

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 910**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**A61K 31/353** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02721413 .9**  
96 Fecha de presentación: **15.03.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1372682**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Catequinas para el tratamiento de la fibrillogénesis en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA y otros trastornos amiloides**

30 Prioridad:  
**15.03.2001 US 276866 P**  
**10.12.2001 US 338969 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.10.2012**

73 Titular/es:  
**PROTEOTECH INC.**  
**12026, 115TH AVENUE N.E.**  
**KIRKLAND, WA 98034, US**

72 Inventor/es:  
**CASTILLO, Gerardo M.;**  
**CHOI, Paula Y.;**  
**CUMMINGS, Joel A.;**  
**NGUYEN, Beth P. y**  
**SNOW, Alan D.**

74 Agente/Representante:  
**Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 387 910 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

Catequinas para el tratamiento de la fibrillogénesis en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA y otros trastornos amiloides

Área técnica

La invención se refiere a composiciones para tratar la enfermedad de cuerpos de Lewy o la enfermedad de Parkinson usando catequinas.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado proteína beta amiloide o A $\beta$ , en forma fibrilar, que existe como placas amiloides extracelulares y como amiloide dentro de las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro. Se cree que el depósito de amiloide A $\beta$  fibrilar en la enfermedad de Alzheimer es perjudicial para el paciente, y que en último término produce toxicidad y muerte de las células neuronales, que son características distintivas de la enfermedad de Alzheimer. La acumulación de pruebas implica al amiloide como un factor causal de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Parkinson es otro trastorno humano caracterizado por la formación, el depósito, la acumulación y la persistencia de depósitos de proteína fibrilar anómala que muestra muchas de las características del amiloide. Se cree que en la enfermedad de Parkinson, una acumulación de cuerpos de Lewy citoplasmáticos formados por filamentos de alfa-sinucleína/NAC son importantes en la patogenia y como objetivos terapéuticos. Se considera que los nuevos agentes o compuestos capaces de inhibir la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de la alfa-sinucleína/NAC, o de romper las fibrillas preformadas de alfa-sinucleína/NAC (o partes de ellas) son potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Una diversidad de otras enfermedades humanas también presentan depósitos amiloides y generalmente involucran a órganos sistémicos (es decir, órganos o tejidos situados fuera del sistema nervioso central); dicha acumulación de amiloide produce disfunción o insuficiencia de los órganos. Estas enfermedades amiloides (tratadas más adelante) que producen una importante acumulación de amiloide en varios órganos y tejidos diferentes son conocidas como amiloidosis sistémicas. En otras enfermedades amiloides, se pueden ver afectados órganos individuales, como el páncreas en el 90% de los pacientes con diabetes tipo 2. En este tipo de amiloidosis, se cree que las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas son destruidas por la acumulación de depósitos de amiloide fibrilar que constan fundamentalmente de una proteína conocida como polipéptido amiloide de los islotes (IAPP). Se cree que inhibir o reducir dicha acumulación de amiloide puede conducir a nuevos tratamientos para la diabetes tipo 2. En la actualidad no existe cura ni tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y las enfermedades amiloides "sistémicas", y generalmente el paciente muere entre 3 y 10 años después del inicio de la enfermedad.

Las enfermedades amiloides incluyen, pero no exclusivamente, el amiloide asociado a la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, la miositosis de cuerpos de inclusión (Askanas et al., *Ann. Neurol.*, 43:521-560, 1993) (donde el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o A $\beta$ ), el amiloide asociado a la inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (en que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada a la inflamación), el amiloide asociado a mieloma múltiple y otras discrasias de linfocitos B (en que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado a la diabetes tipo II (en que la proteína amiloide específica se denomina amilina o polipéptido amiloide de los islotes), el amiloide asociado a las enfermedades priónicas, incluidas la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Straussler, el kuru y la encefalopatía espongiiforme ovina (en que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado a la hemodiálisis a largo plazo y el síndrome del túnel carpiano (en que el amiloide específico se denomina amiloide beta 2 -microglobulina), el amiloide asociado a la amiloidosis cardíaca senil y la polineuropatía amiloidótica familiar (en que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmina), y el amiloide asociado a tumores endocrinos, como el carcinoma medular de tiroides (en que el amiloide específico se denomina variantes de procalcitonina).

Además, la proteína alfa-sinucleína que forma las fibrillas y es positiva al rojo Congo y a la tioflavina S se encuentra como parte de los cuerpos de Lewy en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de los cuerpos de Lewy (Lewy in *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín, pp. 920-933, 1912; Pollanen et al., *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 52:183-191, 1993; Spillantini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95:6469-6473, 1998; Arai et al., *Neurosci. Lett.*, 259:83-86, 1999), y atrofia multisistémica (Wakabayashi et al., *Acta Neuropath.*, 96:445-452, 1998).

Se buscan desesperadamente el descubrimiento y la identificación de nuevos compuestos o agentes como potenciales fármacos para detener la formación, el depósito, la acumulación y la persistencia de amiloide que se

produce en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis .

#### Divulgación de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una catequina en la fabricación de un fármaco para tratar la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de cuerpos de Lewy, en que la catequina se selecciona del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una catequina seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes para tratar la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de cuerpos de Lewy.

El medicamento puede ser para administración oral, inyección parenteral, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, administración tópica o administración por nebulización de aerosol.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la fibrillogénesis de alfa-sinucleína o NAC en un ambiente *in vitro*, donde el método comprende el paso de administrar en el ambiente *in vitro* una cantidad terapéuticamente eficaz de una catequina seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una catequina seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la cantidad terapéuticamente eficaz de la catequina comprende una dosis en el rango de aproximadamente 0.1 a 500 mg/kg de peso corporal del sujeto.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la catequina puede comprender una dosis en el rango de aproximadamente 1.0 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En ciertas realizaciones, la composición comprende una mezcla de dos o más de las catequinas seleccionadas del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.

La catequina seleccionada está preferentemente en forma aislada sustancialmente pura.

Se dan a conocer la identificación y el uso de extracto de té verde estandarizado y sus derivados y constituyentes, tales como los compuestos de catequina que se muestran por ejemplo en la figura 1, para la intervención terapéutica de la enfermedad de Alzheimer, la amiloidosis sistémica AA y otras amiloidosis, y las enfermedades de Parkinson y de cuerpos de Lewy.

Además, se dan a conocer métodos de aislamiento para la identificación y la purificación de los potentes ingredientes inhibidores del amiloide contenidos en el extracto de té verde. Se prevé que el uso del extracto de hojas de té verde estandarizado y sus ingredientes (es decir, 50% de polifenoles) contenidos en diferentes preparados comerciales beneficiará a los pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis, y las enfermedades de Parkinson y de cuerpos de Lewy, debido a la capacidad del extracto de hojas de té verde para inhibir la formación de fibrillas amiloides y la formación de fibrillas de alfa-sinucleína y de cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson, y para causar la disgregación/ruptura y desintegración de las fibrillas amiloides y de alfa-sinucleína preformadas.

Damos a conocer la identificación de, y hacemos el sorprendente descubrimiento de que, las catequinas comerciales como las presentes en los extractos de té verde estandarizado, y el extracto de hojas de té verde estandarizado en sí mismo (como se encuentra en el extracto estandarizado para 50% de polifenoles) actúan como un inhibidor impresionante de la formación de fibrilla amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la formación de fibrilla amiloide en la amiloidosis sistémica AA y la formación de fibrilla de alfa-sinucleína/NAC en la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, las catequinas comerciales (incluidas, pero no exclusivamente, epicatequina, catequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y/o galato de epicatequina) y el extracto de hojas de té verde estandarizado tienen la capacidad de causar disgregación/ruptura de las fibrillas amiloides preformadas del tipo de Alzheimer, lo que sugiere que este agente puede ser útil para los pacientes en las últimas etapas de la

enfermedad de Alzheimer y para aquellos afectados por otras enfermedades amiloides. Se encontró que el extracto de hojas de té verde estandarizado y las catequinas obtenidas de diferentes fuentes comerciales (extractos aislados de cápsulas de gelatina recubiertas) servían como potentes inhibidores de la fibrillogénesis del amiloide en la enfermedad de Alzheimer y la fibrillogénesis de proteínas en la enfermedad de Parkinson.

Para los fines de esta divulgación, la enfermedad de Parkinson, debido al hecho de que se desarrollan fibrillas en el cerebro de los pacientes que tienen esta enfermedad (que son positivas para el rojo Congo y la tioflavina S y que contienen una estructura secundaria predominante de hoja beta plegada), se identifica y se trata como una enfermedad que también presenta las características de una enfermedad tipo amiloide, y se espera que las divulgaciones de este documento relacionadas con amiloidosis se relacionen terapéuticamente de manera semejante con las enfermedades de Parkinson y de cuerpos de Lewy. Por consiguiente se prevé que los agentes o compuestos que inhiben la formación de la fibrilla de amiloide A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer también sean eficaces en la inhibición de la formación de la fibrilla de alfa-sinucleína/NAC. Esos agentes o compuestos servirán por consiguiente como fármacos para las enfermedades de Parkinson y de cuerpos de Lewy, además de ser eficaces como fármacos para la enfermedad de Alzheimer, la amiloidosis sistémica, la diabetes tipo 2 y otros trastornos amiloides.

Los compuestos aromáticos polihidroxilados seleccionados, como epicatequina, parecen ser eficaces como inhibidores de la amiloidosis sistémica AA *in vivo*. De manera significativa, hemos descubierto que la catequina en sí misma (el epímero de la epicatequina), no es eficaz como inhibidor de la amiloidosis sistémica AA. Identificamos varios compuestos aromáticos polihidroxilados que inhiben la formación y/o el depósito de amiloide AA fibrilar, y que son útiles para el tratamiento de la amiloidosis sistémica AA que se encuentra en pacientes con trastornos inflamatorios crónicos.

Tanto el extracto de hojas de té verde estandarizado como diversas catequinas comerciales causan una inhibición, dependiente de la dosis, marcadamente significativa de la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  1-40 según se determina usando un ensayo fluorométrico con tioflavina T, de manera dependiente de la dosis. El extracto de hojas de té verde estandarizado y las catequinas obtenidas de fuentes comerciales fueron potentes desintegradores de las fibrillas amiloides preformadas que contenían A $\beta$  1-42, según se determinó usando un ensayo fluorométrico con tioflavina T, y ejercieron sus efectos de manera dependiente de la dosis. Los compuestos aromáticos polihidroxilados seleccionados, como la epicatequina, parecen ser inhibidores eficaces de la amiloidosis sistémica AA en un modelo experimental en ratón. Por último, el extracto de hojas de té verde estandarizado obtenido de diferentes fuentes comerciales causó una desintegración de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 preformadas de Alzheimer, y las catequinas obtenidas de diferentes fuentes comerciales causaron una inhibición de las fibrillas que contienen NAC de la enfermedad de Parkinson.

Por consiguiente, se da a conocer el uso del extracto de hojas de té verde estandarizado y/o catequinas específicas (en diversas formas, es decir, una píldora, un comprimido, un líquido, un polvo, etc.) y sus derivados, procedentes de diferentes fuentes comerciales, para el tratamiento de la fibrillogénesis en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA y otras amiloidosis. También se dan a conocer métodos de aislamiento para identificar y purificar los principios activos clave, inhibidores del amiloide, del material del extracto de té verde. Se prevé que la identificación de los principios "activos" inhibidores del amiloide contenidos en los materiales vegetales extraídos del té verde conduzca al diseño de nuevos fármacos para el tratamiento anti-amiloide del futuro. Se prevé que el uso actual del extracto de hojas de té verde estandarizado y sus ingredientes, tales como las catequinas, como las contenidas en diferentes preparados comerciales, beneficiarán a los pacientes humanos en todas las etapas de la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y otras enfermedades amiloides o tipo amiloides debido a la recién demostrada capacidad de las catequinas y el extracto de hojas de té verde estandarizado para inhibir la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  y la formación de fibrilla de alfa-sinucleína (importante para tratar las etapas tempranas a intermedias de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, respectivamente), y causar la disolución/ruptura y desintegración de las fibrillas amiloides preformadas (importante para tratar las etapas intermedias a tardías de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson, respectivamente). De manera similar, se prevé que las catequinas y el extracto de hojas de té verde estandarizado beneficiarán a los pacientes con diferentes enfermedades amiloides sistémicas como la amiloidosis sistémica AA y la diabetes tipo 2, independientemente de la etapa de acumulación de amiloide y del órgano (o tejido) involucrado.

Si bien los resultados del extracto de té se ejemplifican con extractos de la especie *Camellia sinensis*, se cree que los extractos de otras especies de la familia Theaceae tienen efectos similares.

Se da a conocer el uso del té verde, las hojas y los extractos de té verde, y las catequinas o sus derivados, para el tratamiento del amiloide y/o la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de fibrillas en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

"Tratamiento" pretende también en todas las instancias posibles incluir y cubrir "tratamiento *in vitro*", ya sea para fines experimentales o de detección y similares, aunque el tratamiento *in vitro* conduzca o no, o siempre se conciba

para que conduzca, al tratamiento de una enfermedad tipo fibrillogénesis, o cualquier enfermedad amiloide o alfa-sinucleínica correspondiente a esa fibrillogénesis, en un sujeto mamífero.

5 También se da a conocer el uso del té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, de la especie *Camellia sinensis* para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

10 Se dan a conocer el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, de la familia Theaceae para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

15 Se dan a conocer píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina blanda y dura, pastillas, bolsitas, obleas, vegicaps, gotas de líquido, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, hojas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos estériles envasados, y/o hoja en polvo que contengan té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

20 Se dan a conocer el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados y/o los polifenoles contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

25 La invención se describe con referencia a realizaciones, partes y especies de plantas, métodos, procedimientos y análogos, específicos. No obstante, los expertos comprenderán que se pueden realizar diversas sustituciones químicas en los compuestos dados a conocer sin apartarse del espíritu ni el alcance de la invención. En particular, se sabe que las catequinas se pueden aislar y/o purificar de materiales vegetales por varios métodos diferentes. Se comprenderá además que esos métodos alternativos y los cambios consecuentes en otros pasos del método, como el uso de solventes diferentes o columnas diferentes para la purificación, y de catequinas de una composición de polifenoles parcialmente purificados, quedan comprendidos en el alcance de los extractos derivados de plantas y los compuestos derivados de éstos, dados a conocer en la presente invención.

35 También se da a conocer el uso de catequinas contenidas en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación, y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

40 Se dan a conocer catequinas, incluidas pero no exclusivamente, catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y/o galato de epicatequina, ya estén contenidas en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, o provengan de otras fuentes naturales o sintéticas, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

45 También se da a conocer el uso de bioflavonoides contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis, y el uso de flavanoles contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

50 También se da a conocer el uso de flavandioles contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis, y el uso de flavonoides contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

60 También se da a conocer el uso de taninos contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

También se dan a conocer métodos para aislar los principios activos presentes en el té verde, las hojas y los

extractos de té verde o sus derivados, para usar como potentes agentes que inhiben la formación de amiloide, el depósito de amiloide, la acumulación de amiloide, la persistencia de amiloide, que causan una disgregación/ruptura y/o causan una desintegración de fibrillas amiloides preformadas o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis. Los métodos para el aislamiento de los principios activos contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, incluyen la aplicación de algunas técnicas corrientes conocidas por los expertos, que incluyen, pero no exclusivamente, cromatografía en capa delgada utilizando placas recubiertas de sílice, y separación y aislamiento mediante cromatografía líquida de alta o baja presión (HPLC). Otros principios activos del té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, que se encontró que eran potentes inhibidores de la formación de amiloide, el depósito de amiloide, la acumulación de amiloide, la persistencia de amiloide y/o que causaban una disgregación/ruptura y desintegración de las fibrillas amiloides preformadas o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 diabetes y otras amiloidosis, se identifican volviendo a analizar las bandas o fracciones individuales (separadas por cromatografía en capa delgada, cromatografía en columna y/o HPLC) utilizando pruebas de ensayo específicas como las que se describen en los ejemplos.

El aislamiento en cantidad suficiente de esos principios activos contenidos en las bandas y/o fracciones individuales, se envía a continuación para análisis específicos que pueden incluir, pero no exclusivamente, barrido con microscopio electrónico equipado con analizador de energía dispersiva de rayos X para detectar y hacer un mapa espacial de algunos elementos presentes en cada muestra, análisis elemental por combustión para determinar el % relativo de carbono, hidrógeno y nitrógeno, espectroscopia de masas de alta resolución para determinar el peso molecular y la composición elemental, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para determinar los grupos funcionales y hacer comparaciones con los espectros de compuestos conocidos, calorimetría diferencial de barrido para determinar el punto de fusión, absorción atómica, cromatografía en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y C<sup>13</sup> para proporcionar información sobre la posición de los átomos entre sí y espectroscopia UV/VIS. Se espera que se desarrollen otras técnicas como parte del aislamiento posterior de los potentes principios activos del té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados.

Se dan a conocer el uso del té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados y/o sus ingredientes (independientemente de la fuente comercial e independientemente de la forma final para el consumo humano, es decir, píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina blanda y dura, pastillas, bolsitas, obleas, vegicaps, gotas de líquido, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos estériles envasados, y/o hojas de té en polvo, para la inhibición de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide, independientemente de su escenario clínico.

También se dan a conocer composiciones y métodos que implican administrar a un sujeto una dosis terapéutica de té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, los cuales inhiben el depósito de amiloide. En consecuencia, las composiciones y los métodos dados a conocer son útiles para inhibir la amiloidosis en trastornos en los que se produce depósito de amiloide. Los compuestos dados a conocer en este documento se pueden utilizar terapéuticamente para tratar la amiloidosis o se pueden utilizar profilácticamente en un sujeto propenso a la amiloidosis. Los métodos dados a conocer se basan, al menos en parte, en inhibir directamente la formación de fibrilla amiloide, causar la disgregación/ruptura y/o desintegración de las fibrillas amiloides preformadas.

