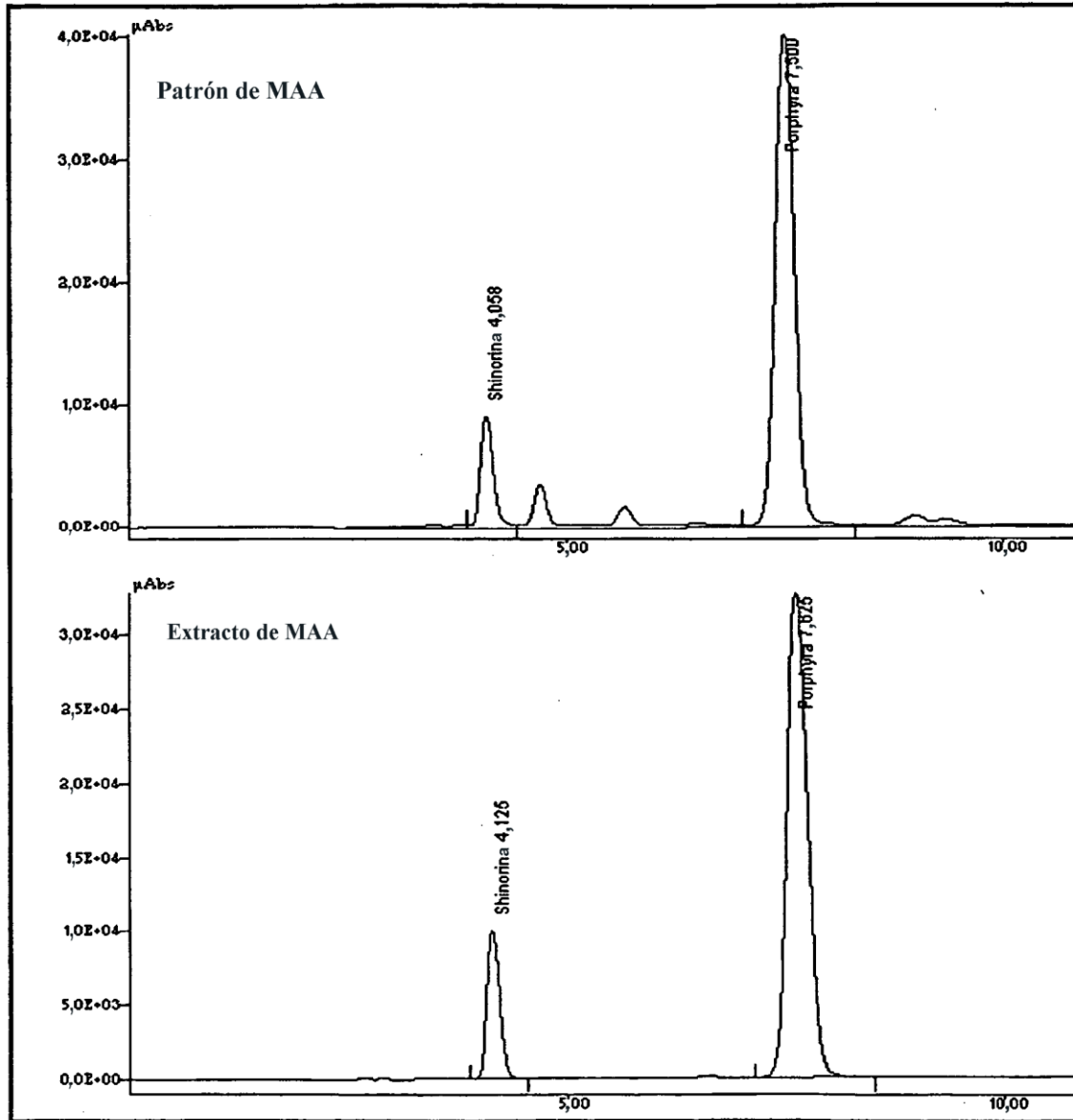


FIGURA 3

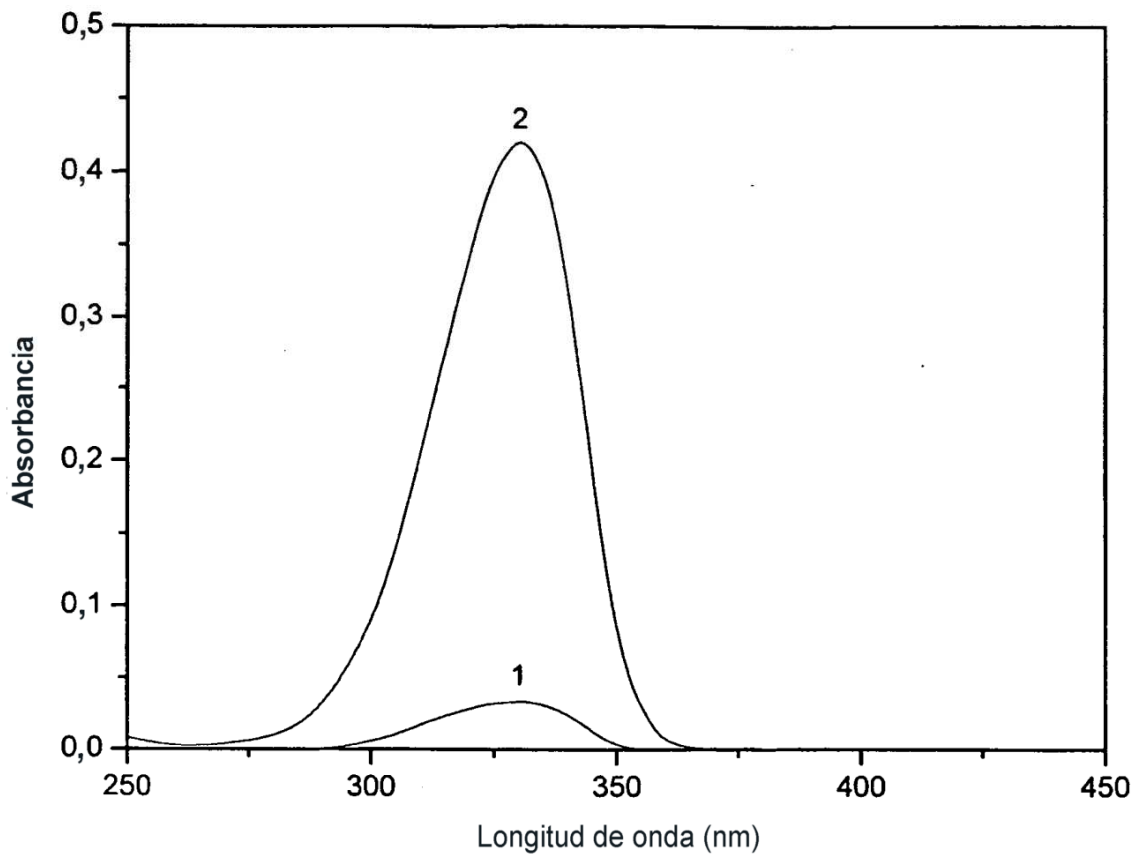
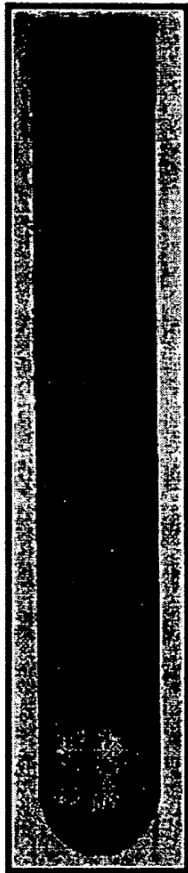