También se dan a conocer composiciones farmacéuticas para tratar la amiloidosis. Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer incluyen un fármaco en una cantidad eficaz para inhibir el depósito de amiloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se da a conocer el uso de cualquiera y de todos los compuestos sintéticos que son similares al té verde, las hojas de té verde, los extractos o sus derivados y/o sus principios activos, para usar como potentes agentes que inhiban la formación de amiloide, el depósito de amiloide, la acumulación de amiloide, la persistencia de amiloide, que causen una disgregación/ruptura, y/o desintegración de las fibrillas amiloides preformadas o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

Se da a conocer un método de aislamiento para purificar e identificar los ingredientes inhibidores del amiloide contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados. En dicho método, se prepara un extracto de píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina blanda y dura, pastillas, bolsitas, obleas, vegicaps, gotas de líquido, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos estériles envasados, té en polvo, comerciales, utilizando el método que emplea algunos o todos los pasos siguientes: a) extracción del té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados independientemente de la forma descrita antes, utilizando agua o alcohol (es decir metanol, etanol o propanol), b) centrifugación a 2,500 X g durante 20 minutos y

recolección del sobrenadante, c) evaporación rotatoria hasta sequedad de los compuestos extraídos con alcohol y liofilización de los compuestos extraídos con agua, d) lavado del polvo seco obtenido, con 4 volúmenes de éter de petróleo (se repite 4 veces) seguido de centrifugación (cada vez) a 2,500 X g durante 20 minutos y recolección de los sobrenadantes y sedimentos, e) secado al aire de los sedimentos recogidos, f) re-extracción con agua de los sedimentos secados al aire y centrifugación a 2,500 X g durante 20 minutos, g) liofilización de los sobrenadantes recogidos (denominados extractos acuosos), h) redisolución de los sedimentos o el polvo liofilizado del extracto acuoso en acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético (TFA) i) inyección y separación por HPLC o cromatografía a baja presión, j) identificación de los ingredientes inhibidores del amiloide mediante pruebas en ensayos *in vitro* e *in vivo* pertinentes, y k) envío para análisis estructural y composición elemental, como se describe en este documento.

También se da a conocer una composición, en forma de un suplemento dietético, para proporcionar, apoyar o mejorar en un sujeto una o más de las cualidades mentales o cognitivas, seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas, que consiste en el apoyo nutricional para la disminución cognitiva o de la memoria relacionadas con la edad, la función cerebral normal, la capacidad cognitiva y la concentración, donde la composición comprende té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados.

También se da a conocer una composición, en forma de un suplemento dietético, para promover, mantener o mejorar en un sujeto una o más de las cualidades mentales o cognitivas seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas que consisten en agudeza mental, estado de alerta mental, bienestar cognitivo, función normal del cerebro, capacidad cognitiva, rendimiento mental, memoria, concentración, agudeza mental, vitalidad mental, claridad mental, memoria a corto plazo, función normal del cerebro, aprendizaje y buena salud del cerebro, donde la composición comprende té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados.

También se da a conocer una composición, en forma de un suplemento dietético, para promover o apoyar la función pancreática saludable en un sujeto, ayudando a promover la función normal de la insulina, o para reducir, romper, disolver, inhibir, eliminar o prevenir en un sujeto una o más afecciones que involucran al páncreas seleccionadas del grupo de afecciones que involucran al páncreas que consisten en depósitos de fibrilla amiloide, depósitos de proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al páncreas, depósitos de proteína amiloide asociados al páncreas, formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas, donde la composición comprende té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados.

Se da a conocer el uso de (a) epicatequina o sus derivados, (b) catequinas, hidrato de catequina o sus derivados, (c) galato de galocatequina o sus derivados, (d) galato de epicatequina o sus derivados, (e) epigalocatequina o sus derivados, (f) galato de epigalocatequina o sus derivados, (g) té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, (h) té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, de la especie *Camellia sinensis*, (i) té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, de la familia Theaceae, (j) píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina blanda y dura, pastillas, bolsitas, obleas, vegicaps, gotas de líquido, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, hojas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos estériles envasados comerciales y/o hojas en polvo que contengan té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados, o catequinas, y (k) catequinas, incluidas pero no exclusivamente, catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina y galato de galocatequina contenidas en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, para el tratamiento de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de fibrillas en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

También se dan a conocer composiciones y métodos que implican administrar a un sujeto una dosis terapéutica de catequinas o sus derivados, que inhiba el depósito de amiloide. En consecuencia, las composiciones y los métodos dados a conocer son útiles para inhibir la amiloidosis en trastornos en los que se produce depósito de amiloide. Los compuestos se pueden usar terapéuticamente para tratar la amiloidosis o se pueden usar profilácticamente en un sujeto propenso a la amiloidosis. Los métodos se basan al menos en parte, en inhibir directamente la formación de fibrillas amiloides, causar la disgregación/ruptura y/o desintegración de las fibrillas amiloides preformadas.

Se da a conocer el uso de cualquiera y de todas las catequinas sintéticas o sus derivados y/o sus principios activos, para usar como potentes agentes que inhiban la formación de amiloide, el depósito de amiloide, la acumulación de amiloide, la persistencia de amiloide, que causen una disgregación/ruptura, y/o desintegración de fibrillas preformadas o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis.

Se da a conocer un fármaco para tratar una enfermedad amiloide en un paciente, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta de la familia Theraceae, y en particular del género Camellia. El fármaco proviene preferentemente de una planta del género Camellia, de la especie sinensis. El fármaco es preferentemente un extracto obtenido de Camellia sinensis, donde el extracto proviene de hojas desecadas.

El fármaco tiene preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de hojas de té verde estandarizado, o catequinas específicas, en una dosis en el rango entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal del paciente, y más preferentemente en el rango entre aproximadamente 0.1 y 100 mg/kg de peso corporal del paciente.

Los fármacos preferidos tienen un porcentaje en peso de extracto de la planta en el fármaco en el rango de aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, y también pueden tener un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El fármaco tiene preferentemente una actividad inhibidora del amiloide o una eficacia superior al 50%.

Las composiciones dadas a conocer también tienen la capacidad de reducir, eliminar, prevenir, inhibir, romper, disgregar o desintegrar depósitos de fibrilla o proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al cerebro o depósitos de proteína amiloide asociados al cerebro, así como la formación de fibrilla amiloide o la formación de fibrilla amiloide asociada a la edad y la formación de fibrilla amiloide asociada al cerebro; por lo tanto, promoverá la agudeza mental, promoverá el estado de alerta mental, proporcionará apoyo nutricional para la disminución cognitiva o de la memoria asociada a la edad, promoverá el bienestar cognitivo, apoyará la función cerebral, mejorará la capacidad cognitiva, el rendimiento mental o la memoria, promoverá la concentración y la agudeza mental, mejorará la vitalidad mental, promoverá mayor claridad mental y estado de alerta, mejorará la memoria a corto plazo, reducirá o invertirá la disminución cognitiva o de la memoria asociada a la edad, apoyará la función normal del cerebro, mejorará el aprendizaje o la memoria; mejorará la concentración, mejorará el rendimiento mental, reducirá el deterioro mental, reducirá la probabilidad de trastornos cerebrales relacionados con la edad, y mantendrá una buena salud cerebral.

Se prevé que las composiciones dadas a conocer también tendrán la capacidad de reducir, eliminar, prevenir, inhibir, romper, disgregar o desintegrar los depósitos de fibrilla o de proteína amiloide, los depósitos de fibrilla o de proteína amiloide asociados al páncreas, así como la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides, y la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas; por consiguiente apoyarán una función pancreática saludable y promoverán la función pancreática ayudando a promover la función normal de la insulina.

Las composiciones dadas a conocer también pueden incluir vehículos, diluyentes y/o excipientes comúnmente utilizados en las industrias farmacéutica y de los suplementos dietéticos y cualquiera de dichos agregados, como sabrán los expertos en el área, son aceptables y se pueden emplear sin apartarse del alcance de la invención.

Se da a conocer un método para aislar los constituyentes inhibidores del amiloide contenidos en el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, donde el método comprende los pasos siguientes:

a) extraer el té verde, las hojas, los extractos o los derivados del té verde con agua o con un solvente orgánico, b) eliminar los materiales insolubles, c) evaporar a sequedad o liofilizar para obtener un polvo, d) recuperar y redissolver los constituyentes inhibidores del amiloide obtenidos en agua o un solvente orgánico y e) inyectar y separar por cromatografía líquida a alta presión o baja presión.

Los constituyentes representativos del té verde incluyen catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados, aunque para los fines de esta divulgación esas sustancias también pueden ser opcionalmente derivadas sintéticamente o encontradas independientemente en otras fuentes vegetales.

El paso de la extracción del material vegetal con un solvente orgánico comprende además agregar inicialmente metanol a los materiales vegetales que están en polvo y agitar la mezcla resultante durante toda la noche. El solvente utilizado en el paso de la extracción de los ingredientes inhibidores del amiloide tiene preferentemente una polaridad que varía entre la del agua y la del pentanol. El paso de eliminación de los materiales insolubles se efectúa preferentemente mediante centrifugación del extracto y recolección del sobrenadante. El paso de concentración del extracto se efectúa preferentemente mediante evaporación rotatoria o liofilización (para los extractos acuosos). Luego de los pasos de extracción y centrifugación, el procedimiento de extracción y centrifugación se repite preferentemente 1 a 5 veces más y se recogen los sobrenadantes.

Luego de la repetición de los pasos de extracción y concentración, preferentemente, los sobrenadantes se juntan y se secan usando un evaporador rotatorio o liofilización (para los extractos acuosos). El polvo seco se lava con 4 volúmenes de éter de petróleo (se repite 4 veces), seguido de centrifugación (cada vez) a 2,500 X g durante 20 minutos, y de la recolección de los sobrenadantes y los sedimentos. Los sedimentos recogidos se secan al aire, se vuelven a extraer con agua y se centrifugan a 2,500 X g durante 20 minutos. Los sobrenadante recogidos

(denominados extractos acuosos) se liofilizan y los sedimentos o el polvo liofilizado del extracto acuoso se vuelven a disolver en acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético (TFA) para la inyección en un equipo de HPLC o cromatografía a baja presión. Los sedimentos disueltos se dividen en porciones iguales y se inyectan en un HPLC. El HPLC contiene preferentemente una columna C18 de 1 × 25 cm, aunque otros tamaños también pueden servir, y se mantiene a 30 °C con una velocidad de flujo de 2 ml/min. Las porciones de muestra inyectadas en el HPLC se eluyen con gradientes de A y B, tales como 0% de B durante 5 minutos, 0-15% de B de 5-10 minutos, 15-45% de B de 10-70 minutos, y 45-100% de B de 70-85 minutos; donde B = 95% de acetonitrilo con 0.5% de ácido acético en agua destilada y A = 5% de acetonitrilo con 0.5% de ácido acético en agua destilada. Se controlan los eluyentes del HPLC a todas las longitudes de onda y se recogen fracciones de 4 ml en un colector de fracciones y se obtienen picos combinados a diversos tiempos de retención (desde 0 hasta 85 minutos). Las fracciones obtenidas se pueden concentrar por liofilización una vez que se ha eliminado la mayor parte del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria.

Después las fracciones concentradas obtenidas se analizan en ensayos *in vitro* pertinentes para identificar los potentes inhibidores de la formación de fibrilla amiloide, o que disgregan/rompen o desintegran las fibrillas amiloides preformadas. Los ingredientes inhibidores del amiloide se extraen preferentemente del HPLC a tiempo de retención aproximados de 10 a 70 minutos.

También se da a conocer un método para tratar una enfermedad amiloide en un paciente, que comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados. El té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, se administran preferentemente por vía oral, por nebulización de aerosol, o en una forma inyectable o infundible por vía parenteral.

En los métodos dados a conocer, la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en un sujeto es inhibida mediante administración al sujeto de una dosis terapéutica de la invención. El término "sujeto" pretende incluir los organismos vivos en los cuales se puede producir amiloidosis. Los ejemplos de sujetos incluyen humanos, monos, vacas, ovejas, cabras, perros, gatos, ratones, ratas y sus especies transgénicas. La administración de té verde, hojas y extractos de té verde o sus derivados a un sujeto que se va a tratar, se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, en dosis y durante períodos eficaces para inhibir la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en el sujeto. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para alcanzar un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores como la cantidad de amiloide que ya se ha depositado en el sitio clínico del sujeto, la edad, el género y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto terapéutico para inhibir la amiloidosis en el sujeto.

Método representativo o realizaciones del proceso

Se presenta un método de tratamiento, prevención o manejo de una amiloidosis en un sujeto mamífero propenso a sufrir, o aquejado de, amiloidosis, donde el método comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad terapéutica de un material vegetal proveniente de una fuente de té verde, hojas de té verde, extracto de té verde estandarizado o derivados del té verde.

Un método para el tratamiento, la inhibición, la prevención o el manejo de la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis en un sujeto mamífero, donde el método comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una sustancia seleccionada del grupo de sustancias que consiste en té verde, hojas de té verde, extracto de té verde estandarizado, derivados de té verde, catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados.

La sustancia es preferentemente una catequina seleccionada del grupo de catequinas que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina o un derivado de alguno del grupo anterior.

En cualquiera de esas realizaciones, en el paso de administración de un material vegetal, también se puede administrar una cantidad eficaz de uno o más materiales vegetales seleccionados del grupo de plantas que consiste en, y comúnmente conocidas como, uña de gato, ginkgo biloba, romero, centella asiática, bacopin y ginseng.

Se presenta un método para el tratamiento, la inhibición, la prevención o el manejo de la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de fibrilla de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy o la atrofia multisistémica en un sujeto mamífero, donde el método comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad terapéutica de una sustancia seleccionada del grupo de sustancias que consiste en té verde, hojas de té verde, extracto de té verde estandarizado, derivados del té verde, catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados

La sustancia es preferentemente una catequina seleccionada del grupo de catequinas que consiste en catequina,

epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina o un derivado de alguno del grupo anterior.

5 Se presenta un método para promover el estado de alerta mental en un paciente, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta de la familia Theaceae, y preferentemente de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*. Este método también se puede usar para inhibir la formación de depósitos de amiloide en el cerebro.

10 Se presenta un método para promover, mantener o mejorar en un paciente una o más de las cualidades mentales o cognitivas seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas que consiste en agudeza mental, estado de alerta mental, bienestar cognitivo, función normal del cerebro, capacidad cognitiva, rendimiento mental, memoria, concentración, agudeza mental, claridad mental, memoria a corto plazo, función normal del cerebro y aprendizaje, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

15 Se presenta un método para proporcionar, apoyar o mejorar en un paciente una o más de las cualidades mentales o cognitivas seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas que consiste en función normal del cerebro, capacidad cognitiva y concentración, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

20 Se presenta un método para reducir en un paciente uno o más de los efectos mentales o cognitivos seleccionados del grupo de efectos mentales o cognitivos que consiste en disminución cognitiva o de la memoria asociada a la edad, disminución mental y probabilidad de trastornos cognitivos o cerebrales relacionados con la edad, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

30 Se presenta un método para reducir, romper, disolver, inhibir, eliminar o prevenir en un paciente una o más afecciones que involucran al cerebro seleccionadas del grupo de afecciones que involucran al cerebro que consiste en depósitos de fibrilla amiloide, depósitos de proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al cerebro, depósitos de proteína amiloide asociados al cerebro, formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas a la edad, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al cerebro, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

35 Se presenta un método para promover o apoyar la función pancreática saludable en un paciente, ayudando a promover la función normal de la insulina, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

40 Se presenta un método para reducir, romper, disolver, inhibir, eliminar o prevenir en un paciente una o más afecciones que involucran al páncreas seleccionadas del grupo de afecciones que involucran al páncreas que consiste en depósitos de fibrilla amiloide, depósitos de proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al páncreas, depósitos de proteína amiloide asociados al páncreas, formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas, donde el método comprende el paso de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

Uso representativo y/o realizaciones de las composiciones/los agentes

50 Se presenta el uso de una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados en la preparación de una composición farmacéutica o un suplemento dietético para el tratamiento, la prevención y/o el manejo de una amiloidosis en un sujeto mamífero propenso a sufrir, o aquejado de, amiloidosis.

55 Se presenta el uso de la fuente de té verde, hojas de té verde, extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados en la preparación de una composición farmacéutica o un suplemento dietético para inhibir la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de fibrilla amiloide o causar la disolución/ruptura o desintegración de las fibrillas amiloides preformadas.

60 Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para el tratamiento, la prevención o el manejo de la amiloidosis en un sujeto mamífero propenso a sufrir, o aquejado de, amiloidosis, donde la composición comprende una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados, y, si se desea, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente o dietéticamente aceptable.

Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para inhibir la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de fibrilla amiloide, o causar la disolución/disgregación y/o desintegración de las

fibrillas amiloides preformadas, donde la composición comprende una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados, y, si se desea, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o dietéticamente aceptable.

5 Se presenta el uso de catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados para el tratamiento, la prevención o el manejo de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis, en un sujeto mamífero propenso a sufrir la amiloidosis.

10 Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para el tratamiento, la prevención o el manejo de la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis en un sujeto mamífero propenso a sufrir dicha afección amiloide, donde la composición comprende catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados y, si se desea, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o dietéticamente aceptable.

15 Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para el tratamiento, la inhibición, la prevención o el manejo de la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de fibrilla de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy, o la atrofia multisistémica en un sujeto mamífero, donde la composición comprende una sustancia seleccionada del grupo de sustancias que consisten en té verde, hojas de té verde, extracto de té verde estandarizado, derivados de té verde, catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados.

20 Se presenta el uso de una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados, en la preparación de una composición farmacéutica o un suplemento dietético para proporcionar, apoyar o mejorar en un sujeto una o más de las cualidades mentales o cognitivas.

25 Se presenta el uso de una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados, en la preparación de una composición farmacéutica o un suplemento dietético para promover o apoyar la función pancreática saludable en un sujeto.

30 Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para proporcionar, apoyar o mejorar en un sujeto una o más de las cualidades mentales o cognitivas, que comprende una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados.

35 Se presenta una composición farmacéutica o un suplemento dietético para promover o apoyar la función pancreática saludable en un sujeto, que comprende una fuente de té verde, hojas de té verde o extracto de hojas de té verde estandarizado o sus derivados.

40 Se presenta un fármaco para promover, mantener o mejorar en un paciente una o más de las cualidades mentales o cognitivas seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas que consiste en agudeza mental, estado de alerta mental, bienestar cognitivo, función normal del cerebro, capacidad cognitiva, rendimiento mental, memoria, concentración, agudeza mental, vitalidad mental, claridad mental, memoria a corto plazo, función normal del cerebro y aprendizaje, y buena salud del cerebro, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

45 Se presenta un fármaco para proporcionar, apoyar o mejorar en un paciente una o más de las cualidades mentales o cognitivas seleccionadas del grupo de cualidades mentales o cognitivas que consiste en el apoyo nutricional para la disminución cognitiva o de la memoria relacionada con la edad, la función normal del cerebro, la capacidad cognitiva y la concentración, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

50 Se presenta un fármaco para reducir en un paciente uno o más de los efectos mentales o cognitivos seleccionados del grupo de efectos mentales o cognitivos que consiste en, disminución cognitiva o de la memoria asociada a la edad, disminución mental y probabilidad de trastornos cognitivos o cerebrales relacionados con la edad, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

55 Se presenta un fármaco para reducir, romper, disolver, inhibir o prevenir en un paciente una o más afecciones que involucran al cerebro seleccionados del grupo de afecciones que involucran al cerebro que consiste en depósitos de fibrilla amiloide, depósitos de proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al cerebro, depósitos de A $\beta$  en el cerebro, depósitos de A $\beta$  asociados al cerebro, depósitos de proteína amiloide asociados al cerebro, depósitos de amiloide cerebral, formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas a la edad, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una

planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

Se presenta un fármaco para promover o apoyar la función pancreática saludable en un paciente, ayudando a promover la función normal de la insulina, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

Se presenta un fármaco para reducir, romper, disolver, inhibir, eliminar o prevenir en un paciente una o más afecciones que involucran al páncreas seleccionadas del grupo de afecciones que involucran al páncreas que consiste en depósitos de fibrilla amiloide, depósitos de proteína amiloide, depósitos de fibrilla amiloide asociados al páncreas, depósitos de amilina, depósitos de polipéptido amiloide de los islotes, depósitos de proteína amiloide asociados al páncreas, formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas, donde el fármaco comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de material vegetal de una planta del género *Camellia*, especie *sinensis*.

Por un análisis más detallado e información de respaldo relativa al amiloide y la amiloidosis, la enfermedad de Alzheimer y la población envejecida, el amiloide como un objetivo terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, y la enfermedad de Parkinson y la formación de fibrilla de alfa-sinucleína, véanse la solicitud de patente en tramitación US 20030017998 y las patentes expedidas 6,037,327; 6,264,994 y 6,346,280.

Estas y otras características y ventajas se tornarán más evidentes al leer la descripción detallada siguiente conjuntamente con las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1 es un conjunto de estructuras para los derivados de catequina.

FIGURA 2 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo fluorométrico con tioflavina T utilizado para determinar los efectos dependientes de la dosis del extracto de hojas de té verde estandarizado en la inhibición de la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  1-40 de Alzheimer.

FIGURA 3 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo fluorométrico con tioflavina T utilizado para determinar los efectos, dependientes de la dosis, del extracto de hojas de té verde estandarizado en la disgregación/ruptura de las fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42 de Alzheimer.

FIGURA 4 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo espectrofotométrico de A $\beta$  teñida con rojo Congo para determinar los efectos del extracto de hojas de té verde estandarizado (de 2 fuentes comerciales) en la desintegración de fibrillas preformadas de A $\beta$  1-42 de Alzheimer.

FIGURA 5 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo fluorométrico con tioflavina T utilizado para determinar los efectos, dependientes de la dosis, de diferentes catequinas comerciales en la inhibición de la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  1-40 de Alzheimer.

FIGURA 6 es una fotomicrografía a color que muestra la inhibición por la epicatequina de la formación de fibrilla de A $\beta$  1-40 de Alzheimer.

FIGURA 7 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo fluorométrico con tioflavina T utilizado para determinar los efectos, dependientes de la dosis, de catequinas comerciales en la disgregación/ruptura de fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42 de Alzheimer.

FIGURA 8 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo fluorométrico con tioflavina T utilizado para determinar los efectos, dependientes de la dosis, de diferentes catequinas comerciales en la inhibición de la formación de fibrilla de NAC (también denominada "NAC-P") de la enfermedad de Parkinson.

FIGURA 9 muestra fotomicrografías en blanco y negro de depósito de amiloide en bazo en un modelo de ratón de amiloidosis AA experimental.

FIGURA 10 muestra fotomicrografías en blanco y negro del depósito de amiloide en el hígado en un modelo experimental de amiloidosis AA en ratón.

FIGURA 11 es un gráfico que muestra el efecto de compuestos polifenólicos específicos en la disgregación/ruptura de fibrillas amiloides preformadas que consisten en polipéptido amiloide de los islotes (IAAP).

FIGURA 12 es un gráfico de espectroscopia de dicroísmo circular que muestra la ruptura por la epicatequina de la estructura de hoja  $\beta$  de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42.

FIGURA 13 es un gráfico que muestra la inhibición del amiloide esplénico por la epicatequina, pero no por el hidrato de catequina, en un modelo experimental de amiloidosis sistémica AA en ratón.

FIGURA 14 muestra fotomicrografías en blanco y negro de la inhibición por la epicatequina del depósito de amiloide AA esplénico en un modelo de amiloidosis sistémica AA en ratón.

FIGURA 15 ilustra las estructuras de algunos de los compuestos polihidroxilados aromáticos concebidos para tener actividad anti-amiloide.

Mejor manera de llevar a cabo la invención

Considerando ahora las figuras y los ejemplos, la invención se describirá en las realizaciones preferidas mediante referencia detallada a ellas.

## Algunas definiciones

5 "Análogos y derivados farmacéuticamente aceptables". Los análogos y derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto reivindicado incluyen diversos tipos de sustituciones del grupo R, y todas las otras modificaciones estructurales derivadas que no afecten la eficacia dada a conocer de estos compuestos.

10 "Pureza porcentual". Las composiciones dadas a conocer contienen una o más catequinas o derivados del té verde, donde cada catequina o derivado del té verde está presente en la composición en una proporción porcentual o pureza porcentual que "excede significativamente" una proporción porcentual de la presencia natural de la misma sustancia en una planta o en un extracto de la planta. Por ejemplo, suponga que una catequina particular está presente en una planta en un porcentaje en peso de 0.01% y está presente en un extracto de la planta en un porcentaje en peso de 1.0%. En una composición dada a conocer entonces, la misma catequina está presente en la composición en un porcentaje en peso que es significativamente mayor que 0.01% o 1.0%, digamos 10%. Asimismo se pueden aplicar otras proporcionalidades en la misma línea, como composición porcentual o presencia porcentual en volumen, o pureza porcentual.

20 A modo de otro ejemplo, sin limitar el alcance de la invención a este u otros ejemplos, una catequina está presente en un comprimido que se va a administrar por vía oral de conformidad con lo dado a conocer en este documento. La catequina es una catequina aislada presente en una pureza porcentual de 98.5% (es decir, la catequina es 98.5% pura, según se mide por los indicios de pureza convencionales, como por ejemplo una única banda de pico afilado característica en un HPLC). La catequina particular es sin embargo sólo un 15% en peso de los ingredientes del comprimido. Se sabe que la catequina está presente en una planta en un peso seco porcentual de 0.06, si bien algunos extractos de la misma planta se sabe que contienen hasta 0.75 por ciento de peso seco porcentual de la misma catequina. En este ejemplo, la catequina está proporcionalmente más presente en el comprimido que en el extracto en una relación de 20: 1, y esta es una medida de que excede significativamente la proporción de presencia porcentual natural en una planta o extracto de la planta.

30 En general, una catequina presente en una forma farmacéutica administrada terapéuticamente que tiene un porcentaje de la catequina (en peso, peso seco, volumen o pureza) que es 10 veces (o más) mayor que la presencia porcentual natural de la misma catequina en una planta es un porcentaje que "excede significativamente" la presencia porcentual natural de la catequina en la planta. Cuando se habla de extractos de una planta en este contexto, se debe notar que sólo se deben considerar los extractos convencionales o naturales (jugos, concentrados y similares, o extractos conocidos y utilizados para otros fines), no extractos nuevos preparados después de la fecha de prioridad de esta divulgación cuyo efecto es concentrar la catequina particular para negativizar un resultado de "que excede significativamente", según se acaba de definir. También se debe notar que en algunos casos, un resultado de "que excede significativamente" puede estar justificado con una relación tan pequeña como 2:1, pero más preferentemente tan grande como 50:1 a 100:1.

40 En el ejemplo de un solo compuesto de catequina con un excipiente para completar la composición, puede ser conveniente simplemente notar y comparar la pureza porcentual del compuesto en la composición en vez de su porcentaje en peso global, a los efectos del patrón de "que excede significativamente", según se reivindica. En el caso de mezclas de catequinas puede ser adecuado ver una composición porcentual combinada de las catequinas mezcladas en la dosis terapéutica y comparar ese valor con una presencia porcentual combinada de las mismas catequinas en la planta natural o el extracto.

50 En cualquier caso, el propósito del patrón de medición dado a conocer es establecer un margen equitativo mediante el cual una composición reivindicada excede la incidencia natural de principios activos en las plantas y los extractos convencionales de las plantas.

55 Las composiciones preferidas contendrán catequina que es al menos sustancialmente pura. La catequina que está en forma aislada sustancialmente pura o sintética también se puede emplear ventajosamente. En general "pura" significa más de 95% pura y catequina "sustancialmente pura" significa una catequina purificada mediante extracción u otros medios conocidos o medios dados a conocer en este documento, de modo que la catequina esté presente en la dosis terapéutica con sólo aquellas impurezas que no pueden ser fácilmente ni razonablemente eliminadas mediante los procesos de extracción o purificación. "Aislada" significa que la catequina en cuestión no está acompañada en la forma terapéutica por cantidades significativas de otras catequinas. Un compuesto "aislado puro" es un compuesto en forma aislada purificado como es convencional para los principios activos en la industria farmacéutica.

60 A. Método de cultivo celular para generar amiloide AA

Varios estudios previos indican que se puede lograr la formación de amiloide AA en sistemas modelo de cultivo celular (Shirahama et al, *Lab. Invest.* 62:61-68, 1990; Palm et al, *APMIS* 105:603-608, 1997; Kluge-Beckerman et al,

5 *Am. J. Path.* 155:123-133, 1999). Probablemente el mejor sistema de cultivo celular en el cual producir proteína amiloide AA fibrilar fue descrito por Kluge-Beckerman et al (*Am. J. Path.* 155:123-133, 1999). En este sistema *in vitro*, se mantuvieron macrófagos peritoneales de múrido (aislados de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 normales), a los cuales se les agregaron SAA2 recombinante (rSAA2) en un medio de pH neutro y/o factor potenciador del amiloide (AEF) (que se trata más adelante). El medio que contenía SAA2 recombinante se usó a la concentración típica que se observa en el suero en fase aguda (es decir 140 µg/ml). Dentro de las 24 a 48 horas posteriores al tratamiento, los cultivos desarrollaron focos de depósitos de amiloide AA, que aumentaron de tamaño y se tornaron cada vez más congofílicos y birrefringentes (luego de la tinción con rojo Congo según se ve bajo la luz polarizada). Este estudio demostró que SAA2 era escindida por los macrófagos para formar la proteína amiloide AA (fragmento de ~8.5 kDa) en cultivo, que fue fibrilar (según se demostró mediante birrefringencia luego de la tinción con rojo Congo y fluorescencia con tioflavina S). Se encontró que las células peritoneales eran viables (según se determinó mediante tinción por exclusión con azul de tripano) y mantuvieron la actividad de fagocitosis (según se demostró mediante la fagocitosis de las perlas de látex). Además, los cultivos de células peritoneales obtenidos de ratones atímicos mostraron una formación y un depósito de amiloide similares en cultivo, lo que indica que los linfocitos T no fueron esenciales para la formación de fibrilla amiloide.

10 Aunque no se requirió AEF, su agregado al medio de cultivo resultó en un mayor número de depósitos de amiloide más grandes. También se observó que se deposita una mayor cantidad de amiloide AA fibrilar en el cultivo, cuando los cultivos se trataron con pepstatina, un inhibidor de la proteasa aspártica (Kluge-Beckerman et al, *Am. J. Path.* 155:123-133, 1999). Esos cultivos también mantuvieron una viabilidad similar a la de los cultivos sin tratar, incluso durante tanto tiempo como 24 días. Los cultivos tratados con pepstatina desarrollaron grandes áreas de masas densas y localizadas de amiloide asociadas a agrupaciones de células.

15 Este sistema de cultivo celular es tanto fácil emplear como dócil de manipular para el desarrollo de depósitos y la persistencia de amiloide AA *in vitro*.

#### Un modelo pertinente de amiloidosis AA experimental en ratón

20 Existen varios buenos modelos animales experimentales para la producción de amiloidosis sistémica AA *in vivo*. Estudios anteriores que implicaban inyecciones repetidas de azocaseína (derivada de la caseína) demostraron que se producía acumulación de amiloide AA en el bazo, el hígado y el riñón entre 14 y 21 días después del tratamiento (Janigan y Druet, *Am. J. Path.* 48:1013-1024, 1966). En este modelo, la inyección de azocaseína produjo un absceso estéril, que causó una reacción inflamatoria que indujo niveles séricos elevados de SAA en el ratón (Kindy y DeBeer, *Methods Enzym.* 309:701-716, 1999). Los depósitos de amiloide AA fueron fibrilares como indica su reacción positiva a la tinción con rojo Congo (es decir birrefringencia roja/verde según se observa bajo la luz polarizada).

25 En modelos animales más recientes, el depósito de amiloide sistémico AA puede ser inducido rápidamente en ratones CBA/J luego de una única inyección subcutánea de nitrato de plata al 2% (el estímulo inflamatorio) más una única inyección intravenosa de factor potenciador del amiloide (AEF) (que se trata más adelante). En este modelo, el depósito de amiloide AA se produce primero en el bazo (en 24-48 horas), después en el hígado (en 3-4 días), seguido del riñón (en 5-7 días) (Axelrad et al, *Am. J. Path.* 78:277-284, 1975; Kisilevsky et al, *Lab. Invest.* 37:544-553, 1977). Hemos utilizado extensamente este modelo con anterioridad para estudiar el desarrollo de la amiloidosis AA y el papel que desempeñan los proteoglucanos/glucosaminoglucanos específicos en la formación del amiloide (Kisilevsky et al, *Appl. Path.* 2:308-315, 1984; Snow et al, *Lab. Invest.* 53:37-44, 1985; *Lab. Invest.* 56:665-675, 1987; *Lab. Invest.* 57:687-698, 1987; *J. Histochem. Cytochem.* 39:1321-1330, 1991). Este modelo experimental pertinente ya está en uso y se utiliza específicamente para identificar y probar la eficacia de potenciales fármacos para el amiloide AA, según se describe más adelante.

30 El modelo experimental de ratón CBA/J (como el descrito antes) es un sistema ideal para probar la eficacia de los potenciales fármacos para el amiloide AA porque luego de un estímulo inflamatorio (por ejemplo nitrato de plata) y AEF, 100% de los animales de prueba depositarán amiloide en los tejidos en el plazo de unos pocos días. Si bien sólo un pequeño porcentaje de los pacientes con proteínas precursoras desarrollan realmente amiloide, todos los animales en este modelo experimental lo hicieron. La reacción inflamatoria en los ratones CBA/J, a diferencia de la artritis reumatoide o la osteomielitis, por ejemplo, da como resultado la aparición de todos los prerrequisitos para que se produzca depósito de amiloide.

35 El AEF reduce dramáticamente el tiempo necesario para la inducción experimental del depósito de amiloide AA en ratones CBA/J y se puede demostrar en tejidos 24 a 48 horas antes de la aparición del amiloide (Axelrad et al, *Lab. Invest.* 47:139-146, 1982). Aunque la identidad real del AEF no se ha resuelto totalmente, se cree que es generalmente de naturaleza proteica (Axelrad et al, *Lab. Invest.* 47:139-146, 1982), o consiste en pequeños nidos de material semejante a fibrilla amiloide, material que contiene abundante hoja β (Kisilevsky et al, *Amyloid. Int. J. Exp. Clin. Invest.* 6:98-106, 1999). El AEF se prepara generalmente a partir de bazos y/o hígados cargados de amiloide de animales a los que se les indujo previamente la acumulación de amiloide AA luego de inyecciones diarias de azocaseína o inyecciones únicas de AEF y nitrato de plata. Esos tejidos amiloidóticos se homogeneizan en solución

salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene inhibidores de la proteasa, y el sedimento se vuelve a homogeneizar varias veces. Del segundo al cuarto sobrenadantes (obtenidos luego de las extracciones acuosas) contienen generalmente una potente actividad de AEF que se utiliza para inducir rápidamente el depósito de AA en animales.

Se busca desesperadamente el descubrimiento y la identificación de nuevos compuestos o agentes como potenciales fármacos para detener la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloide fibrilar que ocurren en la enfermedad de Alzheimer, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras amiloidosis, y la fibrillogénesis en la enfermedad de los cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson y la atrofia multisistémica.

Uso de catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos (o sus derivados) del té verde, las hojas de té verde, los extractos de té verde o los derivados del té verde, o de otras fuentes naturales o sintéticas.

Se sabe que el té verde y otras fuentes naturales como el té negro y el vino contienen catequinas, bioflavonoides, flavanoles, flavandioles, flavonoides, taninos o sus derivados. Véase Sugita-Konishi et al, "Epigallocatechin gallate and gallic acid inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic E. coli", *Biochemica et Biophysica Acta*, 1472, 42-50 (1999), y Fernandez et al, "HPLC determination of catechins and caffeine in tea", *Analyst* 125: 421-425 (2000). Se creen la actualidad que esos constituyentes desempeñan un papel importante en los efectos sorprendentemente beneficiosos del té verde sobre la amiloidosis, según se trata más adelante.

En particular nosotros creemos ahora que las catequinas del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y/o galato de epicatequina o un derivado de alguno del grupo anterior, ya sea solos o en combinación con otros inhibidores del amiloide como cualquier material vegetal del grupo de plantas que consiste en, y comúnmente conocidas como, uña de gato, ginkgo biloba, romero, centella asiática, bacopin y ginseng, lograrán cualquiera o todos los efectos beneficiosos que se describen más adelante.