FIGURA 4

SYNECHOCYSTIS
sp. 6803



APHANIZOMENON
FLOS AQUA

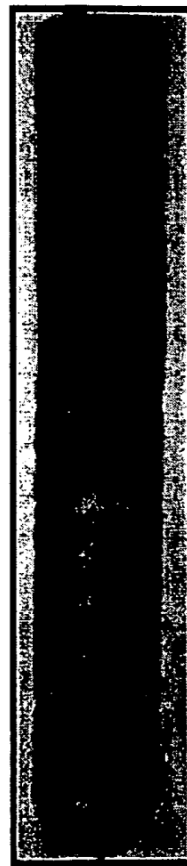


FIGURA 5

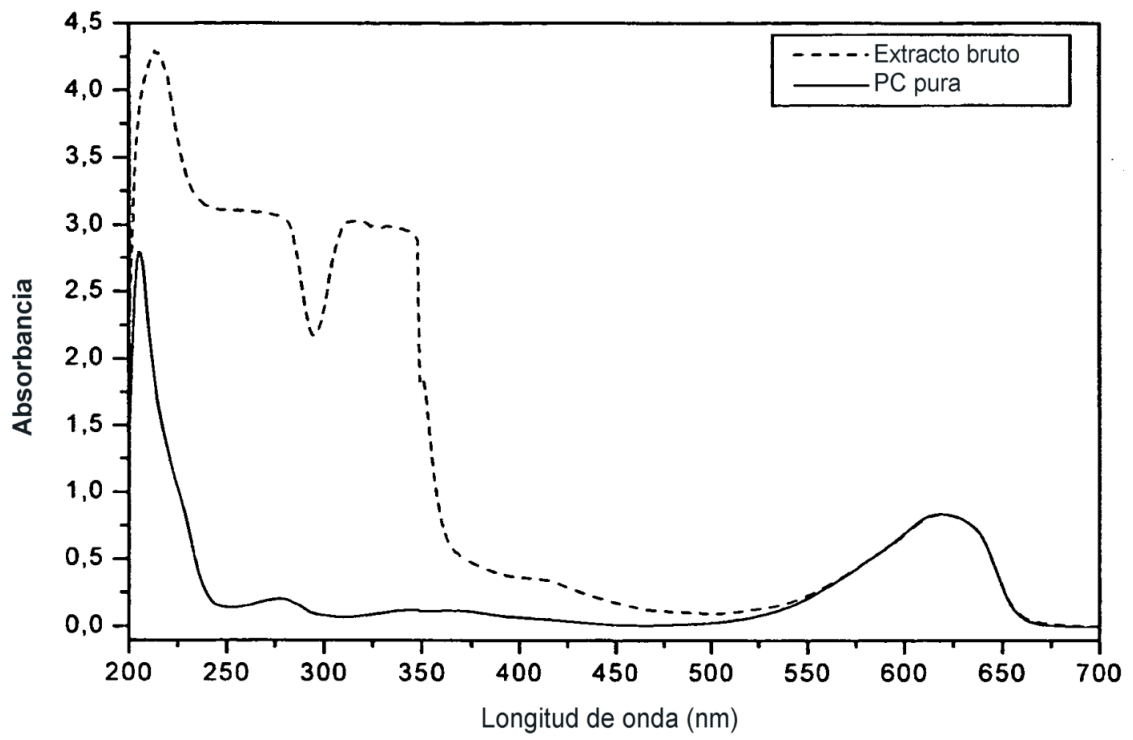


FIGURA 6