Las estructuras generales para las catequinas representativas se presentan en la figura 1. Se espera que los análogos y derivados farmacéuticamente aceptables de estas estructuras de catequina, como por ejemplo varios tipos de sustituciones del grupo R, y otras modificaciones estructurales derivadas que no afectan la eficacia divulgada de estos compuestos se puedan realizar sin afectar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Uso del extracto de hojas de té verde estandarizado para inhibir la amiloidosis

Los ejemplos que se ilustran a continuación sirven todos para establecer bien que al menos *in vitro*, el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, tienen la capacidad de inhibir la formación de los depósitos de amiloide cerebrales que se producen durante el envejecimiento normal en una diversidad de trastornos cerebrales que incluyen la enfermedad de Alzheimer. Además, se sabe que los pacientes que acumulan depósitos de amiloide en el cerebro con el tiempo pierden la capacidad cognitiva y la función de la memoria y mantienen una marcada disminución de la claridad mental en general. Por consiguiente se entiende que la inhibición de dichos depósitos de amiloide cerebrales promoverá al menos el estado de alerta mental en dichos pacientes.

Los ejemplos también establecen que nuevamente, al menos *in vitro*, el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, tienen la capacidad de reducir, eliminar, prevenir, inhibir, romper/disolver o desintegrar los depósitos de fibrilla o proteína amiloide, así como la formación de fibrilla amiloide, o la formación de fibrilla amiloide asociada a la edad y la formación de fibrilla amiloide asociada al cerebro. Además, se sabe que los pacientes que acumulan depósitos de fibrilla o proteína amiloide, depósitos de fibrilla asociados al cerebro o depósitos de proteína amiloide asociados al cerebro, o que presentan síntomas de formación y multiplicación de fibrillas amiloides o formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas a la edad, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al cerebro, en general, perderán con el tiempo la agudeza mental, el estado de alerta mental, la concentración, el bienestar cognitivo o en alguna medida la función cerebral, o la capacidad cognitiva, el rendimiento mental o la memoria, o la concentración y la agudeza mental, o la vitalidad mental, o la claridad mental y el estado de alerta, la memoria a corto plazo o algo de la capacidad para aprender y recordar. También se sabe que dichos pacientes están sujetos a la disminución cognitiva o de la memoria asociada o relacionada con la edad, o mantendrán una marcada disminución en la claridad mental.

Se deduce entonces que la inhibición, reducción, eliminación, prevención, ruptura, disgregación o desintegración de dichos depósitos de fibrilla o proteína amiloide, los depósitos de fibrilla amiloide asociados al cerebro o los depósitos de proteína amiloide asociados al cerebro, o la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides, o la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides asociadas a la edad, mejorarán la agudeza mental, promoverán en estado de alerta mental, proporcionarán apoyo nutricional para la disminución cognitiva o de la memoria relacionada con la edad, promoverán el bienestar cognitivo, apoyarán la función cerebral, mejorarán la capacidad cognitiva, el rendimiento mental o la memoria, promoverán la concentración y la agudeza mental, mejorarán la vitalidad mental, promoverán mayor claridad mental y estado de alerta, mejorarán la memoria a corto plazo, reducirán o revertirán la

disminución cognitiva o de la memoria asociada a la edad, apoyarán la función normal del cerebro, mejorarán el aprendizaje o la memoria; mejorarán la concentración, potenciarán el rendimiento mental, reducirán la disminución mental, reducirán la probabilidad de trastornos cerebrales relacionados con la edad y mantendrán una buena salud cerebral, en dichos pacientes.

5 Los ejemplos sugieren además que el té verde, las hojas y los extractos de té verde o sus derivados, deberían tener la capacidad de reducir, eliminar, prevenir, inhibir, romper, disgregar o desintegrar depósitos de fibrilla o proteína amiloide, depósitos de fibrilla o proteína amiloide asociados al páncreas, así como la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides, y la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas. Además, se sabe  
10 que los pacientes que acumulan depósitos de fibrilla o proteína amiloide, depósitos de fibrilla o proteína amiloide asociados al páncreas, o los que presentan síntomas de formación y multiplicación de fibrillas amiloides, formación y multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas, pierden en general la función pancreática saludable o tienen una disminución en la función normal de la insulina, lo que conduce a la pérdida o disminución de la función pancreática. Se deduce que la inhibición, la reducción, la eliminación, la prevención, la ruptura, la disgregación, la disolución o la desintegración de dichos depósitos de fibrilla o proteína amiloide, depósitos de fibrilla o proteína amiloide asociados al páncreas, o la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides, la formación y la multiplicación de fibrillas amiloides asociadas al páncreas, apoyarán la función pancreática saludable y promoverán la función pancreática ayudando a promover la función normal de la insulina en dichos pacientes.

20 Estudios recientes, publicados luego de la fecha de prioridad de esta solicitud, respaldan aún más ahora estos resultados experimentales. Véase Hasegawa, "Preventive effect of Japanese green tea against cognitive impairment in the elderly", posters 42 y 755, actas del Congreso mundial de Alzheimer 2000, en *Neurobiology of Aging*, 21:18 (2000), informan una relación estadísticamente significativa entre el aumento del consumo de té verde y el incremento en los niveles cognitivos.

#### 25 **Ejemplos:**

Los ejemplos siguientes se presentan para proporcionar a los expertos la divulgación, la descripción y el uso de extractos de té verde y catequinas comerciales, que sorprendentemente se demuestra que causan una inhibición,  
30 disgregación/ruptura de las fibrillas que contienen A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer y las fibrillas de NAC de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo no debe interpretarse que la invención se limita a estos ejemplos específicos.

#### 35 **Ejemplo 1:**

El extracto de hojas de té verde estandarizado es un potente inhibidor de la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  (1-40) de la enfermedad de Alzheimer

Se empleó inicialmente un método descrito previamente para medir la formación de fibrilla amiloide que utiliza fluorometría con tioflavina T (H Naiki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; H Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; H Levine III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, *Lab. Invest.* 74:374-383, 1996) para identificar si el extracto de té verde estandarizado era capaz de inhibir la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer. Usando este ensayo sensible, se demostró previamente que cualquier disminución o aumento en la fluorescencia se correlaciona con una disminución o un aumento en la cantidad de fibrillas amiloides  
45 (H Naiki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; H Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; H Levine III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, *Lab. Invest.* 74:374-383, 1996), lo que permite determinar los efectos de los potenciales inhibidores y/o potenciadores de la formación de fibrilla amiloide.

En un primer estudio, se evaluaron los efectos del extracto de té verde estandarizado como un potente agente inhibidor del amiloide de la enfermedad de Alzheimer sobre la formación de fibrilla de A $\beta$  (1-40) de Alzheimer mediante fluorometría con tioflavina T. Se sabe que la tioflavina T se une a proteínas amiloides fibrilares, y un aumento en la fluorescencia se correlaciona con un aumento en la formación de fibrilla amiloide, en tanto una disminución en la fluorescencia se correlaciona con una disminución en la formación de fibrilla amiloide. La proteína A $\beta$  (1-40) de Alzheimer cuando se incubaba a 37 °C tiende a formar espontáneamente fibrillas amiloides que aumentan en cantidad con el tiempo. En este estudio, probamos el extracto de té verde estandarizado para impedir que la proteína A $\beta$  amiloide de Alzheimer forme fibrillas durante un período de 1 semana. Para este estudio, se incubaron 25  $\mu$ M de A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU; Lote N° WM365) en tubos de microcentrifuga a 37 °C durante 1 semana (por triplicado), ya sea sola, o en presencia de 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml o 100  $\mu$ g/ml de extracto de té verde estandarizado en Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, de pH 7.0 (TBS). Para este estudio, se extrajo el polvo de una cápsula de gelatina de extracto de té verde estandarizado obtenida de una fuente comercial (Nature's Resource, Mission Hills, CA) en 1 ml de agua destilada y se sedimentó usando una microcentrifuga (durante 10 minutos a 2,500 X g). Después se tomó el sobrenadante y se liofilizó. Después se preparó una solución de trabajo de 1 mg/ml para usar en los ensayos *in vitro* que se describen más adelante usando agua destilada. Los extractos de hojas de  
60 té verde comerciales generalmente se estandarizan a 50% de polifenoles.

Para evaluar los efectos del extracto de té verde estandarizado sobre la formación de fibrilla de A $\beta$  (1-40), se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l de cada tubo para análisis 1 h, 1 día, 3 días y 1 semana después. Para cada determinación descrita antes, luego de cada período de incubación, se agregaron 50  $\mu$ l de A $\beta$  +/- extracto de té verde estandarizado a 1.2 ml de tioflavina T 100  $\mu$ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO $_4$  50 mM (pH 6.0). Los estudios indicaron que mayores concentraciones de A $\beta$  fibrilar causaron un aumento proporcional en la fluorescencia en presencia de tioflavina T 100  $\mu$ M, descartando la presencia de cualquier efecto desproporcionado de filtro interno en estos estudios. La emisión de fluorescencia a 482 nm se midió en un fluorómetro Turner modelo 450 a una longitud de onda de excitación de 450 nm. Para cada determinación, el fluorómetro se calibró llevando a cero en presencia del reactivo de tioflavina T solo, y fijando la riboflavina 50 ng/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) en el reactivo de tioflavina T en 1800 unidades de fluorescencia. Todas las determinaciones de fluorescencia se basaron en esas referencias y toda fluorescencia emitida por cualquiera de los compuestos en presencia del reactivo de tioflavina T se sustrajo de las lecturas pertinentes.

En todos los estudios de fibrillogénesis usando fluorometría con tioflavina T, según se dio a conocer en este documento, las comparaciones de proteína amiloide en presencia o ausencia de extracto de té verde estandarizado se basaron en pruebas t de Student para datos apareados mostrándose los datos como la media +/- la desviación estándar. La significancia se informó a niveles de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ), 99% ( $p < 0.01$ ) y 99.5% ( $p < 0.005$ ).

Como se muestra en la figura 2, los efectos del extracto de hojas de té verde estandarizado sobre la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  (1-40) en la enfermedad de Alzheimer se evaluó durante un período de incubación de 1 semana. A $\beta$  (1-40) sola, recién suspendido, luego de 1 hora de incubación a 37 °C mostró una fluorescencia inicial de 183 +/- 10 unidades de fluorescencia. Durante el período de incubación de 1 semana, hubo un aumento gradual en la fluorescencia de A $\beta$  (1-40) sola, que aumentó aproximadamente en 4 veces desde 1 hora a 1 día, observándose un pico de fluorescencia de 852 +/- 3 unidades de fluorescencia 1 día después (Figura 2), lo que es coherente con los estudios anteriores (Castillo et al, *J. Neurochem.* 69:2452-2465, 1997). El extracto de hojas de té verde estandarizado inhibió significativamente la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  (1-40) de manera dependiente de la dosis tan pronto como luego de 1 hora de incubación (Figura 2). Se observó una inhibición significativa ( $p < 0.005$ ) por el extracto de hojas de té verde estandarizado sobre la formación de fibrilla de amiloide A $\beta$  1-40 a todos los tiempos incluidos 1 hora, 1 día, 3 días y 1 semana (Figura 2). Después de 1 hora, 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml de extracto de hojas de té verde estandarizado inhibieron significativamente ( $p < 0.005$ ) la formación de fibrilla de A $\beta$  1-40 en 50.3 +/- 3.3%, 66.1 +/- 3.3%, y 95.1 +/- 1.6%, respectivamente. Después de 1 día, 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml de extracto de hojas de té verde estandarizado inhibieron significativamente ( $p < 0.005$ ) la formación de fibrilla de A $\beta$  1-40 en 36.7 +/- 2.0%, 90.7 +/- 1.0%, y 95.9 +/- 2.0%, respectivamente. Después de 1 semana, 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml de extracto de hojas de té verde estandarizado inhibieron significativamente ( $p < 0.005$ ) la formación de fibrilla de A $\beta$  1-40 en 58.9 +/- 10.7%, 83.0 +/- 1.8%, y 89.3 +/- 2.1%, respectivamente. Este dato inicial indicó que el extracto de hojas de té verde estandarizado y al menos uno de sus constituyentes activos catequina, bioflavonoide, flavanol, flavandiol, flavonoide o tanino fue un potente inhibidor de la formación de fibrilla amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 2:

Disgregación/ruptura de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer por el extracto de hojas de té verde estandarizado

En el estudio siguiente, se probó la capacidad del extracto de hojas de té verde estandarizado para causar una disgregación/ruptura de las fibrillas amiloides preformadas de la enfermedad de Alzheimer que contienen A $\beta$  1-42. Este tipo de actividad sería importante para cualquier potencial compuesto anti-amiloide que pueda usarse en pacientes que ya tengan un depósito de amiloide considerable en órganos y/o tejidos. Por ejemplo los pacientes con enfermedad de Alzheimer en una etapa de la enfermedad entre intermedia y tardía tienen abundantes depósitos de amiloide que contiene A $\beta$  en sus cerebros, como parte tanto de las placas neuríticas como de los depósitos de amiloide cerebrovasculares. Un compuesto capaz de causar la disgregación/ruptura de los depósitos de amiloide preexistentes sería ventajoso para usar en esos pacientes que están en etapas tardías del proceso patológico.

Para este estudio, se disolvió 1 mg de A $\beta$  1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; Lote N° 516817) en 1.0 ml de agua destilada (solución de 1 mg/ml). Después se incubó A $\beta$  1-42 25  $\mu$ M durante toda la noche (~18 horas) a 37 °C, en presencia o ausencia de 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml o 200  $\mu$ g/ml de extracto de hojas de té verde estandarizado en presencia de Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM (pH 7.0) con azida de sodio al 0.02%. En esos estudios (véase resultados descritos a continuación y en la figura 3), la relación A $\beta$  1-42:extracto de té verde fue de 1:0.1, 1:1 y 1:2, respectivamente.

Para este estudio, se extrajo el polvo de una cápsula de gelatina de extracto de té verde estandarizado obtenida de una fuente comercial (Nature's Resource, Mission Hills, CA) en 1 ml de agua destilada y se sedimentó usando una microcentrifuga (durante 10 min a 2,500 X g). Después se tomó el sobrenadante y se liofilizó. Después se preparó

una solución de trabajo de 1 mg/ml para usar en los ensayos *in vitro* descritos a continuación usando agua destilada. Los extractos de hojas de té verde comerciales generalmente se estandarizan a 50% de polifenoles.

Se empleó un método descrito previamente para medir la formación de fibrilla amiloide utilizando fluorometría con tioflavina T (H Naiki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; H Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; H Levine III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, *Lab. Invest.* 74:374-383, 1996), para evaluar si el extracto de hojas de té verde estandarizado es capaz de causar una disgregación/ruptura de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que la tioflavina T se une a las proteínas amiloides fibrilares, y un aumento en la fluorescencia se correlaciona con un aumento en la formación de fibrillas amiloides, en tanto una disminución en la fluorescencia se correlaciona con una disminución de las fibrillas amiloides debido a disgregación y/o ruptura. La proteína A $\beta$  (1-42) de la enfermedad de Alzheimer cuando se coloca en solución, con agua destilada, tiende a formar espontáneamente fibrillas amiloides. Usando este ensayo sensible, se demostró previamente que cualquier disminución o aumento en la fluorescencia se correlaciona con una disminución o un aumento en la cantidad de fibrillas amiloides (H Naiki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; H Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; H Levine III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, *Lab. Invest.* 74:374-383, 1996), lo que permite identificar y cuantificar la magnitud de potenciales inhibidores y/o potenciadores de la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer.

Para evaluar los efectos del extracto de té verde estandarizado sobre la posible disgregación/ruptura de las fibrillas de A $\beta$  1-42 preformadas, se agregaron 50  $\mu$ l de A $\beta$  1-42 +/- extracto de hojas de té verde estandarizado a diversas concentraciones (descrito antes) a 1.2 ml de tioflavina T 100  $\mu$ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO $_4$  50 mM (pH 6.0) para las lecturas fluorométricas (como se describe en el ejemplo 1).

Como se muestra en la figura 3, mayores cantidades de extracto de hojas de té verde estandarizado causaron una disgregación/ruptura, dependiente de la dosis, de las fibrillas preformadas de A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer. A $\beta$  1-42 sola, mostró una fluorescencia media de 780 +/- 50 unidades de fluorescencia (Figura 3). El extracto de té verde estandarizado a una concentración de 10  $\mu$ g/ml causó una disgregación/ruptura significativa ( $p < 0.05$ ) de fibrillas de A $\beta$  1-42 en 17+7%. Por otra parte, 100  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/ml causaron una disgregación/ruptura significativa ( $p < 0.005$ ) de fibrillas de A $\beta$  1-42 en 76+/-1.0% y 85+/-4.0%, respectivamente. Este estudio demostró que el extracto de té verde estandarizado y al menos uno de sus principios activos catequina, bioflavonoide, flavanol, flavandiol, flavonoide o tanino causó una disgregación/ruptura de las fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42 que fue eficaz de manera dependiente de la dosis.

### Ejemplo 3

Desintegración de las fibrillas de A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer por el extracto de hojas de té verde estandarizado

En el estudio siguiente se modificó un ensayo espectrofotométrico de A $\beta$ -rojo Congo (Klunk et al, *Anal. Biochem.* 266:66-76, 1999) para determinar la eficacia del extracto de hojas de té verde estandarizado sobre la desintegración del amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer. Para este ensayo se incubaron 25  $\mu$ M de A $\beta$  1-42 (Bachem Inc., Torrance CA, Lote N° 516817) por triplicado, durante 4 días, en agua destilada a 37 °C en presencia o ausencia de 400  $\mu$ g/ml de extracto de té verde estandarizado (obtenido de dos fuentes comerciales) en solución salina amortiguada con Tris (TBS) (Tris 100 mM; NaCl 50 mM; pH 7.0, con azida de sodio al 0.02%). La relación en peso A $\beta$ : extracto de té verde estandarizado fue de 1:4. La fuente 1 del extracto de té verde estandarizado utilizado en este estudio fue Sundown Herbals (fabricado y distribuido por Sundown Vitamins, Boca Raton, FL), en tanto la fuente 2 del extracto de té verde estandarizado utilizado en este estudio fue Nature's Resource (Mission Hills, CA). Los tés verdes utilizados en este estudio se extrajeron en agua destilada según se describió en los ejemplos 1 y 2.

Luego de la incubación de A $\beta$  1-42 en presencia o ausencia de los extractos de té verde estandarizados (como los descritos antes) (los extractos de té verde estandarizados de las 2 fuentes se denominan compuestos de prueba), se agregaron 50  $\mu$ l de rojo Congo 360  $\mu$ M (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU) en agua destilada a 250  $\mu$ l de cada mezcla de incubación, dando una relación molar final A $\beta$ :rojo Congo de 1:3. Después de 10 minutos, se determinó la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia para compensar la absorbancia del rojo Congo solo a 540 nm) y 540 nm (absorbancia de la muestra donde "muestra" se refiere a A $\beta$  sola, compuesto de prueba solo, o A $\beta$  + compuesto de prueba, todos en presencia de rojo Congo) usando un lector de placas Biorad Modelo 550 ELISA (Biorad, Hercules, CA, EE.UU). La absorbancia a la longitud de onda de 405 nm se sustrajo automáticamente mediante el lector de placas ELISA de la absorbancia a la longitud de onda de 540 nm (la diferencia se denomina  $\Delta$  de absorbancia) (Klunk et al, *Anal. Biochem.* 266:66-76, 1999). Por consiguiente, La lectura de  $\Delta$  de absorbancia a 540 nm fue proporcional a la cantidad de A $\beta$  agregado que quedó en solución (Klunk et al, *Anal. Biochem.* 266:66-76, 1999).

En todos los experimentos que involucran compuestos de prueba, la lectura de  $\Delta$  de absorbancia a 540 nm de los compuestos de pruebas solos (en ausencia de A $\beta$ ), se sustrajo siempre de la lectura de  $\Delta$  de absorbancia

correspondiente a 540 nm del compuesto de prueba en presencia de A $\beta$ .

Usando esta modificación del método de Klunk et al (*Anal. Biochem.* 266:66-76, 1999), el uso de una concentración final mayor de rojo Congo (es decir 60  $\mu$ M en vez de 14  $\mu$ M) (*Anal. Biochem.* 266:66-76, 1999), en presencia de A $\beta$  fibrilar dio una absorbancia global a 540 nm que estuvo siempre por debajo de 1.0 unidades de absorbancia (AU), y bien dentro del rango lineal de absorbancia.

Se analizaron los extractos de hojas de té verde estandarizados de dos fuentes comerciales usando el ensayo espectrofotométrico de A $\beta$ -rojo Congo descrito antes para determinar su eficacia en desintegración de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer.

Como se muestra en la figura 4, ambos extractos de hojas de té verde estandarizados comerciales causaron una desintegración de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 previamente agregadas, según se determinó usando el ensayo espectrofotométrico con rojo Congo descrito antes. A $\beta$  1-40 sola mostró una media de  $\Delta$  de absorbancia de 0.141 $\pm$ 0.013 AU (Figura 4). El extracto de té verde de la fuente 1 (Sundown Herbals) causó una desintegración significativa ( $p < 0.005$ ) 52.5  $\pm$  8.5% de las fibrillas de A $\beta$  1-42 25  $\mu$ M cuando se los incubó a una relación en peso A $\beta$  1-42:extracto de té verde de 1:4 (Figura 4). Por otra parte, el extracto de té verde estandarizado de la fuente 2 (Nature's Resource) causó una desintegración significativa ( $p < 0.005$ ) 63.8  $\pm$  4.2% de las fibrillas de A $\beta$  1-42 25  $\mu$ M cuando se los incubó a una relación en peso de A $\beta$  1-42:extracto de té verde de 1:4 (Figura 4). por lo tanto, independientemente de la fuente, el extracto de hojas de té verde y al menos uno de sus constituyentes activos bioflavonoide, flavanol, flavandiolo, flavonoide o tanino fue un potente desintegrador del amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 4.

Las catequinas son potentes inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  (1-40) de la enfermedad de Alzheimer.

Se empleó inicialmente un método descrito previamente para medir la formación de fibrilla amiloide utilizando fluorometría con tioflavina T (H Naiki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; H Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; H Levine III, *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, *Lab. Invest.* 74:374-383, 1996) para identificar si el extracto de hojas de té verde estandarizado era capaz de inhibir la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer.

En un primer estudio, se evaluaron los efectos de catequinas comerciales como potentes inhibidores del amiloide de la enfermedad de Alzheimer sobre la formación de fibrillas de A $\beta$  (1-40) de Alzheimer mediante una fluorometría con tioflavina T. La proteína A $\beta$  (1-40) de la enfermedad de Alzheimer cuando se incubaba a 37 °C tiende a formar espontáneamente fibrillas amiloides que aumentan en cantidad con el tiempo. En este estudio, probamos la capacidad de las catequinas para impedir que la proteína amiloide A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer forme fibrillas, durante un periodo de 1 semana. Para este estudio, se incubaron 125  $\mu$ M de A $\beta$  (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU) en tubos de microcentrifuga a 37 °C durante 1 semana (por triplicado), sola o en presencia de catequinas de diferentes fuentes comerciales que incluyen epicatequina (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA), epicatequina (Aldrich, St. Louis, MO), hidrato de catequina (Fluka Chemica-Biochemika, Ronkonkoma, Nueva York) y catequina (Aldrich, St. Louis, MO) en Tris HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0 (TBS). Se probaron cantidades crecientes de catequinas (como se describió antes) que incluyeron relaciones en peso A $\beta$ :catequina de 1:1, 1:0.1, 1:0.01 y 1:0.001 para determinar si las catequinas ejercían una inhibición, dependiente de la dosis, de la formación de fibrillas de A $\beta$  1-40.

Para evaluar los efectos de las catequinas sobre la formación de fibrillas de A $\beta$  (1-40), se tomaron alícuotas de cada tubo para análisis 0 día, 3 días y 7 días después. Para cada determinación descrita antes, luego de cada periodo de incubación, se agregaron 10  $\mu$ l de A $\beta$  +/- catequinas a 1.2 ml de tioflavina T 100  $\mu$ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 6.0). Los estudios indicaron que concentraciones crecientes de A $\beta$  fibrilar causaron un aumento proporcional en la fluorescencia en presencia de Tioflavina T 100  $\mu$ M, descartando la presencia de cualquier efecto desproporcionado de filtro interno en estos estudios. La emisión de fluorescencia a 482 nm se midió en un fluorómetro Turner modelo 450 a una longitud de onda de excitación de 450 nm. Para cada determinación, el fluorómetro se calibró llevando a cero en presencia del reactivo de tioflavina T solo, y fijando la riboflavina 50 ng/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) en el reactivo de tioflavina T en 1800 unidades de fluorescencia. Todas las determinaciones de fluorescencia se basaron en esas referencias y toda la fluorescencia emitida por cualquiera de los compuestos en presencia del reactivo de tioflavina T se sustrajo de todas las lecturas.

En todos los estudios de fibrillogénesis que usan fluorometría con tioflavina T, según se dio a conocer en este documento, las comparaciones de proteína amiloide en presencia o ausencia de catequinas se basaron en pruebas t de Student para datos apareados mostrándose los datos como la media  $\pm$  la desviación estándar. La significancia se informó a niveles de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ), 99% ( $p < 0.01$ ) y 99.5% ( $p < 0.005$ ).

Se evaluaron los efectos de las catequinas comerciales sobre la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  (1-40) durante un período de incubación de 1 semana. Durante el período de incubación de 1 semana, hubo un aumento gradual en la fluorescencia de A $\beta$  (1-40) sola, observándose un pico de fluorescencia de 450 +/- 46 unidades de fluorescencia a los 7 días (Figura 5), lo que es coherente con los estudios anteriores (Castillo et al, *J. Neurochem.* 69:2452-2465, 1997). La epicatequina (de ICN y Aldrich), el hidrato de catequina y la catequina, todos inhibieron la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  (1-40) de manera dependiente de la dosis, y significativamente ( $p < 0.01$ ) a relaciones en peso A $\beta$ :catequina de 1:1 y 1:0.1 (Figura 5). Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (ICN) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 85%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina (ICN) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 67%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 86%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina (ICN) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 62%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :hidrato de catequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 88%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :catequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 85%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ : catequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de A $\beta$  en 66%. Este dato inicial indicó que las catequinas, incluidas epicatequina, hidrato de catequina y catequina fueron potentes inhibidores de la formación de fibrillas amiloides de Alzheimer.

#### Ejemplo 5

Inhibición de la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  por las catequinas según se demostró por una reducción en la birrefringencia del rojo Congo

La inhibición de la formación de fibrillas de A $\beta$  1-40 por las catequinas se confirmó por una pérdida de birrefringencia del rojo Congo, según se demostró en los ensayos de tinción con rojo Congo (Figura 6). En esos estudios se incubaron alícuotas de 125  $\mu$ M de A $\beta$  sola, o A $\beta$  + catequinas durante 1 semana a 37 °C, y después se colocaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, se secaron al aire durante toda la noche y se tiñeron con rojo Congo. Se observó una marcada reducción en la birrefringencia del rojo Congo (según se ve bajo la luz polarizada) en presencia de epicatequina (ICN) (como un ejemplo) (Figura 6) a una relación en peso A $\beta$ :epicatequina de 1:0.5 (Fig. 6B) y en menor medida a una relación en peso A $\beta$ :epicatequina de 1:0.05 (Fig. 6C). La figura 6A muestra la tinción con rojo Congo de los depósitos de amiloide A $\beta$  luego de la incubación de 125  $\mu$ M de A $\beta$  1-40 a 37 °C durante 1 semana. Este estudio demuestra que una catequina, como epicatequina, fue un potente inhibidor de la formación de la fibrillas de amiloide A $\beta$ .

#### Ejemplo 6

Disgregación/ruptura de las fibrillas de amiloide A $\beta$  1-42 de la enfermedad de Alzheimer por las catequinas

En el estudio siguiente, se probó la capacidad de catequinas comerciales para causar una disgregación/ruptura de las fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42 de Alzheimer. Este tipo de actividad sería importante para cualquier potencial compuesto anti-amiloide que se pueda usar en pacientes que ya tienen depósitos considerables de amiloide en órganos y/o tejidos. Por ejemplo los pacientes con enfermedad de Alzheimer en una etapa de la enfermedad entre intermedia y tardía tienen abundantes depósitos de amiloide que contiene A $\beta$  en sus cerebros, como parte tanto de las placas neuríticas como de los depósitos de amiloide cerebrovasculares. Un compuesto capaz de causar la disgregación/ruptura de depósitos de amiloide preexistentes sería ventajoso para usar en esos pacientes que están en etapas tardías del proceso patológico.

Para este estudio se disolvió 1 mg de A $\beta$  1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU) en 1.0 ml de agua bidestilada (solución de 1 mg/ml). Después se incubaron 25  $\mu$ M de A $\beta$  1-42 a 37 °C, en presencia o ausencia de epicatequina (de Fluka), epicatequina (de ICN), hidrato de catequina (de Aldrich), galato de galocatequina (de Sigma), galato de epicatequina (de Sigma), epicatequina (de Sigma), epicatequina té verde (de Sigma) en presencia de Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM (pH 7.0) con azida de sodio al 0.02%. En esos estudios (véanse los resultados descritos más adelante y en la figura 7), se probaron las relaciones en peso A $\beta$  1-42:catequina 1:1, 1:0.1 y 1:0.01. Se usó el ensayo fluorométrico de tioflavina T según se describió en el ejemplo 1.

Como se muestra en la figura 7, cantidades crecientes de diversas catequinas comerciales causaron una disgregación/ruptura, dependiente de la dosis, de las fibrillas preformadas de A $\beta$  1-42 de Alzheimer. A $\beta$  1-42 sola, mostró una fluorescencia media de 1037 +/- 101 unidades de fluorescencia (Figura 7). La epicatequina (de Fluka, ICN, Aldrich y Sigma), el hidrato de catequina, el galato de galocatequina y el galato de epicatequina todos causaron una disgregación/ruptura, dependiente de la dosis, de las fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42, y significativamente ( $p < 0.01$ ) a relaciones en peso A $\beta$ :catequina de 1:1 y 1:0.1 (Figura 6). Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (Fluka) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 86%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina (Fluka) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 63%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (ICN) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 91%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de

A $\beta$ :epicatequina (ICN) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  en 78%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (Aldrich) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 85%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina (Aldrich) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 74%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :hidrato de catequina (Aldrich) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 86%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :hidrato de catequina (Aldrich) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 60%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :galato de galocatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 86%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :galato de galocatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 44%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :galato de epicatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 92%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :galato de epicatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 65%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 85%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 81%. Una relación peso/peso 1:1 de A $\beta$ :epicatequina té verde (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 86%, en tanto una relación peso/peso 1:0.1 de A $\beta$ :epicatequina té verde (Sigma) rompió la formación de fibrilla de A $\beta$  1-42 en 63%. Este estudio demostró que las catequinas, incluidas epicatequina (de Fluka, ICN, Aldrich y Sigma), hidrato de catequina (Aldrich), galato de galocatequina (Sigma) y galato de epicatequina todos causaron una disgregación/ruptura de las fibrillas preformadas de amiloide A $\beta$  1-42 que fue eficaz de manera dependiente de la dosis.

#### Ejemplo 7

Las catequinas son potentes inhibidores de la formación de fibrilla de la enfermedad de Parkinson.

En el estudio siguiente, se probó la capacidad de las catequinas comerciales para inhibir la formación de fibrilla de alfa-sinucleína de la enfermedad de Parkinson. Se usó NAC (también conocido, y a veces mencionado como, NAC-P), un fragmento de 35 aminoácidos de la alfa-sinucleína porque se sabe que forma espontáneamente fibrillas tipo amiloides luego de la incubación a 37 °C. Para este estudio, se incubaron 62.5  $\mu$ M de NAC (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU) en tubos de microcentrífuga a 37 °C durante 1 semana (por triplicado), solo o en presencia de catequinas de diferentes fuentes comerciales incluidas epicatequina (EC) (Fluka), epicatequina (EC) (ICN), epicatequina (EC) (Aldrich), epicatequina (EC) (Sigma), galato de epicatequina (Sigma), hidrato de epicatequina (Aldrich) y galato de galocatequina (Sigma) en Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, pH 7.0 (TBS). Se probaron cantidades crecientes de catequinas (como se describió antes) que incluyeron relaciones peso/peso de NAC:catequina de 1:1, 1:0.5, 1:0.1 y 1:0.01 para determinar si las catequinas ejercían una inhibición, dependiente de la dosis, de la formación de fibrillas de NAC. Para evaluar los efectos de las catequinas sobre la formación de fibrillas de NAC, se tomaron alícuotas de cada tubo de análisis 0 día, 3 días y 7 días después, usando el procedimiento de fluorometría con tioflavina T según se describió en el ejemplo 4.

Los efectos de las catequinas comerciales sobre la formación de fibrillas de NAC se evaluó durante un período de incubación de 1 semana. Durante el período de incubación de 1 semana, hubo un aumento gradual en la fluorescencia de NAC, con un pico de fluorescencia de 381 +/- 50 unidades de fluorescencia observado a los 7 días (Figura 8). La epicatequina (de Fluka, ICN, Aldrich y Sigma), el galato de epicatequina (Sigma), el hidrato de catequina (Aldrich) y el galato de galocatequina (Sigma) todos inhibieron la formación de fibrillas de NAC de manera dependiente de la dosis, y significativamente ( $p < 0.01$ ) a relaciones en peso NAC:catequina de 1:1, 1:0.5, 1:0.1 y 1:0.01 (Figura 8). Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:epicatequina (Fluka) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 70%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:epicatequina (Fluka) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 46%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:epicatequina (ICN) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 89%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:epicatequina (ICN) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 49%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:epicatequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 76%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:epicatequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 33%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:epicatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 75%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:epicatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 40%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:galato de epicatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 77%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:galato de epicatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 34%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:hidrato de catequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 77%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:hidrato de catequina (Aldrich) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 34%. Una relación peso/peso de 1:0.1 de NAC:galato de galocatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 73%, en tanto una relación peso/peso de 1:0.01 de NAC:galato de galocatequina (Sigma) inhibió la formación de fibrillas de NAC en 34%. Este estudio demostró que las catequinas, incluidas epicatequina (de Fluka, ICN, Aldrich y Sigma), el hidrato de catequina (Aldrich), el galato de galocatequina (Sigma) y el galato de epicatequina (Sigma), todos causaron una inhibición de la formación de fibrillas de NAC que fue eficaz de manera dependiente de la dosis.

#### Ejemplo 8

Detección e identificación de compuestos aromáticos polihidroxilados específicos como inhibidores de la amiloidosis

AA usando un sistema modelo de cultivo celular

Se cree que compuestos aromáticos polihidroxiados específicos son potentes inhibidores/desintegradores de la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar en cultivos celulares. Se cree que un grupo de aproximadamente 30 compuestos aromáticos polihidroxiados comerciales que difieren en la posición de diversos grupos hidroxilo funcionales inhiben la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar usando un sistema modelo de cultivo celular. Se usa un sistema de cultivo celular de macrófagos de múrido que recibe proteína amiloide sérica A 2 (SAA2) y factor potenciador del amiloide (AEF) para generar amiloide AA fibrilar *in vitro*. El depósito de amiloide AA fibrilar detectado mediante tinción con rojo Congo y fluorescencia con tioflavina S se cuantifica usando un sistema de análisis de imágenes. Además, la cuantificación de la formación y el depósito de amiloide AA se logra mediante el análisis de la capa celular y los medios derivados de los cultivos usando SDS-PAGE, inmunotransferencia y densitometría de barrido. Se encontró que los compuestos eficaces seleccionados inhibían la formación y/o el depósito de amiloide AA en cultivo y después se probaron en un modelo experimental de amiloidosis AA en ratón.

Ejemplo 9

Determinación de la eficacia de compuestos aromáticos polihidroxiados seleccionados en un modelo de amiloidosis sistémica AA en ratón

Se cree que compuestos aromáticos polihidroxiados específicos son potentes inhibidores de la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar en un modelo de amiloidosis AA experimental en ratón. Se usan los compuestos eficaces seleccionados identificados como se indicó antes, para tratar oralmente (mediante sonda) grupo de ratones CBA/J (n = 8 por grupo) durante un período de tratamiento de 21 días. Se induce amiloide AA fibrilar en estos animales el día 8 del período de tratamiento mediante una única inyección subcutánea de nitrato de plata (estímulo inflamatorio), seguido de una única inyección en la vena de la cola de 100 µg de AEF. Un grupo de 12 animales tratados oralmente con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a los que se les indujo amiloidosis AA (el día 8) sirvió como grupo de control. Se extrajeron el bazo, el hígado y los riñones de cada animal y se cuantificó la carga porcentual de amiloide en cada órgano usando un análisis de imágenes luego de la tinción con rojo Congo o la fluorescencia con tioflavina S. Además, se implementó inmunohistoquímica para la detección de proteína amiloide AA y su precursora (es decir SAA), así como otros componentes conocidos asociados al amiloide AA (es decir proteoglicanos/glucosaminoglicanos tipo sulfato de heparán, componente amiloide P y APoE) para determinar si la reducción del depósito de amiloide AA en los tejidos también se correlaciona con la reducción en los componentes asociados al amiloide.