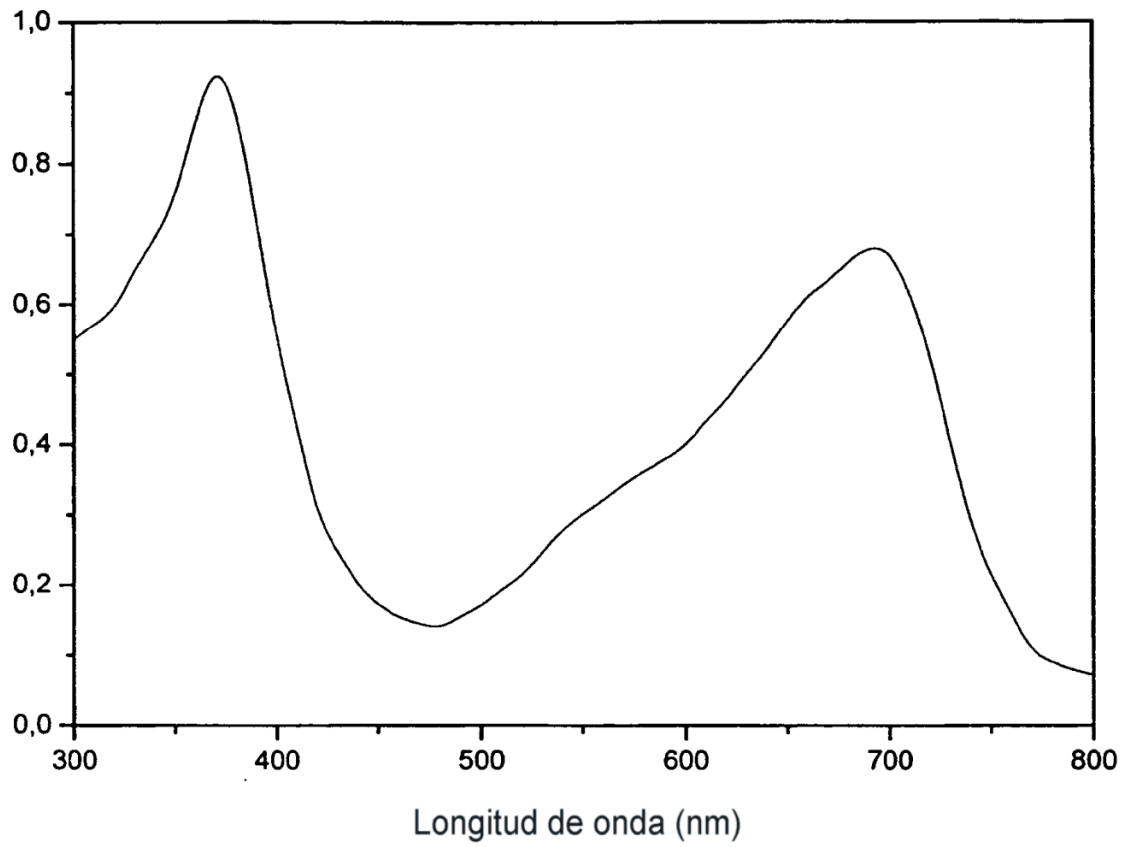


FIGURA 7A

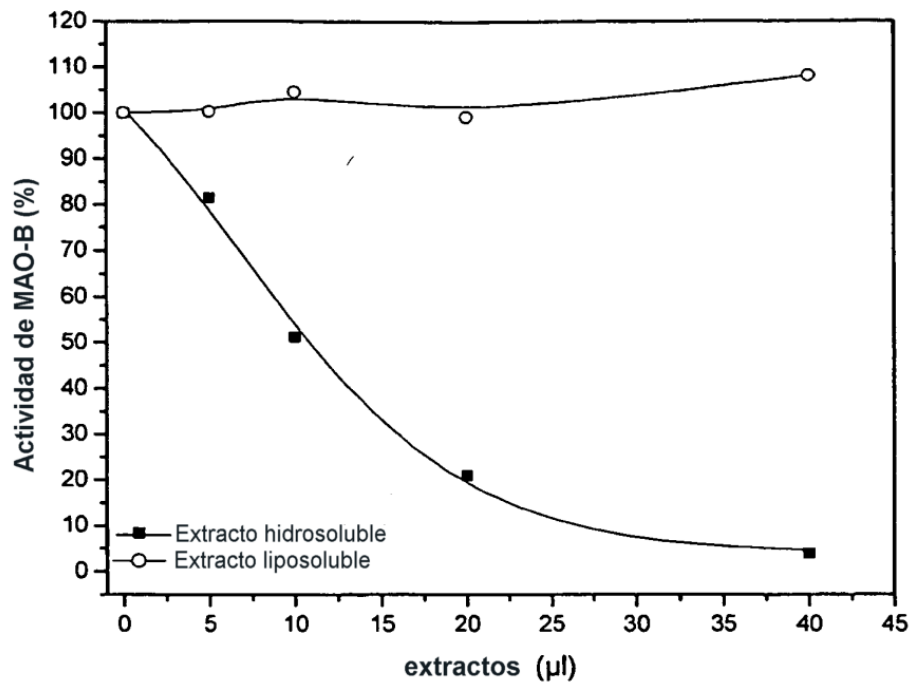


FIGURA 7B

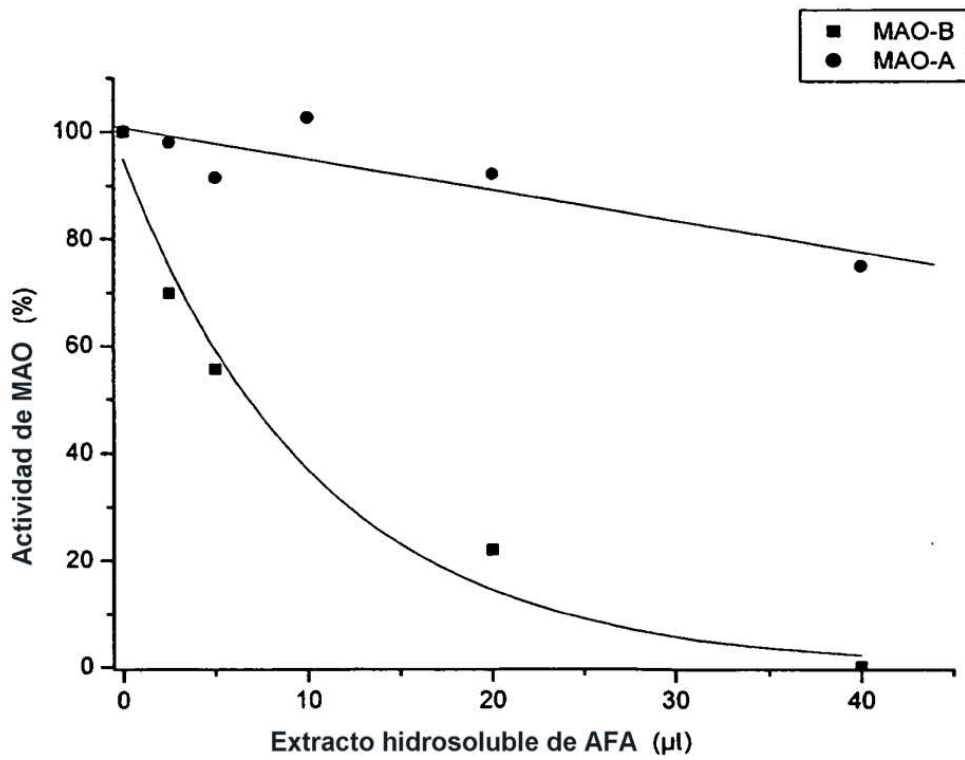


FIGURA 8

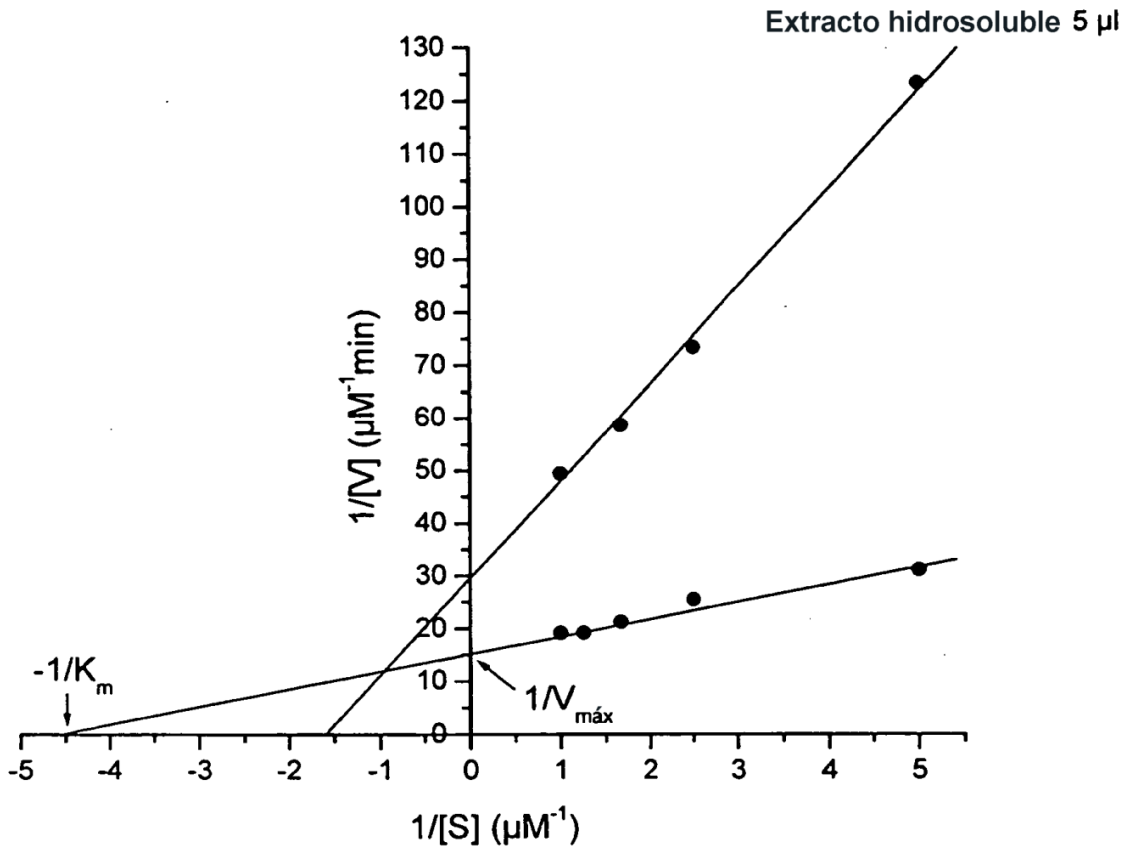


FIGURA 9

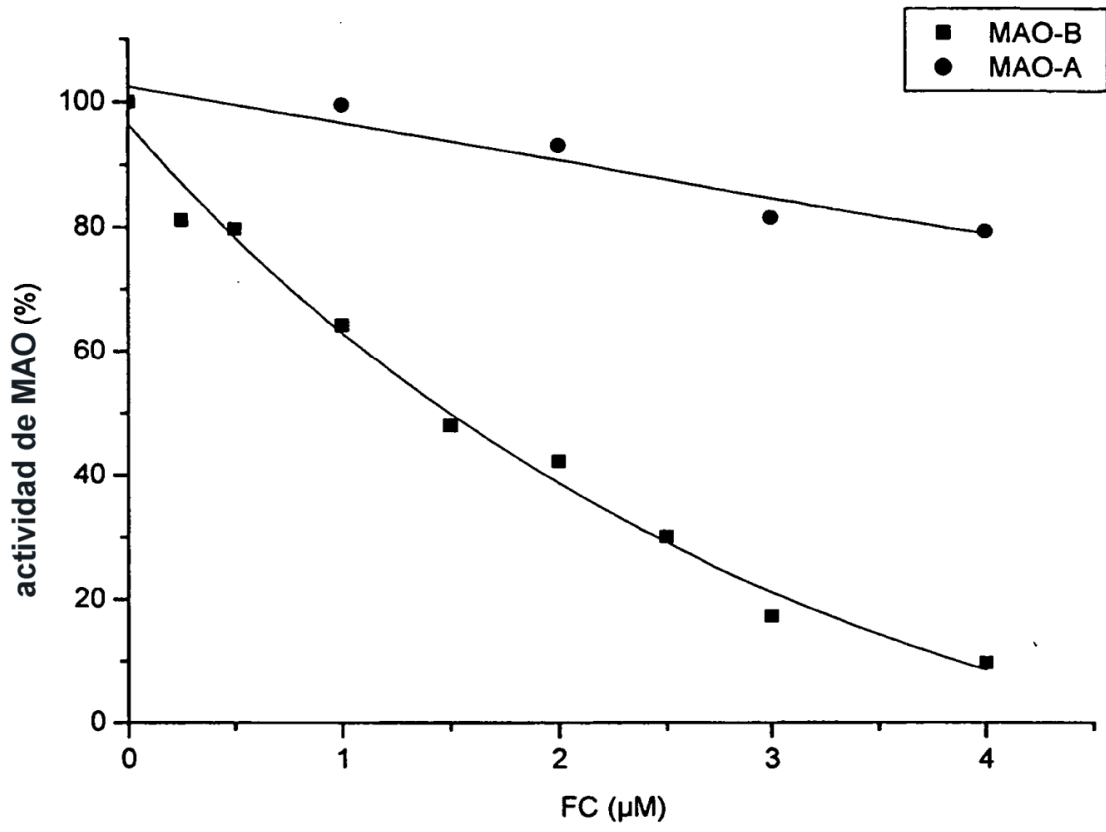


FIGURA 10

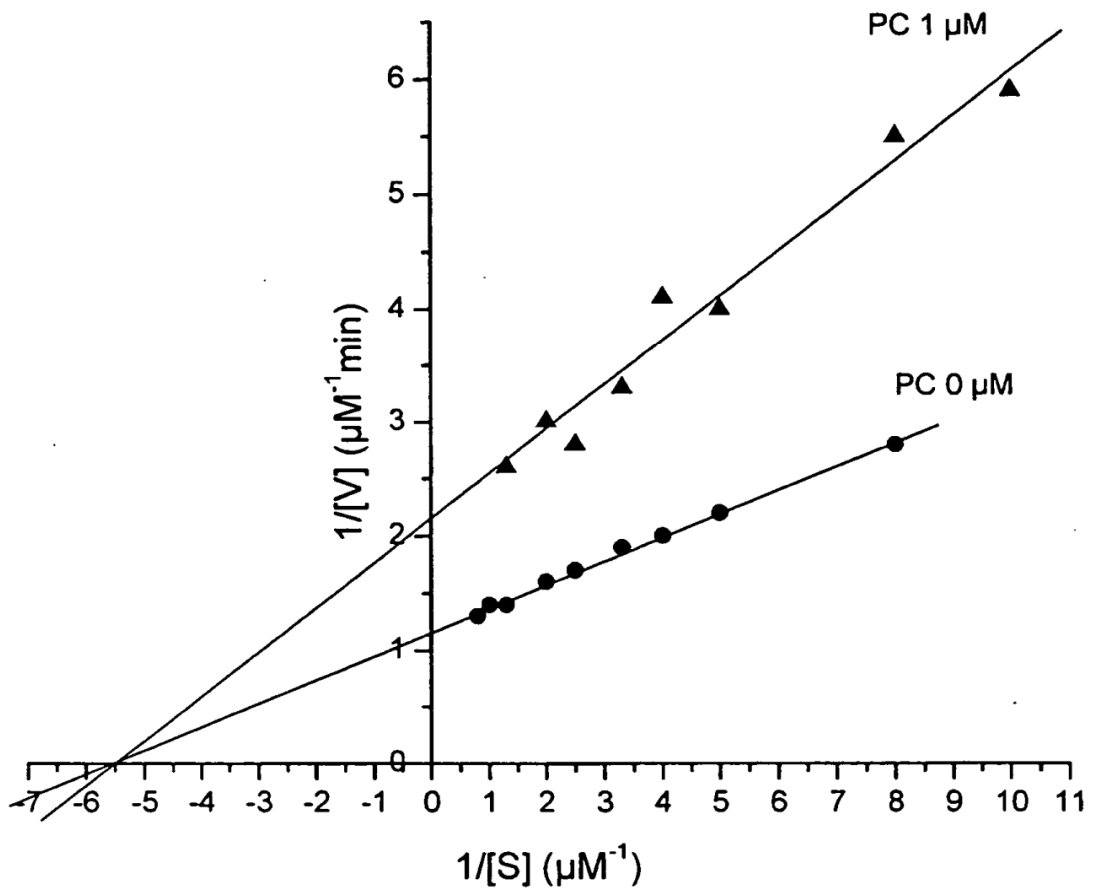


FIGURA 11