Establecimos el uso de un modelo interno de AA experimental en ratón. Al principio el AEF fue proporcionado gentilmente por el Dr. Robert Kisilevsky (Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá). Se inyectaron ratones hembra CBA/J con una única inyección por vía subcutánea de 0.5 ml de nitrato de plata al 3% (para inducir una reacción inflamatoria) y una única inyección en la cola de la vena de 100 µg de AEF. Utilizando este modelo 2 a 3 días después de la inyección se produjo un abundante depósito de amiloide AA en el bazo, luego en el hígado y los riñones. Como se muestra en la figura 9, los depósitos de amiloide AA fibrilar se observaron primero en las áreas perifoliculares del bazo. La tinción con rojo Congo de preparados de tejido reveló una birrefringencia roja/verde característica (como se ve bajo la luz polarizada) indicativa de los depósitos de amiloide fibrilar (Fig. 9A). La presencia de depósitos de amiloide fibrilar también se confirmó por fluorescencia con tioflavina S positiva (Fig. 9C).

La confirmación de depósitos de amiloide AA en el bazo, el hígado y los riñones se demostró por inmunotinción positiva utilizando un anticuerpo policlonal contra la proteína amiloide AA (Serotek) (no se muestra). Además, como se describió previamente en varios estudios (Snow et al, *Lab. Invest.* 53:37-44, 1985; Snow et al, *Lab. Invest.* 56:665-675, 1987; Snow et al, *Lab. Invest.* 57:687-698, 1987; Snow et al, *J. Histochem. Cytochem.* 39:1321-1330, 1991) los depósitos de amiloide AA demostraron una co-localización de glucosaminoglicanos tipo sulfato de heparán (probablemente como parte de los proteoglicanos) como se muestra usando un anticuerpo de fracción periplásmica generado por expresión en fago (conocido como HS4C3 que reconoce un epítipo del GAG tipo sulfato de heparán específico) (van Kuppevelt et al, *J. Biol. Chem.* 273: 12960- 12966, 1998) (Fig. 9C).

La figura 9 muestra depósitos de amiloide en el bazo en un modelo de amiloidosis AA experimental en ratón. Los paneles representan tejido esplénico tomado 5 días después de haber inyectado a ratones CBA/J 100 µg de AEF + 0.5 ml de nitrato de plata al 3%. (Fig. 9A) Amiloide esplénico en el área perifolicular (áreas brillantes; flechas) según se muestra mediante tinción con rojo Congo (es decir birrefringencia roja/verde) como se ve bajo la luz polarizada. (Fig. 9B) Amiloide esplénico (áreas brillantes; flechas) en el área perifolicular en otro animal según se demuestra mediante fluorescencia positiva con tioflavina S. (Fig. 9C) Co-localización de glucosaminoglicanos sulfato de heparán en las áreas perifoliculares esplénicas (áreas oscuras; flecha) como se demuestra mediante inmunotinción con un anticuerpo generado por expresión en fago (conocido como HS4C3), que reconoce un epítipo del GAG sulfato de heparán específico. Todas las figuras X 100.

En el hígado, los depósitos de amiloide AA fibrilar se observaron primero a los 3-4 días en las paredes de las venas

centrales (Fig. 10A), seguido de depósito de amiloide en todo el parénquima hacia los días 5-7 (Fig. 10C). La naturaleza de los depósitos de amiloide fibrilar se confirmó tanto mediante tinción positiva con rojo Congo (es decir birrefringencia roja/verde como se ve bajo la luz polarizada) (Fig. 10A, 10C) como con tioflavina S (es decir fluorescencia positiva) (Fig. 10B).

La figura 10 muestra depósitos de amiloide en el hígado en un modelo de ratón de amiloidosis AA experimental en ratón. Los paneles A y B representan tejido hepático tomado 7 a 10 días después de haber inyectado a ratones CBA/J 100 µg de AEF + 0.5 ml de nitrato de plata al 3%. (Fig. 10A) Amiloide hepático (a los 7 días) confinado principalmente a las paredes de una vena central (áreas brillantes; flechas) como se muestra mediante tinción con rojo Congo (es decir birrefringencia roja/verde) como se ve bajo la luz polarizada (flechas). X 100 (Fig. 10B) Amiloide hepático (a los 7 días) en las paredes de las venas centrales (áreas brillantes; flechas) y que penetra en el parénquima (puntas de flecha) como se detecta mediante fluorescencia con tioflavina S. X 100 (Fig. 10C) Una fotomicrografía a menor aumento que muestra una marcada acumulación de amiloide (a los 10 días) en las paredes de las venas centrales (áreas brillantes; puntas de flecha) y en todo el parénquima del hígado 10 días después de la inyección de AEF + AgNO<sub>3</sub>. X 25.

Estos estudios indican que el modelo experimental de amiloidosis sistémica AA en ratón es viable. Utilizamos este modelo para probar la eficacia de los inhibidores del amiloide AA luego de la evaluación selectiva inicial usando el sistema modelo de cultivo celular.

#### Ejemplo 10

##### Identificación de una nueva clase de compuestos como potenciales anti-amiloides

La mayoría de los estudios anteriores implicaron el análisis de esos compuestos para la ruptura/disgregación de las fibrillas amiloides preformadas que consisten en proteína beta-amiloide (observadas en los depósitos amiloides de la enfermedad de Alzheimer), el polipéptido amiloide de los islotes (observado en los islotes del 90% de los pacientes con diabetes tipo 2), la alfa-sinucleína (observada en los depósitos de la enfermedad de Parkinson) o la proteína priónica (observada en las enfermedades priónicas). Nuestros estudios iniciales demuestran que los compuestos polifenólicos específicos pueden causar una ruptura/disgregación de diferentes tipos de proteínas amiloides, y por lo tanto tienden a ser menos específicos, mientras que otros compuestos polifenólicos tienden a romper un solo tipo de proteína amiloide (y por lo tanto son más específicos). Los ejemplos de algunos de los compuestos aromáticos polihidroxilados que hemos analizado para ver si inhibían la formación y el depósito de amiloide AA, se indican más adelante.

Como un ejemplo, la figura 11 muestra el efecto de los compuestos aromáticos polihidroxilados específicos para romper/disgregar las fibrillas amiloides que consisten en el polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) (la proteína amiloide que se acumula en los islotes pancreáticos de ~90% de los pacientes con diabetes tipo 2)(Westermarck, 1972; Clark et al, 1988) según se evaluó por fluorometría con tioflavina T (Naiki et al, 1991; Levine III, 1993; 1995). En este ensayo, los aumentos o las disminuciones en la fluorometría con tioflavina T son proporcionales a los aumentos o disminuciones en la cantidad de fibrillas IAPP (Naki et al, 1991; Levin III, 1993; 1995). Como se muestra en la figura 11, luego de una semana de incubación a 37 °C, 25 µM de IAAP solo, mostraron 5.806 +/- 301 unidades de fluorescencia lo que indica la presencia de abundante fibrillas amiloides de IAPP. Fibrillas de IAPP incubadas durante una semana a 37 °C a una relación en peso de IAPP:compuesto de 1:0.1 (relación molar aproximada de 1:1) con compuestos aromáticos hidroxilados específicos que incluyen epicatequina (EC; Fluka), galato de epicatequina (ECG; Sigma) o pirocatecol (Sigma) todos mostraron una marcada ruptura/disgregación 90-96% de las fibrillas de IAPP preformadas. Por otra parte, EDTA (como control negativo) y el compuesto polifenólico conocido como ácido quínico no causaron ninguna ruptura/disgregación significativa de las fibrillas de IAPP preformadas (Fig. 11). La ruptura directa de fibrillas de IAPP preformadas por compuestos polifenólicos específicos también se confirmó mediante ensayo de tinción con rojo Congo (no se muestra).

La figura 11 muestra compuestos aromáticos polihidroxilados específicos que actúan como potentes desintegradores de las fibrillas amiloides preformadas. Este gráfico es un ensayo fluorométrico con tioflavina T de 1 semana, para identificar inhibidores de las fibrillas de IAPP. Según se muestra, sólo la epicatequina (EC), el galato de epicatequina (ECG) y el pirocatecol rompieron/disregaron las fibrillas de IAAP preformadas en 90-96%.

En otros estudios, se utiliza espectroscopia de dicroísmo circular para probar la eficacia de ciertos compuestos polifenólicos para romper fibrillas preformadas que consisten en proteína beta-amiloide (Aβ) 1-42, una proteína que forma fibrillas amiloides como parte de las placas amiloides extracelulares en el cerebro de todos los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Como un ejemplo, se analizaron los efectos del compuesto polifenólico epicatequina sobre la ruptura de las fibrillas de Aβ 1-42. En este estudio, se incubaron 50 µM de Aβ 1-42 (Bachem Inc) en presencia o ausencia de epicatequina (EC)(Sigma) durante 1 semana a 37 °C, a una relación peso/peso de Aβ:EC de 1:1 (relación molar aproximada de 1:10). Como se muestra en la figura 12, Aβ 1-42 sola, muestra el espectro típico de una proteína amiloide fibrilar que contiene una estructura de hoja β-plegada por los marcados mínimos

observados a 222 nm. Por otra parte, la incubación con epicatequina durante 3 días, causó una significativa ruptura/disgregación de la estructura de hoja  $\beta$ -plegada (Fig. 12), lo que sugiere que el mecanismo de acción de los compuestos aromáticos polihidroxiados específicos puede implicar la ruptura de la hoja  $\beta$ -plegada.

5 La figura 12 muestra la ruptura/disgregación por la epicatequina de la estructura de hoja  $\beta$ -plegada de las fibrillas amiloides preformadas de Alzheimer. Se usó espectroscopia de dicroísmo circular para evaluar la capacidad de la epicatequina (EC) para causar una ruptura/disgregación de la estructura de hoja  $\beta$ -plegada de las fibrillas preformadas de A $\beta$  1-42. Como se muestra, hacia los 3 días de incubación conjunta, la epicatequina fue eficaz para romper la estructura de hoja  $\beta$ -plegada (según se revela por el cambio en el espectro, especialmente a 222 nm).

10

Ejemplo 11

Inhibición de amiloidosis AA experimental por la epicatequina

15 Los estudios también demostraron que el compuesto aromático polihidroxiado específico, denominado epicatequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ ; PM 290.3) tiene la capacidad de prevenir marcadamente el depósito de amiloide AA en el bazo y el hígado en el modelo de ratón (es decir luego de la administración de AEF + nitrato de plata). Esto no se observó luego del tratamiento con catequina (el epímero de la epicatequina), lo que sugiere que existe una relación estructura-actividad para la inhibición por los compuestos aromáticos polihidroxiados de la formación y el depósito de fibrillas de amiloide AA.

20

25 En este estudio, 4 grupos (n = 6 por grupo) de ratones hembra CBA/J de 8 semanas de vida se pre-trataron durante 7 días con a) solución salina amortiguada con fosfato (PBS), b) epicatequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ ; PM 290.3)(Fluka, St. Louis, MO) o c) hidrato de catequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ ; PM 290.3)(Fluka, St. Louis, MO). La epicatequina se administró diariamente mediante sonda oral (0.5 ml del artículo de prueba en PBS, pH 7.4) a una dosis de 78 mg/kg/día (límite de solubilidad de la epicatequina), mientras que el hidrato de catequina se administró a una dosis alta (500 mg/kg/día).

25

30 Luego de un período de pretratamiento de 7 días con PBS, epicatequina o catequina, se indujo la formación de depósito de amiloide AA en todos los animales mediante una única inyección subcutánea de 0.5 ml de nitrato de plata (estímulo inflamatorio), seguido de una única inyección en la vena de la cola de 100  $\mu$ g de AEF en agua destilada. Los ratones se trataron después durante otros 14 días con PBS, epicatequina o catequina mediante sonda oral como se describió antes (tiempo total de tratamiento con el compuesto de prueba de 21 días). Al final del protocolo experimental los animales se sacrificaron y se les extrajeron el bazo, el hígado y los riñones para análisis histológico.

35

40 Se tiñeron cortes de tejido (es decir bazo, hígado y riñón) para determinar la presencia de amiloide fibrilar usando rojo Congo y tioflavina S. Después se usaron 5 cortes por órgano para evaluar la carga de amiloide. En esos estudios, se usó un sistema de puntuación arbitrario (de 0 a 5) y se determinó la carga de amiloide por órgano, mediante la puntuación a ciegas de dos investigadores. Como ejemplo, el puntaje para rojo Congo de cortes de tejido de bazo, 0 = sin birrefringencia de rojo Congo en el tejido; 1 = ligera birrefringencia de rojo Congo confinada a una porción del área perifolicular; 2 = birrefringencia de rojo Congo confinada a dos o más porciones del área perifolicular; 3 = birrefringencia de rojo Congo que ocupa toda el área perifolicular; 4 = birrefringencia de rojo Congo que ocupa toda el área perifolicular y penetra en la pulpa blanca; 5 = birrefringencia de rojo Congo que ocupa toda el área perifolicular y penetra profundamente en la pulpa blanca. También utilizamos un método más cuantitativo para determinar el % de carga de amiloide en diversos tejidos usando un sistema de análisis de imágenes más sofisticado.

40

45

50 Como se muestra en la figura 13, los animales a los que se les administró solución salina sola mostraron un marcado depósito de amiloide en el bazo hacia el final del período de inducción de amiloide de 2 semanas, con un puntaje de rojo Congo de 3.83 +/- 0.1. El hidrato de catequina (es decir puntaje de rojo Congo 3.20 +/- 0.46) redujo el depósito de amiloide AA en el bazo en 16.5%, pero esto no fue significativo. Sin embargo, la epicatequina (es decir puntaje de rojo Congo de 2.16 +/- 0.50) inhibió significativamente ( $p < 0.01$ ) el depósito de amiloide AA fibrilar en el bazo en 43.7% (Fig. 13). También se encontró una inhibición similar del amiloide AA fibrilar en el hígado y el riñón luego del tratamiento con epicatequina, pero no con catequina (no se muestra).

55

60 El efecto inhibitorio de la epicatequina es tan potente, que unos pocos de los animales mostraron incluso muy poco o nada de amiloide AA fibrilar en los tejidos luego del tratamiento (Fig. 14). Este estudio demostró que los compuestos aromáticos polihidroxiados seleccionados tienen la capacidad de servir como potenciales fármacos para el tratamiento de la amiloidosis sistémica AA. Los estudios descritos usan técnicas de cultivo celular y un modelo experimental de amiloidosis AA en ratón para identificar los compuestos aromáticos polihidroxiados que sirven como compuestos candidatos para el tratamiento de la amiloidosis AA.

60

La figura 14 muestra una marcada reducción en el depósito de amiloide AA esplénico por la epicatequina como se

reveló mediante la tinción con rojo Congo. ( Fig. 14A) Tinción con rojo Congo de los depósitos de amiloide AA en el área perifolicular del bazo (flechas) en un ratón inducido con AEF + AgNO<sub>3</sub> (el día 8), y tratado con PBS (durante 21 días). Las fotomicrografías a color muestran una birrefringencia roja/verde indicativa de amiloide fibrilar (como se ve bajo la luz polarizada). (Fig. 14B) Eliminación casi total de los depósitos de amiloide AA en el área perifolicular del bazo (flechas) como se muestra por la falta de tinción con rojo Congo (como se ve bajo la luz polarizada) de un animal inducido con AEF + AgNO<sub>3</sub> (día 8), y tratado con epicatequina (durante 21 días).

Ejemplo 12

#### 10 Identificación de nuevos inhibidores del amiloide AA - Detección *in vitro*

Nuestros estudios sugieren que ciertos compuestos aromáticos polihidroxiados, como la epicatequina, pueden servir como un potente inhibidor de la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar en los tejidos. Utilizamos técnicas de cultivo celular innovadoras para evaluar selectivamente varios de los compuestos aromáticos polihidroxiados disponibles en el comercio que difieren en el número de anillos aromáticos y/o en la posición de diversos grupos hidroxilo y otros grupos funcionales en los anillos aromáticos. Este tipo de estudios de evaluación selectiva de la relación estructura-actividad (SAR) permitió comprender las importantes características estructurales necesarias para una eficaz inhibición de la formación y el depósito de amiloide AA. Se usa un sistema de cultivo de macrófagos múridos que utiliza SAA2 recombinante y AEF para generar amiloide AA fibrilar *in vitro*. El depósito de amiloide AA fibrilar detectado mediante tinción con rojo Congo y fluorescencia con tioflavina S se cuantifica en cultivo usando un sistema de análisis de imágenes equipado para fluorescencia y polarización. Además, la cuantificación de la formación de amiloide AA se logra mediante el análisis de la capa celular y los medios usando SDS-PAGE, inmunotransferencia y densitometría de barrido. Cuando el amiloide AA se establece en cultivo, se hace una evaluación selectiva de los cultivos con compuestos polihidroxiados seleccionados a concentraciones crecientes. Los compuestos que se encontró que eran más eficaces para inhibir la formación y el depósito de amiloide AA en cultivo se prueban después en un modelo experimental pertinente de amiloidosis AA en ratón.

Metodología:

#### 30 Establecimiento de un sistema de cultivo celular para el estudio de amiloidosis AA

Para el establecimiento de un sistema de cultivo celular en el cual hacer una evaluación selectiva de inhibidores de la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar, utilizamos el método descrito por Kluve-Beckerman et al (1999).