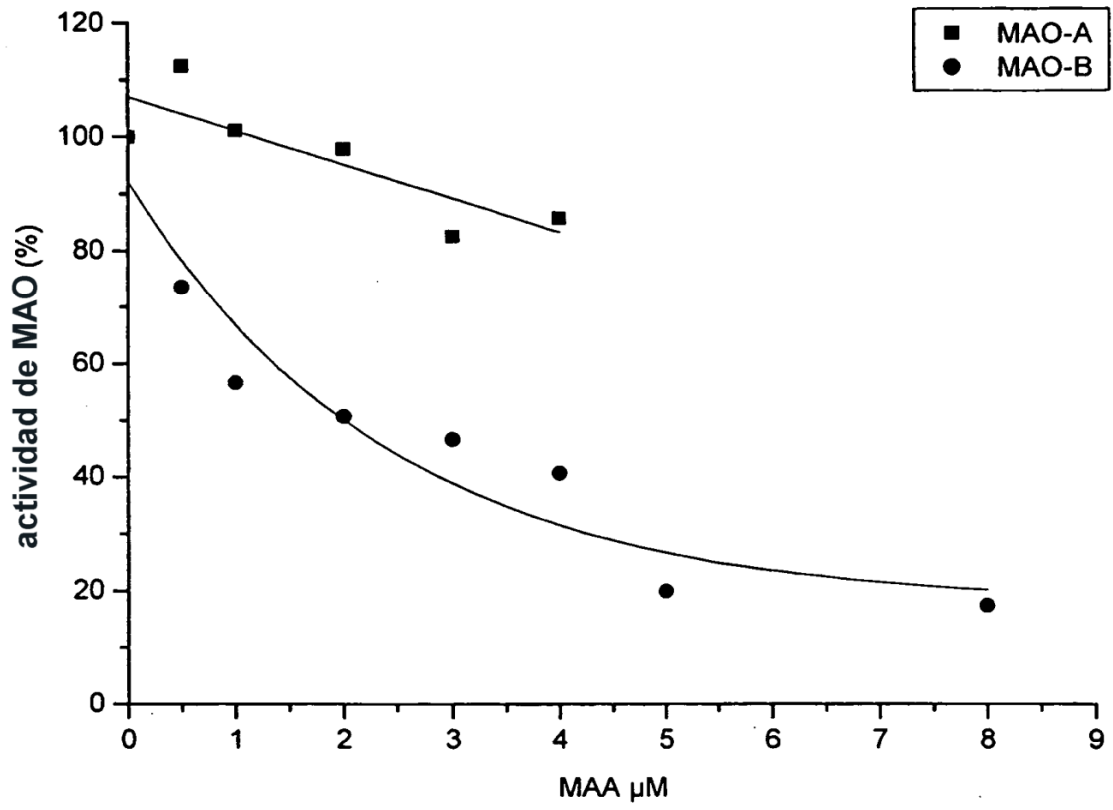


FIGURA 12

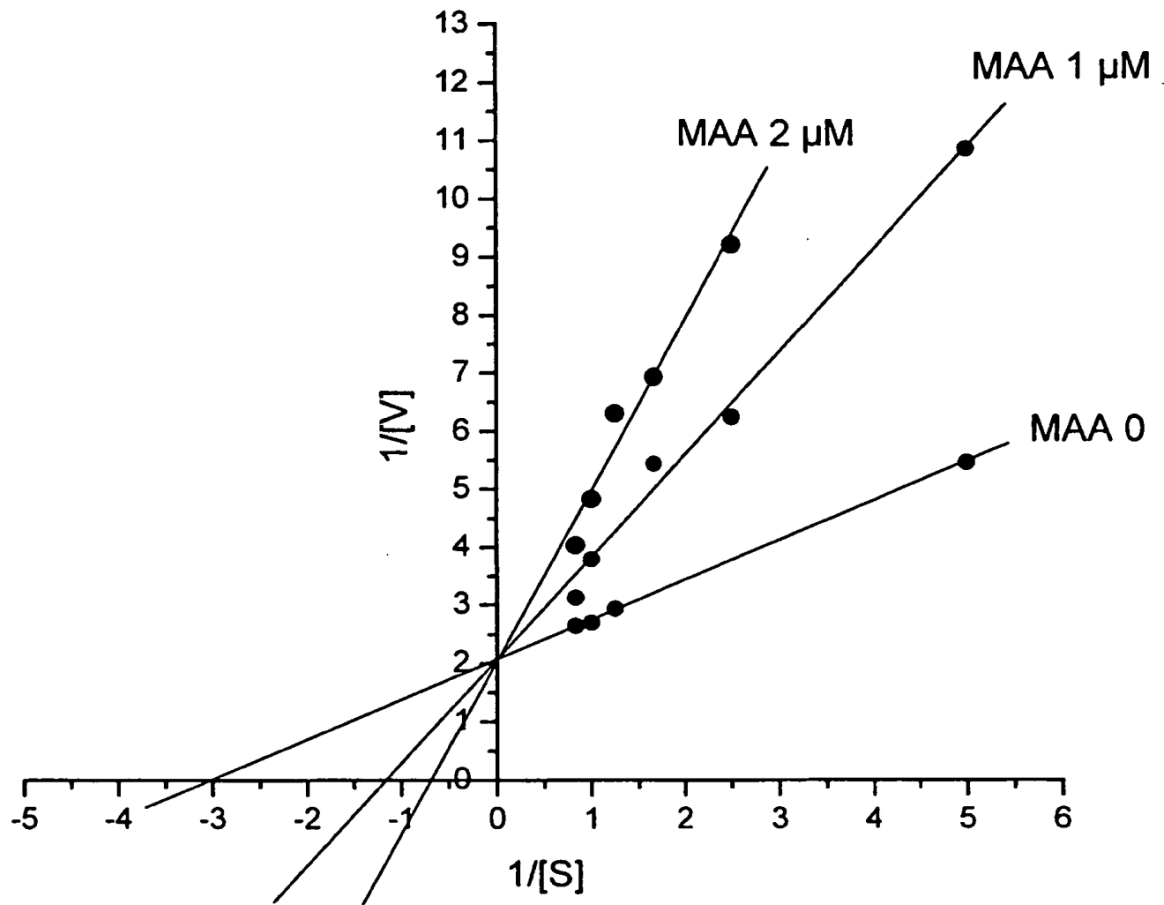


FIGURA 13

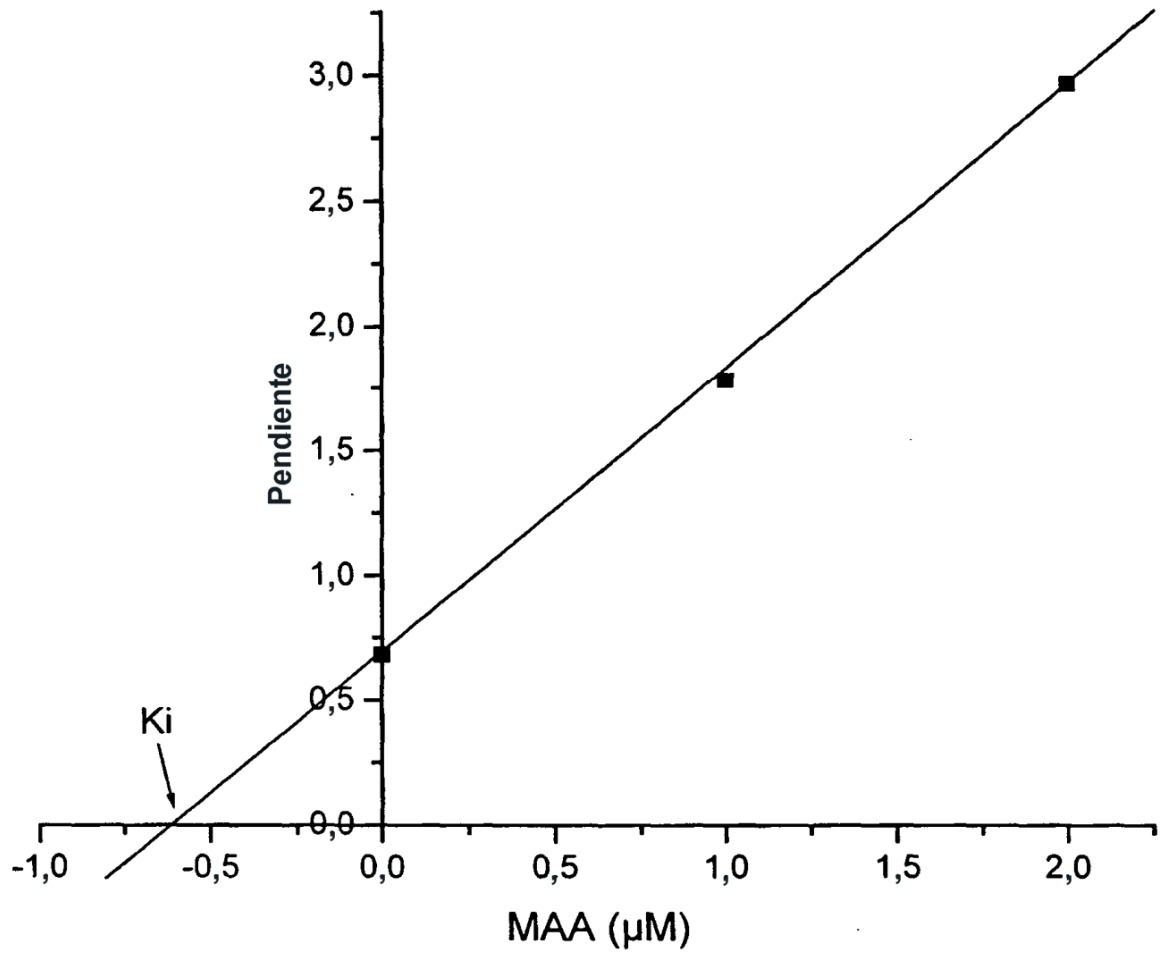


FIGURA 14

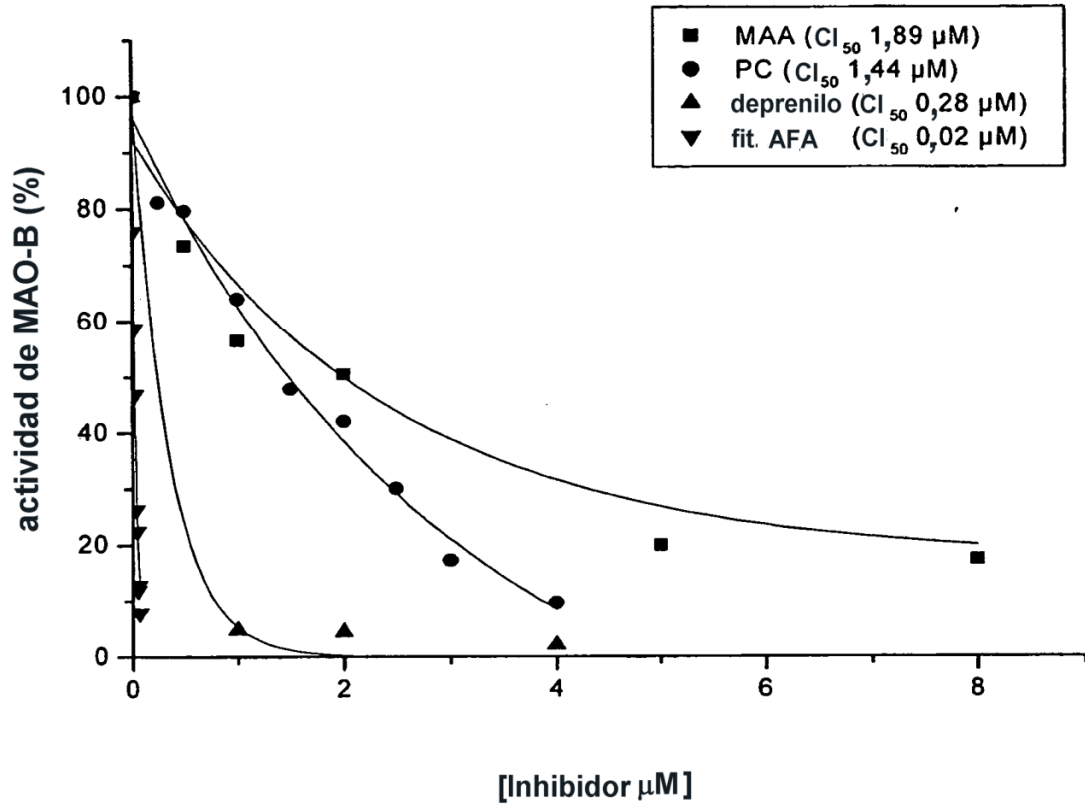