#### 35 Recolección y cultivo de macrófagos/células peritoneales de múrido:

Se recogen células mediante lavado de la cavidad peritoneal de ratones hembra C57B1/6 normales de 8-10 semanas de vida. En resumen, se inyectan por vía intraperitoneal 8 ml del medio de recolección (RPMI 1640; Life Technologies, Grand Island, NY), HEPES 25 mM, pH 7.0 y 1X antibiótico-antimicótico (Life Technologies), el abdomen se masajea suavemente y se extraen el líquido y las células. Las células se recogen por centrifugación, se vuelven a suspender a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml y se siembran en placas a una densidad de  $1.7 \times 10^6$  células/pocillo en portaobjetos con cámara de 8 pocillos. Los medios de cultivo contienen RPMI 1640, L-glutamina 2 mM, 1X antibiótico-antimicótico, y 15% de suero de feto de ternero (Hyclone Labs, Logan, VT). Se deja que las células se adhieran durante 3 horas, después de lo cual los pocillos se enjuagan bien para eliminar las células no adhesivas. Las células adhesivas tienen una morfología uniforme, redonda, típica de macrófagos no activados recién sembrados. Las células se mantienen en 350  $\mu$ l de medio de cultivo por pocillo, a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, rempazándose el medio cada 2 a 3 días. Luego del agregado de AEF y SAA2 recombinante (como se describe más adelante) para la inducción de depósito de amiloide AA en cultivo (observado generalmente a los 2 a 4 días de la inducción), los cultivos celulares se mantienen durante un período de 14 a 20 días.

#### 50 Preparación del factor potenciador de amiloide:

El AEF se prepara a partir de los bazos de ratones amiloidóticos luego de un tratamiento de 2 semanas con una única inyección subcutánea de 0.5 ml de AgNO<sub>3</sub> y una única inyección en la vena de la cola de 100  $\mu$ g de AEF en agua destilada. El material AEF inicial fue suministrado gentilmente por el Dr. Robert Kisilevsky (Queen's University, Canadá) al cual se le generó más AEF usando el método de Pras et al (1968). En resumen, se procesan aproximadamente 2 gramos (10 bazos amiloidóticos) de tejido para cada preparación. Los bazos se homogeneizan usando una trituradora de tejido Kontes en 40 ml de solución salina de NaCl 0.15 M, hasta que el tejido es una suspensión fina. Después la suspensión se centrifuga en una microcentrífuga de mesa a 10,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se descarta y el sedimento se vuelve a suspender en 40 ml de solución salina y se centrifuga nuevamente como se describió antes. Este proceso se repite 7 veces. Después la sal se elimina de los sedimentos mediante re-homogeneización en agua destilada estéril y centrifugación en una microcentrífuga de mesa a 15,000 rpm durante 2 horas. Después el sobrenadante se descarta y el sedimento se vuelve a suspender en 20 ml de agua destilada, y se centrifuga nuevamente a 15,000 rpm durante 2 horas. Esta vez el sobrenadante no se

descarta y se denomina sobrenadante II (Sup II), que contiene una significativa actividad de AEF. Se repite el proceso utilizado para la generación de Sup II y se guarda el sobrenadante que se denomina Sup III. El sedimento obtenido del último paso se vuelve a suspender en 7 ml de agua destilada y se centrifuga nuevamente a 10,000 rpm durante 3 horas. El sobrenadante se guarda y se denomina Sup IV. Sup II, Sup III y Sup IV contienen actividad de AEF que se analiza con el método de Bradford (Bradford, 1976) para determinar la concentración de proteína en cada sobrenadante. Los 3 sobrenadantes se juntan y se liofilizan de modo de obtener alícuotas de liofilizado de múltiplos de 100 µg. Se usa AEF tanto para estudios de cultivos celulares (meta 1) como en inducción experimental de amiloide AA en un modelo de ratón (meta 2), como se describe más adelante. Encontramos que los bazos amiloidóticos producen aproximadamente 4 mg de AEF (suficiente para inyecciones para 40 animales; es decir 100 µg por animal como se describe en este documento).

#### Producción y purificación de SAA2 recombinante:

Se produce SAA2 recombinante de ratón correspondiente a la SAA en ratones de la cepa CE/J (CE/J SAA) en células de *Escherichia coli* BL834, usando el vector pET-21a según describieron previamente (Kluve-Beckerman et al, 1997). La purificación de lisados de *E. coli* es acompañada por cromatografía en sefrosa CL-6B en guanidina 4 M, Tris-HCl 0.05 M (pH 8.2) seguida de cromatofocalización en un rango de pH 8 a pH 5 en urea 6 M (Kluve-Beckerman et al, 1997). Las preparaciones finales se precipitan en sulfato de amonio (saturado el 80%), se dializan extensamente con agua y se liofilizan.

#### Inducción de la formación de amiloide AA en cultivo celular:

Para inducir la formación y el depósito de amiloide AA en macrófagos/células peritoneales cultivo, se usa SAA2 recombinante de ratón (a una concentración final de 140 µg/ml) y AEF (a una concentración final de 12 µg/ml). Se agrega directamente SAA (7 µl) al medio (350 µl) de una solución madre de 7-10 mg/ml preparada disolviendo SAA2 recombinante purificada y liofilizada en urea 6 M, y HEPES 25 mM, pH 7.2. Las concentraciones de las soluciones madre se ajustan después del análisis por SDS-PAGE y la cuantificación densitométrica de bandas de SAA teñidas con azul de Coomassie. La solución madre de AEF (2 mg/ml) se mezcla bien para resuspender el material precipitado antes de extraer una alícuota (2 µl) para el agregado al medio de cultivo (350 µl).

#### Ensayo de viabilidad celular:

Para confirmar la viabilidad celular de los cultivos de macrófagos luego de la inducción de amiloide AA (según se describió antes), se usa la tinción por exclusión con azul de tripano en algunos cultivos (5, 10 y 20 días después). Antes de la tinción, las células se enjuagan 3 veces con RPMI exento de suero. Después se cubren durante un minuto con una solución de azul de tripano en PBS al 2% (p/v) (Perry et al, 1997). Inmediatamente después se elimina el azul de tripano, las células se fijan con paraformaldehído al 4% (p/v), pH 7.5, durante 10 minutos a temperatura ambiente, se enjuaga cuatro veces con PBS agitando suavemente y se examina al microscopio antes de la tinción con rojo Congo o tioflavina S.

#### Actividad fagocítica de macrófagos:

Para evaluar y confirmar la actividad fagocítica de los macrófagos en cultivo (a los 5, 10 y 20 días de la inducción de amiloide AA), también se emplea un ensayo de absorción en perlas de látex. Se suspenden perlas de látex de poliestireno teñidas de azul de 0.8 µm de diámetro (Sigma) en medio RPMI exento de suero a una concentración de  $7.2 \times 10^8$ /ml. Las células se enjuagan 3 veces con medio RPMI exento de suero y después se incuban durante 30 minutos con 300 µl de la suspensión de perlas. Durante la incubación, se envuelven ajustadamente los portaobjetos con cámara en Parafilm y se agitan suavemente en un baño de agua a 37 °C. Se elimina la suspensión de perlas y las células se enjuagan un mínimo de 10 veces con RPMI. Después las células se fijan con formalina y se tiñen con hematoxilina.

#### Tinción con rojo Congo:

Para confirmar y cuantificar el depósito de amiloide AA fibrilar en cultivo, se fijan las células a los 5, 10 y 20 días (después de la inducción de amiloide AA) en metanol al 100% helado y después se tiñen durante 45 minutos con rojo Congo preparado en etanol alcalino al 80% (Puchtler et al, 1962). Después de varias inmersiones rápidas en agua, los portaobjetos se sumergen en hematoxilina durante 2 minutos. Después los portaobjetos se sumergen una vez en etanol al 70% acidificado, varias veces en agua, y una vez en solución de NaOH al 1%. La deshidratación se lleva a cabo lavando secuencialmente en etanol al 95% y etanol al 100%. Los portaobjetos se limpian en xileno y se aplican los cubreobjetos usando resina Permout. La magnitud de la tinción con rojo Congo (es decir birrefringencia roja/verde como se ve bajo la luz polarizada) se determina cuantitativamente usando un sistema de imágenes como el descrito en este documento. Los estudios previos que usaban este sistema de cultivo indicaron que el material positivo al rojo Congo permanece unido a los portaobjetos con cámara durante todo el período de cultivo (2 a 24 días) (Kluve-Beckerman et al, 1999). Se ha demostrado previamente que la acumulación de amiloide AA en cultivo

se produce dentro de los 2 días siguientes al agregado de SAA2 y AEF (Kluve-Beckerman et al, 1999).

Fluorescencia con tioflavina S:

- 5 Se detectan los depósitos de amiloide AA fibrilar y se analizan luego de la tinción con tioflavina S (Elghetany y Saleem, 1988). La fluorescencia con tioflavina S se cuantifica usando el sistema de análisis de imágenes descrito en este documento.

Cuantificación del % de carga de amiloide AA en cultivo celular mediante análisis de imágenes:

- 10 Para cuantificar el % de carga de amiloide presente en los cultivos celulares luego de la formación y el depósito de amiloide AA (a los 5, 10 y 20 días) usamos un método cuantitativo que implica análisis de imágenes. En resumen, se observan portaobjetos teñidos con rojo Congo o tioflavina S bajo la luz polarizada, o la luz fluorescente, respectivamente. Se usan 5-7 portaobjetos por grupo de tratamiento como se describe en este documento para determinar el % de carga de amiloide a un aumento dado (X 100). El análisis cuantitativo de imágenes se realiza usando sistema de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics) unido a un microscopio Zeiss Axioskop 20 (con capacidad de polarización y fluorescencia) a través de una videocámara CCD. Las imágenes (polarizadas o fluorescentes) de cortes de amiloide AA fibrilar se almacenan en un tampón y se delinea manualmente una región específica (es decir a un aumento de X 100) y se determina el área total de píxeles ocupada por las estructuras amiloides. Se usa un umbral monocromático para seleccionar los pinceles correspondiente a las estructuras polarizadas o inmunofluorescentes. Se calcula el % de la región ocupado por los píxeles marcados (es decir rojo/verde para el rojo Congo; amarillo/verde para la tioflavina S) Para todos los análisis de imágenes el estado del tratamiento de los cultivos es desconocido para el observador. Se realiza un análisis no paramétrico de Mann-Whitney usando un programa informático Statview (SAS Institute, Cary, NC). Las reducciones de las cargas de amiloide causada por el tratamiento con compuestos aromáticos polihidroxilados (según se describe más adelante) se pueden determinar cuantitativamente usando la metodología descrita antes. Hemos utilizado con éxito este sistema de imágenes (usando tinción con rojo Congo; fluorescencia con tioflavina S; o un anticuerpo A $\beta$  biotinilado) para determinar el % de carga de amiloide, la cantidad de placas de amiloide y el tamaño de las placas en diversas regiones del cerebro en modelos de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos. Usando este método, también hemos cuantificado la cantidad de macrófagos *in vitro* (a un aumento de X 100) que contienen estructuras cargadas de amiloide. Estudios anteriores de Kluve-Beckerman et al (1999) demuestran que usando el sistema de cultivo celular descrito antes, muchos de los macrófagos acumulan amiloide AA fibrilar dentro de su citoplasma.

Prueba de compuestos aromáticos polihidroxilados para inhibir la formación y el depósito de amiloide AA:

- 35 Nuestros datos sugieren que ciertos compuestos aromáticos polihidroxilados poseen una potente actividad inhibidora del amiloide. Se dan a conocer a continuación compuestos polifenólicos disponibles en el comercio que se cree que son adecuados para inhibir la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar.
- 40 Para los estudios de relación estructura-actividad, se pueden comprar de fuentes comerciales esos compuestos polifenólicos fácilmente disponibles, con grupos hidroxilo situados en diversas posiciones en los anillos aromáticos. Los estudios iniciales que prueban la toxicidad de estos compuestos indican que usualmente presentan una toxicidad limitada, incluso a dosis elevadas. La cuantificación del % de carga de amiloide AA según se describe en este documento se usa para evaluar la capacidad de diversos compuestos aromáticos polihidroxilados para inhibir/romper la formación y el depósito de amiloide AA en cultivo.

- Los compuestos representativos dados a conocer y que se cree que son eficaces inhibidores/desintegradores, anti-amiloide y anti-alfa-sinucleína/NAC incluyen EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> PM 292.2 utilizados sólo como control negativo), y compuestos polifenólicos disponibles en el comercio con una diversidad de patrones de sustitución fenólica incluidos: epicatequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; PM 290.3), hidrato de catequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; PM 290.3), epigallocatequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>; PM 306.3, galato de epigallocatequina (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>; PM 458.4), galato de epicatequina (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>; PM 442.4), galato de galocatequina (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>; PM 458.4), ácido clorogénico (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>; PM 354.3), hematoxilina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; PM 302.3), floroglucida (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>; PM 234.2), galato de propilo (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; PM 212.2), éster etílico del ácido gálico (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>; PM 198.2), ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; PM 170.1), hidrato de 3,4,5,-trihidroxi-benzamida (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>; PM 169.1), 5-hidroxidopamina (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>; PM 205.6), 1,2,4-bencenotriol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>; PM 126.1), ácido elágico (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>; PM 302.2), quercetina (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; PM 338.3), pirocatecol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>; PM 110.1), ácido tánico (C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>O<sub>46</sub>; PM 1701.2), Pirogalol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; PM 126.1), y ácido p-aminosalicílico (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>; PM 153.1).

- 60 Todos estos compuestos se pueden comercializar por Sigma (St. Louis, MO), Fluka (St. Louis, MO) o Acros Organic (subsidiaria de Fisher Scientific, Palatine, IL). Como ejemplo de estudios tipo SAR comparamos compuestos que contienen tres grupos hidroxilo adyacentes en un anillo aromático (los ejemplos incluyen pirogalol, 5-hidroxidopamina, ácido gálico y galato de propilo) con compuesto que contienen dos grupos hidroxilo adyacentes (los ejemplos incluyen pirocatecol, quercetina y 1,2,4-bencenotriol). Los compuestos que contienen grupos hidroxilo que están separados por lo menos por 2 carbonos (como floroglucida) también se evalúan en cultivo celular. Esos

estudios ayudan a determinar las características estructurales fenólicas que contribuyen a la inhibición de la formación y/o el depósito de fibrillogénesis AA. También se considera la síntesis de análogos químicos de los inhibidores más potentes identificados en este documento. Esos estudios proporcionan una buena comprensión de los elementos estructurales requeridos para la bioactividad observada.

Para los estudios de cultivo celular, se usa una dosis inicial alta de los compuestos de prueba (a ser determinada empíricamente) para determinar si los compuestos pueden inhibir la formación y/o el depósito de amiloide AA, según se determina por los métodos como los descritos más adelante y en cualquier otra parte de este documento. Para esos estudios, se agrega cada compuesto aromático polihidroxiado a los cultivos al comienzo de la inducción de amiloide AA (es decir administración de AEF + SAA2). Los medios de cultivo celular que contienen cada compuesto de prueba son reemplazados cada 2 o 3 días. El % de carga de amiloide se cuantifica 5 y 10 días después de la inducción de amiloide AA y el tratamiento con los compuestos de prueba. Las comparaciones se hacen directamente con el % de carga de amiloide en cultivos inducidos sólo para el depósito de amiloide AA (es decir sin tratamiento con un compuesto de prueba). Los compuestos que se identifican como promisorios inhibidores de la formación y/o el depósito de amiloide AA fibrilar en una única dosis alta, se prueban más extensamente, y a concentraciones crecientes (es decir dosis baja, dosis media y dosis alta, a ser determinadas empíricamente) para confirmar una inhibición dependiente de la dosis de la formación y/o el depósito de amiloide AA fibrilar. Los compuestos seleccionados identificados por evaluación selectiva usando los métodos de cultivo celular como los descritos antes, se prueban después en un modelo experimental de amiloidosis AA en ratón.

La figura 15 muestra estudios de relación estructura-actividad (SAR) de diferentes compuestos aromáticos polihidroxiados comerciales. Se muestran 8 ejemplos de las estructuras de diferentes compuestos polifenólicos comerciales que difieren en la ubicación de los grupos hidroxilo en el anillo aromático que se va a usar para los estudios de evaluación selectiva de SAR.

Cuantificación del amiloide AA usando SDS-PAGE e inmunotransferencia:

Además de la cuantificación del % de carga de amiloide en cultivo después de la tinción con rojo Congo y la fluorescencia con tioflavina S usando análisis de imágenes, se determina la acumulación de amiloide AA en la capa celular y los medios usando SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia según se describió previamente (Kluve-Beckerman et al, 1999). En resumen, las capas celulares se enjuagan tres veces con medio RPMI exento de suero, se descartan en PBS, se sedimentan por centrifugación y se solubilizan en tampón de muestra de SDS. Para el análisis de amiloide AA en medios de cultivo derivados de las células, se agregan directamente alícuotas de 15 µl al tampón de muestra de SDS. Se someten muestras por triplicado a tricina-SDS-PAGE según se describió previamente (Schagger y von Jago, 1987). Usando este método, las capas de separación, espaciamiento y apilamiento contienen 16.5%, 10% y 4% de poli(acrilamida, respectivamente. Se emplean un anticuerpo monoclonal contra la proteína amiloide AA (Serotek), y la técnica de quimioluminiscencia potenciada (ECL) inmunotransferencia tipo Western de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Amersham Life Science). Usando los métodos según se describe antes, SAA2 aparece generalmente como bandas múltiples a □ 12-14 kDa y superior, mientras que la proteína AA aparece con una banda principal a □ 8.5 kDa (Kluve-Beckerman et al, 1999). Inicialmente una vez que se han establecido los cultivos celulares se implementa la secuenciación N-terminal de la banda principal a □ 8.5 kDa para confirmar la presencia de proteína AA. Hemos utilizado previamente el método de electroforesis, electroelución y secuenciación de aminoácidos para identificar otras secuencias de péptidos para otros proyectos internos.

Una vez que se establece este sistema, usamos densitometría de barrido para determinar la magnitud proteína amiloide AA en la capa celular y los medios luego de la inducción con SAA2 + AEF (5 y 10 días después de la inducción de amiloide AA), en presencia o ausencia de una dosis alta de cada compuesto aromático polihidroxiado (como se especificó antes). Se usa el promedio de 3 barridos por muestra (con muestras realizadas por triplicado en SDS-PAGE) para determinar los niveles de proteína amiloide AA en la capa celular y los medios bajo diversas condiciones. El análisis estadístico que compara el análisis de densitometría de barrido en presencia o ausencia de compuestos polifenólicos se basa en pruebas t de Student con datos que se muestran como la media +/- DE. La significancia se informa a niveles de confianza de 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) y 99.9% (p<0.001). También se usa ANOVA según sea necesario.