FIGURA 15

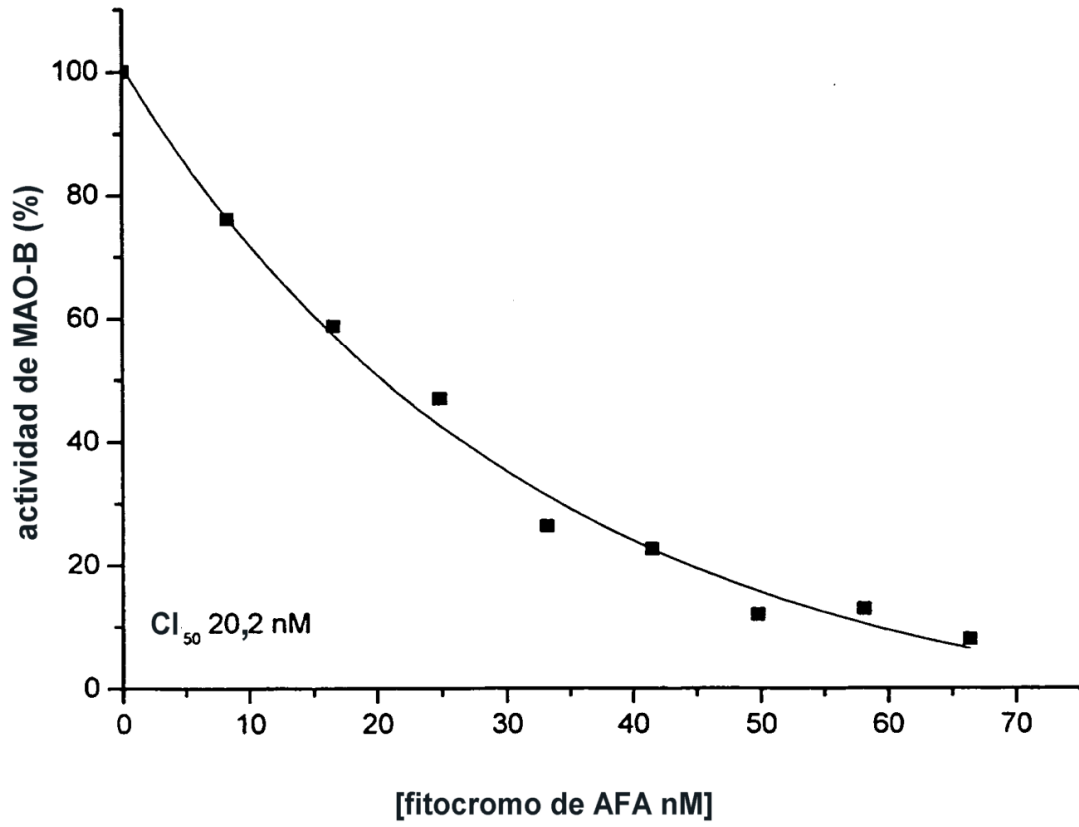


FIGURA 16

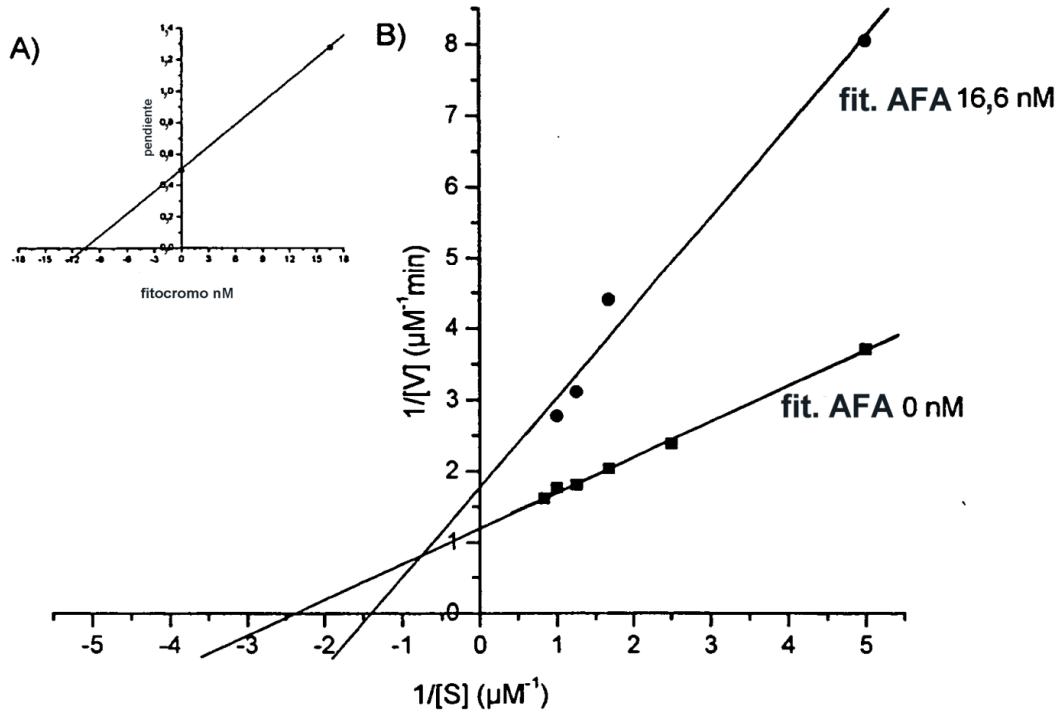


FIGURA 17

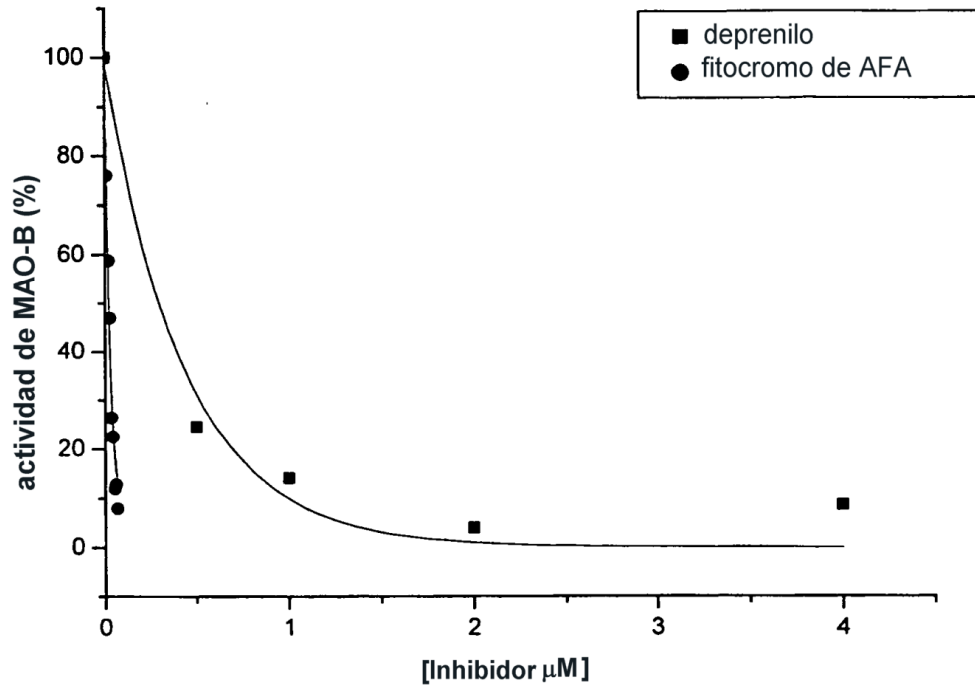


FIGURA 18

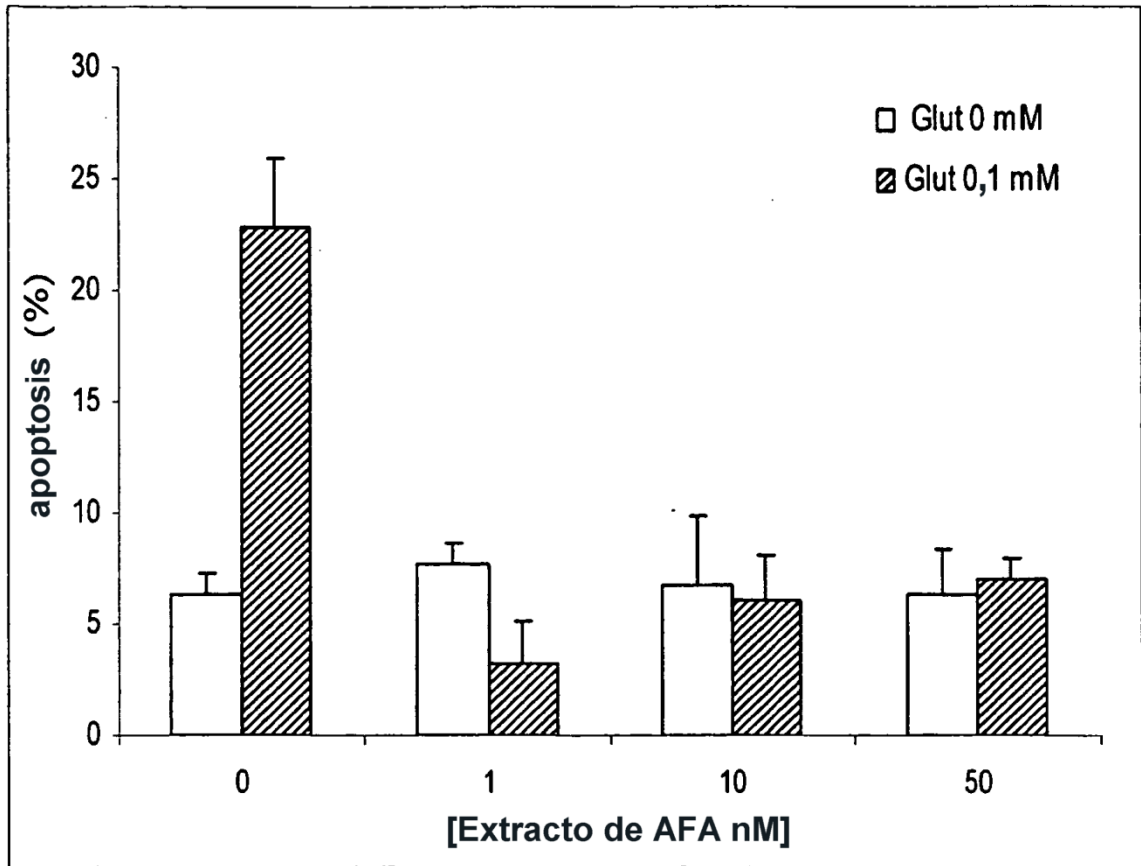


FIGURA 19

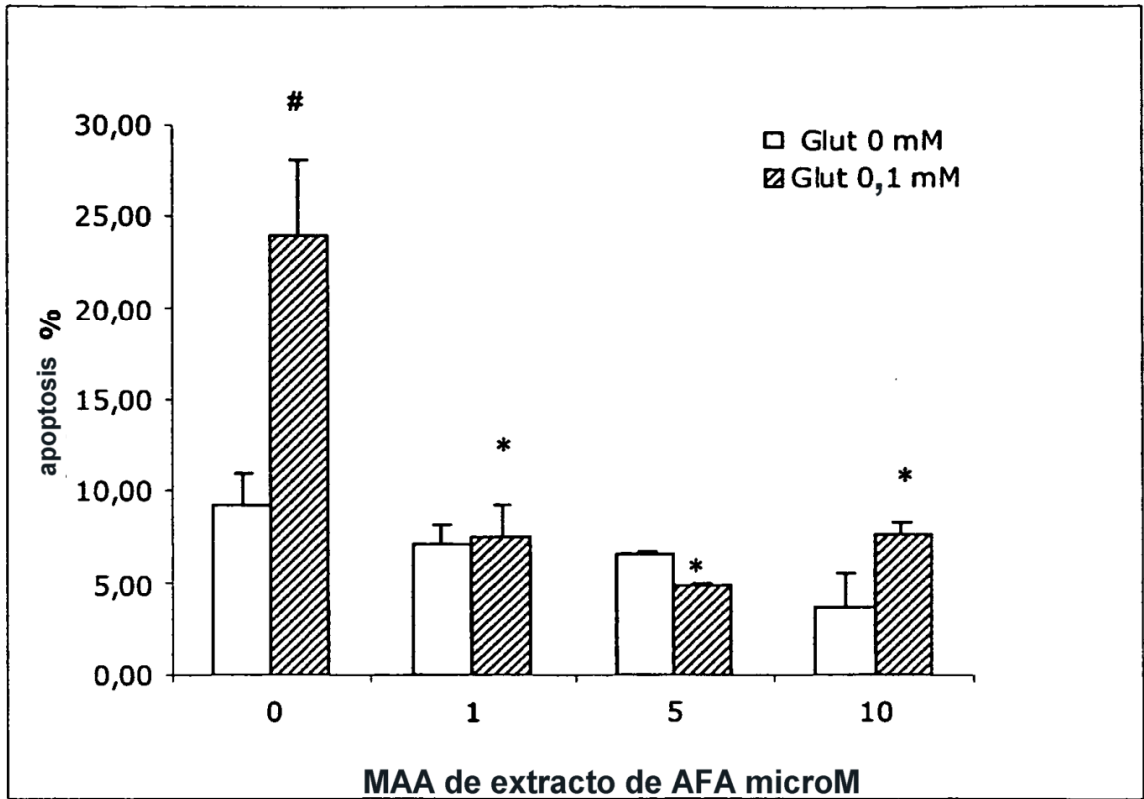


FIGURA 20

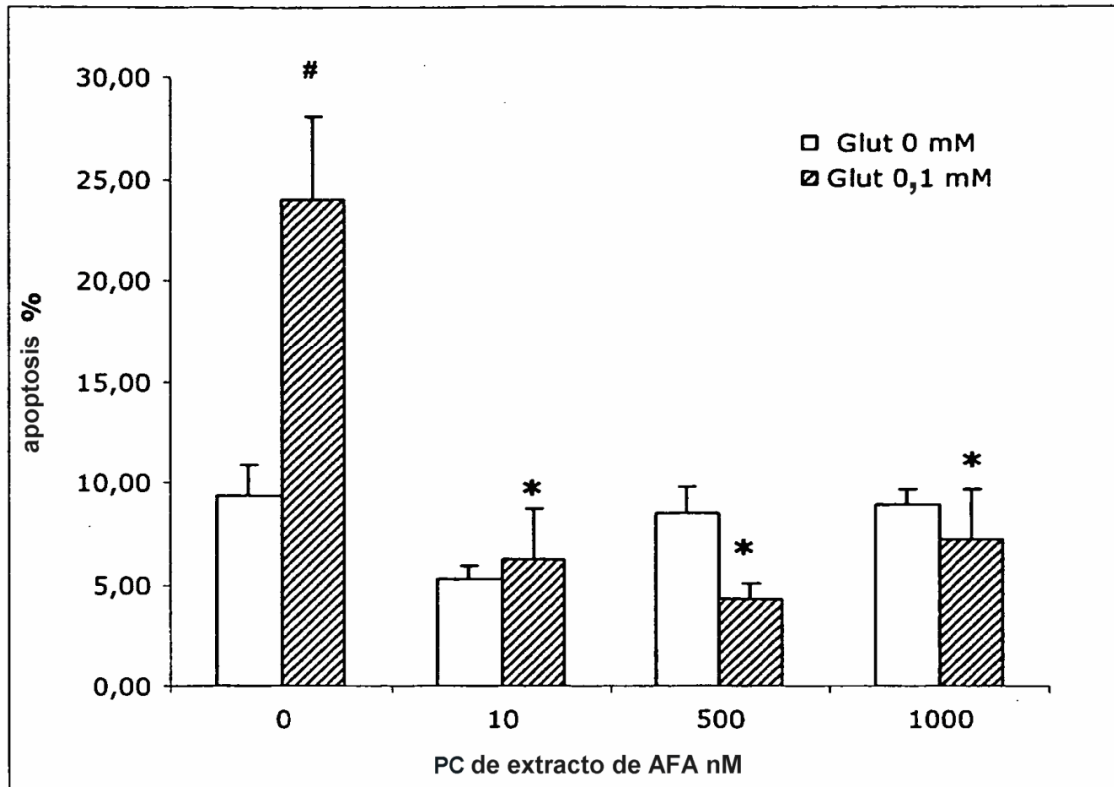


FIGURA 21

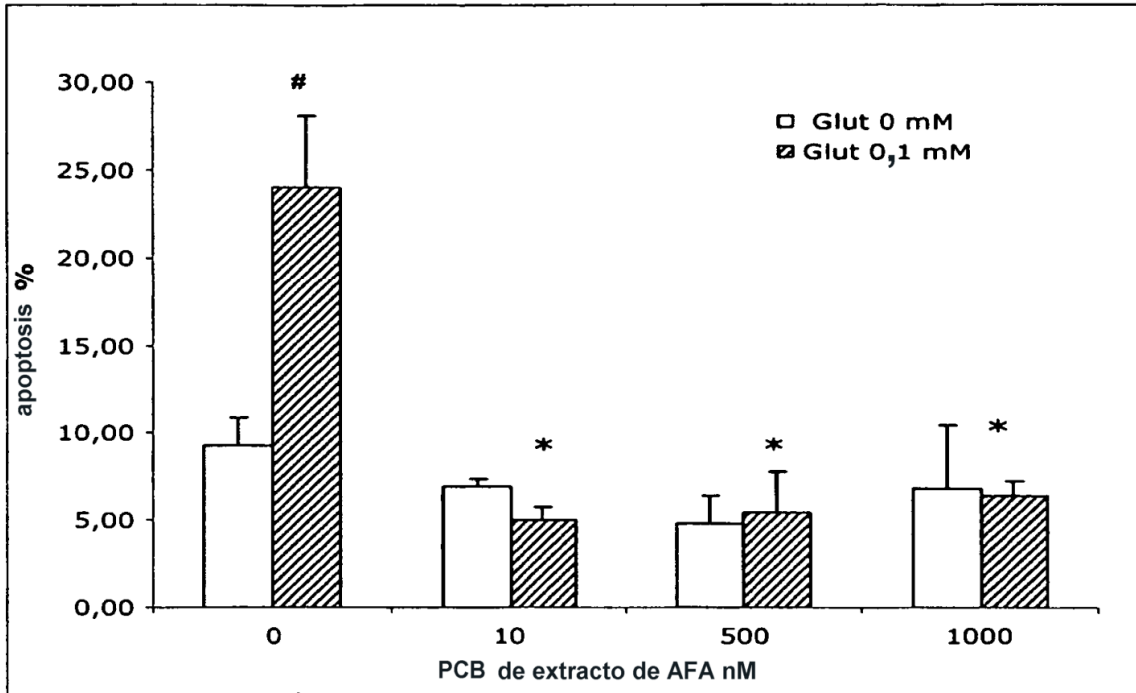


FIGURA 22

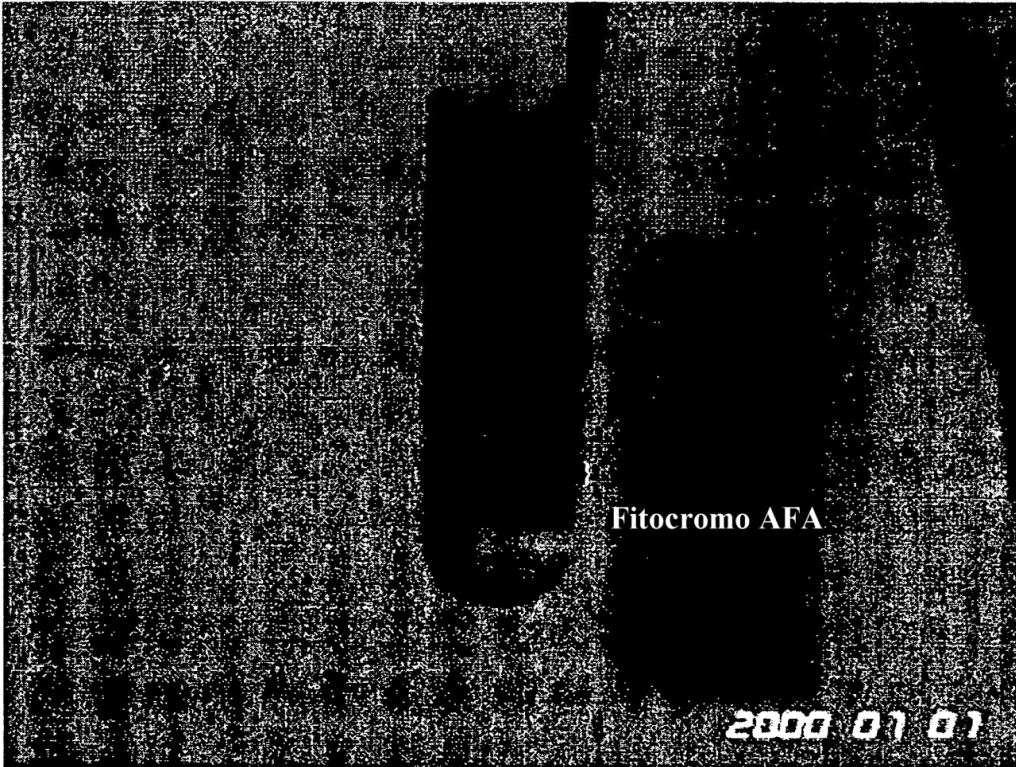


FIGURA 23

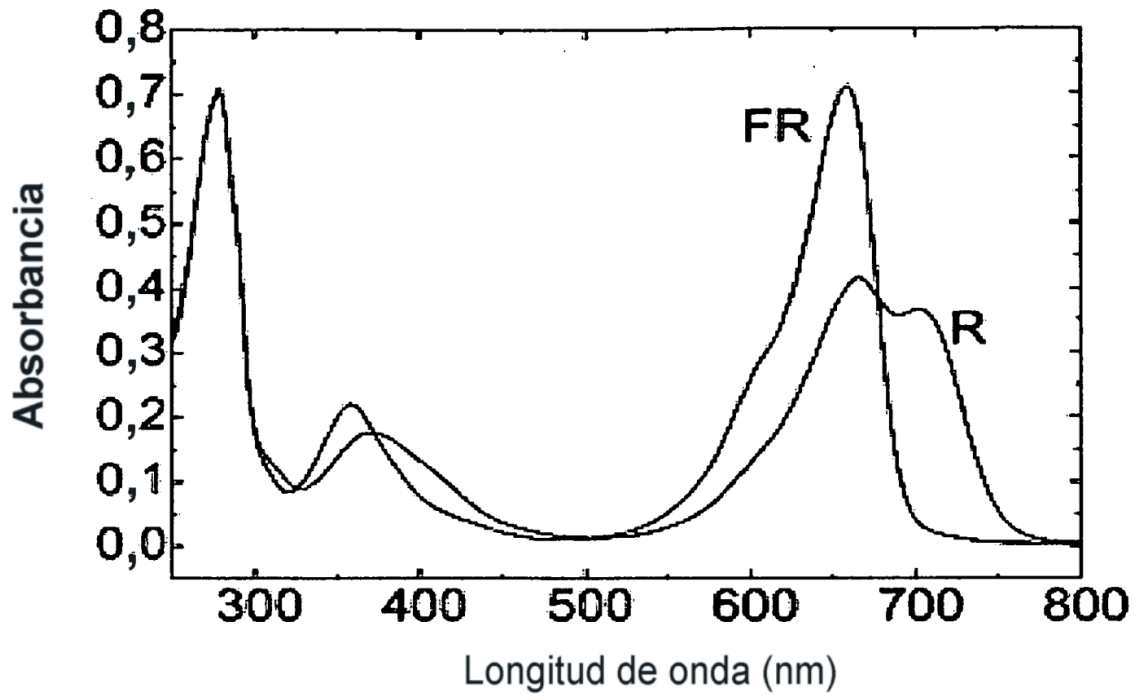


FIGURA 24