Ejemplo 13

Identificación de nuevos inhibidores del amiloide AA - Estudios en animales

Los estudios sugieren que ciertos compuestos aromáticos polihidroxiados, tales como epicatequina, parecen servir como potentes inhibidores de la formación y el depósito de amiloide AA fibrilar *in vivo*. Mostramos estudios en modelos animales para determinar la eficacia de los compuestos aromáticos polihidroxiados seleccionados en un modelo experimental de amiloidosis AA en ratón. Primero se pre-tratan grupos de ratones CBA/J (n = 8 por grupo) con diferentes compuestos aromáticos polihidroxiados durante un período de 7 días de pretratamiento con dosis

altas no tóxicas (a determinarse empíricamente). Se induce amiloidosis AA fibrilar en los animales mediante una única inyección subcutánea de  $\text{AgNO}_3$  y una única inyección en la vena de la cola de 100  $\mu\text{g}$  de AEF. El tratamiento durante la fase de inducción de amiloide con compuestos aromáticos polihidroxilados continúa durante otros 14 días antes del sacrificio (tiempo de tratamiento = 21 días en total). Se extraen el bazo, el hígado y los riñones de cada animal, y se cuantifica el % de carga de amiloide en cada órgano mediante análisis de imágenes. Además, se implementa inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra proteína amiloide AA, SAA, proteoglicanos/glucosaminoglucanos tipo sulfato de heparán, componente amiloide P y ApoE para evaluar los efectos de los compuestos de prueba sobre la acumulación de amiloide AA/SAA y otros cofactores del amiloide AA conocidos.

Metodología:

Grupos de tratamiento:

Se usan grupos ( $n = 8$  por grupo) de ratones hembra CBA/J de 8 semanas de vida (laboratorios Baxter) para los estudios de modelos animales. Inicialmente cada animal es pre-tratado diariamente por sonda oral (en un volumen de 0,5 ml) con un compuesto aromático polihidroxilado específico (seleccionado de los resultados de las pruebas anteriores) a una dosis inicial alta no tóxica (a determinarse empíricamente) durante un período de pretratamiento de 7 días. Normalmente nuestras dosis previas de bajas a altas con compuestos aromáticos polihidroxilados administrados por vía oral, van desde una dosis baja de 25 mg/kg/día, a una alta dosis de 500 mg/kg/día. Se usan dosis equivalentes para comparar diferentes compuestos aromáticos polihidroxilados teniendo en cuenta la toxicidad del compuesto y la solubilidad del compuesto (en PBS). La administración por sonda oral se realiza mediante una aguja de dosificación oral de 22 gauge (Popper) de los compuestos de prueba disueltos en un 0.50 ml de PBS (pH 7.4). El día 8, se induce amiloidosis AA en todos los animales mediante una sola inyección subcutánea de 0,5 ml de  $\text{AgNO}_3$  al 3% (Fisher) en agua desionizada bidestilada. Esto es seguido de una única inyección en la vena de la cola de 100  $\mu\text{g}$  de AEF en agua desionizada bidestilada. Los animales se tratan durante otros 14 días con cada uno de los compuestos polihidroxilados específicas. A un grupo de 12 ratones se le induce amiloidosis AA (mediante  $\text{AgNO}_3 + \text{AEF}$  como se describió antes) y se tratan oralmente con PBS (pH 7.4) solo, en ausencia de cualquier compuesto de prueba. Al final del período de tratamiento de 21 días, los animales se sacrifican mediante sobredosis con 0.1 ml de euthosol y se extraen el bazo, el hígado y los riñones de cada animal para tinción e inmunohistoquímica. El número de animales por grupo ( $n = 8$  para los compuestos de prueba;  $n = 12$  para el grupo de control con solución salina) se determina a partir de datos obtenidos y cálculos basados en un nivel alfa de 0.05 (bilateral) y desviaciones estándar de 0.5, que dan una potencia de 94%.

Producción de AEF:

El AEF se prepara como se describió antes.

Fijación y preparación de tejidos:

La fijación y la preparación del tejido se hace como se describió antes (Snow et al., 1991). En resumen, se extraen el bazo, el hígado y los riñones de cada animal, se fijan en etanol al 90% y formaldehído al 10% durante 24 horas a  $-20^\circ\text{C}$ , se incluyen en parafina y se cortan a 25  $\mu\text{M}$  (cortes gruesos necesarios para la cuantificación de la carga de amiloide como se describe a continuación). Aproximadamente 50-75 cortes por animal.

Tinción con rojo Congo y fluorescencia con tioflavina S:

La acumulación de amiloide AA fibrilar se detecta mediante tinción con rojo Congo (Puchtler et al, 1962) y fluorescencia con tioflavina S (Elghetany y Saleem, 1988) como se describió antes.

Cuantificación de la carga de amiloide en los tejidos:

El análisis de imágenes también se utiliza para cuantificar el % de carga de amiloide presente en el bazo, el hígado y el riñón, de cada animal. El % de carga de amiloide en cada órgano se cuantifica como se evaluó luego de la tinción con rojo Congo (tal como se ve bajo la luz polarizada) o tioflavina S (como se ve bajo la luz fluorescente). Se usan 5 a 7 portaobjetos equidistantes por animal por tinción (en cada grupo de tratamiento) para determinar el % de carga de amiloide con un aumento dado ( $\times 100$ ). El análisis de imágenes cuantitativo de la carga de amiloide en un órgano determinado (y a un aumento específico) se realiza mediante el sistema de análisis de imágenes descrito antes. Las posibles reducciones de carga de amiloide se determinan cuantitativamente para cada compuesto aromático polihidroxilado para cada órgano/animal. Se espera que ciertos compuestos de prueba reduzcan la carga de amiloide en 40-60%.

## Inmunohistoquímica:

También se hace inmunotinción de los cortes de tejido para detectar marcadores de proteína amiloide AA importantes y cofactores asociados al amiloide AA conocidos. Se usa un anticuerpo monoclonal contra la proteína amiloide AA (Serotek) para confirmar la ubicación de los depósitos de amiloide AA, mientras que se usa un anticuerpo monoclonal contra SAA (Serotek) para detectar la proteína precursora, SAA. La presencia de perlecan (un proteoglicano específico de sulfato de heparán implicado en la amiloidosis AA) (Snow et al, 1991) se detecta mediante un anticuerpo monoclonal contra la proteína central de perlecan (conocida como HK-102; regalo generoso de Dr. Koji Kimata, Japón) (Snow et al, 1994), mientras que se usa un anticuerpo de fracción periplásmica generado por expresión en fago (conocido como HS4C3, regalo generoso de Dr. Van Kuppevelt) (van Kuppevelt et al.1998) contra un epítipo específico de las cadenas del GAG sulfato de heparán para determinar la co-localización de los GAG tipo sulfato de heparán. El componente amiloide P se detecta mediante un anticuerpo policlonal (Research Diagnostics), mientras que la ApoE se detecta utilizando un anticuerpo policlonal (Research Diagnostics).

Para la localización del anticuerpo utilizamos técnicas de fluorescencia corrientes (Basgen et al., 1989; Mosedale et al., 1996). El anticuerpo primario para tinción inmunohistoquímica se usa a través de una serie de diluciones para obtener la mejor especificidad con la menor tinción de fondo. Los controles para la inmunotinción positiva consisten en cortes tratados con 1) preabsorción del anticuerpo primario con exceso de antígeno (si está disponible), 2) un anticuerpo primario diferente de la misma clase y especie de Ig, y/o 3) PBS + 1% albúmina de suero bovino en lugar del anticuerpo primario (para asegurar que no hay ninguna unión inespecífica de los anticuerpos secundarios empleados).

## Farmacología y utilidad:

Los compuestos dados a conocer actúan inhibiendo o previniendo la formación de fibrilla amiloide, inhibiendo o previniendo la multiplicación de fibrillas amiloides y/o causando una disgregación, ruptura y/o desintegración de las fibrillas amiloides preformadas y de los depósitos de proteína amiloide. Su actividad se puede medir *in vitro* por métodos tales como los tratados en los ejemplos 1 a 4, mientras que su actividad *in vivo* contra la amiloidosis se puede medir en modelos animales, como los de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la amiloidosis sistémica AA, la diabetes tipo 2 y otras.

Los compuestos también actúan inhibiendo o previniendo la formación de fibrillas de alfa-sinucleína/NAC, inhibiendo o previniendo la multiplicación de fibrillas de alfa-sinucleína/NAC, y/o causando disgregación, ruptura y/o desintegración de las fibrillas preformadas de alfa-sinucleína/NAC y los depósitos de proteína asociados a la alfa-sinucleína/NAC. Su actividad se puede medir *in vitro* por métodos tales como los tratado en el ejemplo 4 supra.

El índice terapéutico de un compuesto se puede determinar, por ejemplo, comparando la dosis que da una actividad anti-fibrilla eficaz (actividad anti-amiloide o anti-alfa-sinucleína/NAC en un modelo adecuado *in vivo* en una especie animal adecuada como el ratón, con la dosis que provoca una pérdida de peso significativa (u otros efectos secundarios observables) en las especies animales de prueba.

## Composiciones farmacéuticas y administración

En general, los compuestos se administran en forma aislada pura, en cantidades terapéuticamente eficaces, por cualquiera de los modos habituales conocidos en el área, solos o en combinación con al menos otro compuesto y/o al menos otro fármaco convencional para la enfermedad que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad, su gravedad, la edad y el estado de salud relativo del animal que se está tratando, la potencia del o de los compuestos y otros factores. Como agentes anti-fibrilla, las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos pueden variar de 10 a 1000 mg/kg de peso corporal; por ejemplo de 10 a 100 mg/kg de peso corporal. Un experto será capaz sin una experimentación indebida, teniendo en cuenta su capacidad y esta divulgación, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención para el tratamiento de amiloidosis.

En general, los compuestos se administran como composiciones farmacéuticas por una de las rutas siguientes: oral, tópica, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, o por supositorio) o parenteral (por ejemplo inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa). Las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición adecuada; y comprender al menos un compuesto en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos, y ellos y los métodos de elaboración de las composiciones, se pueden encontrar en referencias clásicas como Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton PA, 1985. Los vehículos líquidos adecuados, especialmente para soluciones inyectables incluyen agua, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa y glicoles.

En particular, los compuestos se pueden administrar, oralmente, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensión acuosa u oleosa, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral se pueden preparar por cualquier método conocido en el área de la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo formado por edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y apetecibles.

Los comprimidos contienen el compuesto mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables, atóxicos, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Esos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; aglutinantes, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina o acacia y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio o ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no recubrirse o recubrirse usando las técnicas conocidas para retardar desintegración y la absorción en el tubo digestivo y proporcionar así una acción sostenida durante un período más prolongado. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol. Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que se mezcla el principio activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen el compuesto mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son suspendentes, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia; los dispersantes o humectantes pueden ser fosfátidos de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos como hexitol, como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales de ácidos grasos y un anhídrido de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más colorantes, uno o más saborizantes, o uno o más edulcorantes como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el compuesto en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden agregar edulcorantes, como los indicados a continuación, y saborizantes para proporcionar una preparación oral apetecible. Estas composiciones se pueden conservar agregando un antioxidante como ácido ascórbico. Los polvos y los gránulos dispersables, adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante agregado de agua, proporcionan al principio activo mezclado con un dispersante o humectante, un suspendente y uno o más conservantes. Los dispersantes o humectantes y los suspendentes adecuados están ejemplificados por los descritos antes. También pueden estar presentes otros excipientes, por ejemplo edulcorantes y saborizantes.

Los compuestos pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de arachis, o un aceite mineral por ejemplo parafina líquida, o mezcla de éstos. Los emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma de acacia o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán. La emulsión también puede contener edulcorantes y saborizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con edulcorantes, por ejemplo, glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y saborizantes y colorantes.

Los compuestos también se pueden administrar mediante inyección o infusión, ya sea por vía subcutánea o intravenosa, o intramuscular, o intraesternal, o intranasal, o mediante técnicas de infusión en forma de inyectable estéril o suspensión oleaginosa. Los compuestos también pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Esas suspensiones se pueden formular de la manera conocida en el área usando dispersantes o humectantes y suspendentes adecuados que han sido descritos antes. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos, estériles, como solvente o medio de suspensión. Para este propósito se pueden emplear convencionalmente todos los aceites fijos blandos inclusive mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos, como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de los inyectables.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis fraccionadas o la dosis se puede reducir proporcionalmente en función de las exigencias de la situación terapéutica.

5 Es especialmente ventajoso formular los compuestos en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosis. Forma farmacéutica unitaria, según se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como unidades de dosificación para los sujetos que se van a tratar, donde cada unidad contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y al menos un excipientes  
10 farmacéutico. Un fármaco comprenderá una forma farmacéutica unitaria dentro de un envase rotulado o acompañado por una etiqueta que indica el método de tratamiento, por ejemplo el tratamiento de una enfermedad amiloide, como la enfermedad de Alzheimer, o de una enfermedad asociada a la formación de fibrillas de alfa-sinucleína, como la enfermedad de Parkinson. Una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente la amiloidosis o una enfermedad asociada a la formación de fibrillas de alfa-sinucleína en un paciente en al menos 20,  
15 más preferentemente en al menos 40%, incluso más preferentemente en al menos 60% y todavía más preferentemente en al menos 80%, en comparación con los sujetos sin tratar.

#### Preparación de los compuestos

20 Muchos de los compuestos utilizados en los métodos divulgados son bien conocidos por los expertos y están disponibles en el comercio. Pueden estar descritos brevemente en referencias tales como el Index Merck, 12<sup>a</sup> edición, Merck y Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, 1996 (que normalmente proporciona una referencia a la síntesis o el aislamiento) y se pueden encontrar en catálogos químicos, como los de los proveedores comerciales como los descritos en este documento.

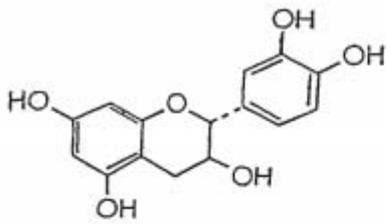
#### 25 Aplicabilidad industrial

La invención encuentra utilidad a nivel mundial en cuanto proporciona alivio terapéutico y asistencia diagnóstica en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de cuerpos de Lewy, mediante el uso de una catequina.

30 En cumplimiento de lo dispuesto en el estatuto, la invención ha sido descrita en lenguaje más o menos específico en lo que se refiere a características estructurales. Se debe entender, sin embargo, que la invención no está limitada a las características específicas que se muestran, ya que los medios y la construcción que se muestran comprenden las formas preferidas de poner la invención en vigor. Por consiguiente, la invención se reivindica en cualquiera de sus formas o modificaciones en el ámbito legítimo y válido de las reivindicaciones adjuntas, adecuadamente interpretadas de conformidad con la doctrina de los equivalentes.

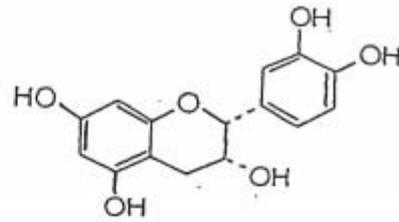
## REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una catequina en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de cuerpos de Lewy, donde la catequina se selecciona del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.
- 10 2. Una catequina seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes, para tratar la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de los cuerpos de Lewy.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1, donde el medicamento es para administración oral, inyección parenteral, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, administración tópica o administración por nebulización de aerosol.
- 20 4. La catequina de la reivindicación 2, que es para administración oral, inyección parenteral, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, administración tópica o administración por nebulización de aerosol.
- 25 5. Un método de tratamiento de fibrillogénesis de alfa-sinucleína o NAC en un ambiente *in vitro*, donde el método comprende el paso de administrar en el ambiente *in vitro* una cantidad terapéuticamente eficaz de una catequina, seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.
- 30 6. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de los cuerpos de Lewy que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una catequina seleccionada del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la cantidad terapéuticamente eficaz de la catequina comprende una dosis en el rango de aproximadamente 0.1 a 500 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 35 7. La composición de la reivindicación 6, donde la cantidad terapéuticamente eficaz de la catequina comprende una dosis en el rango de aproximadamente 1.0 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 40 8. La composición de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende una mezcla de dos o más de las catequinas seleccionadas del grupo que consiste en catequina, epicatequina, galato de galocatequina, galato de epigalocatequina, epigalocatequina y galato de epicatequina, y las sales farmacéuticamente aceptables de las catequinas precedentes.
9. La composición de la reivindicación 6, 7 u 8 donde la catequina seleccionada está en forma aislada sustancialmente pura.



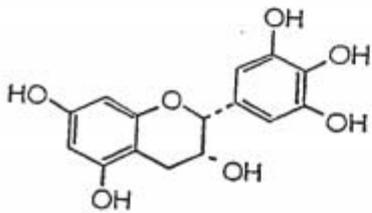
(+)-Catequina((+)-C),

Fig. 1A



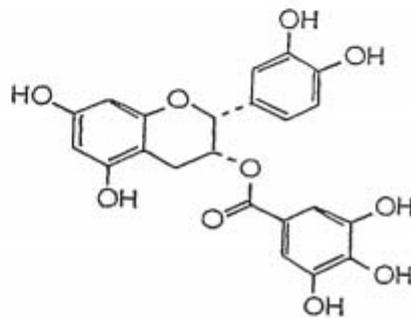
(-)-Epicatequina ((-)-EC),

Fig. 1B



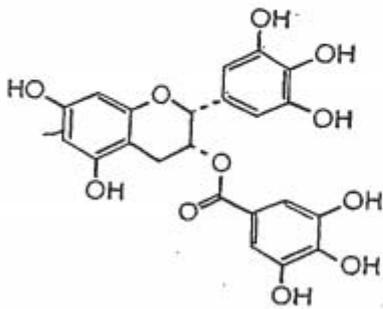
(-)-Epigallocatequina((-)-EGC),

Fig. 1C



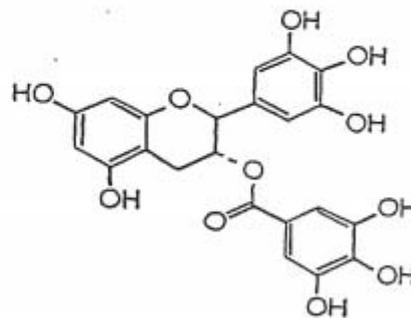
(-)-Galato deepicatequina((-)-ECg),

Fig. 1D



(-)-Galato de epigallocatequina ((-)-EGCg),

Fig. 1E



(-)-Galato de galocatequina ((-)-GCg)

Fig. 1F

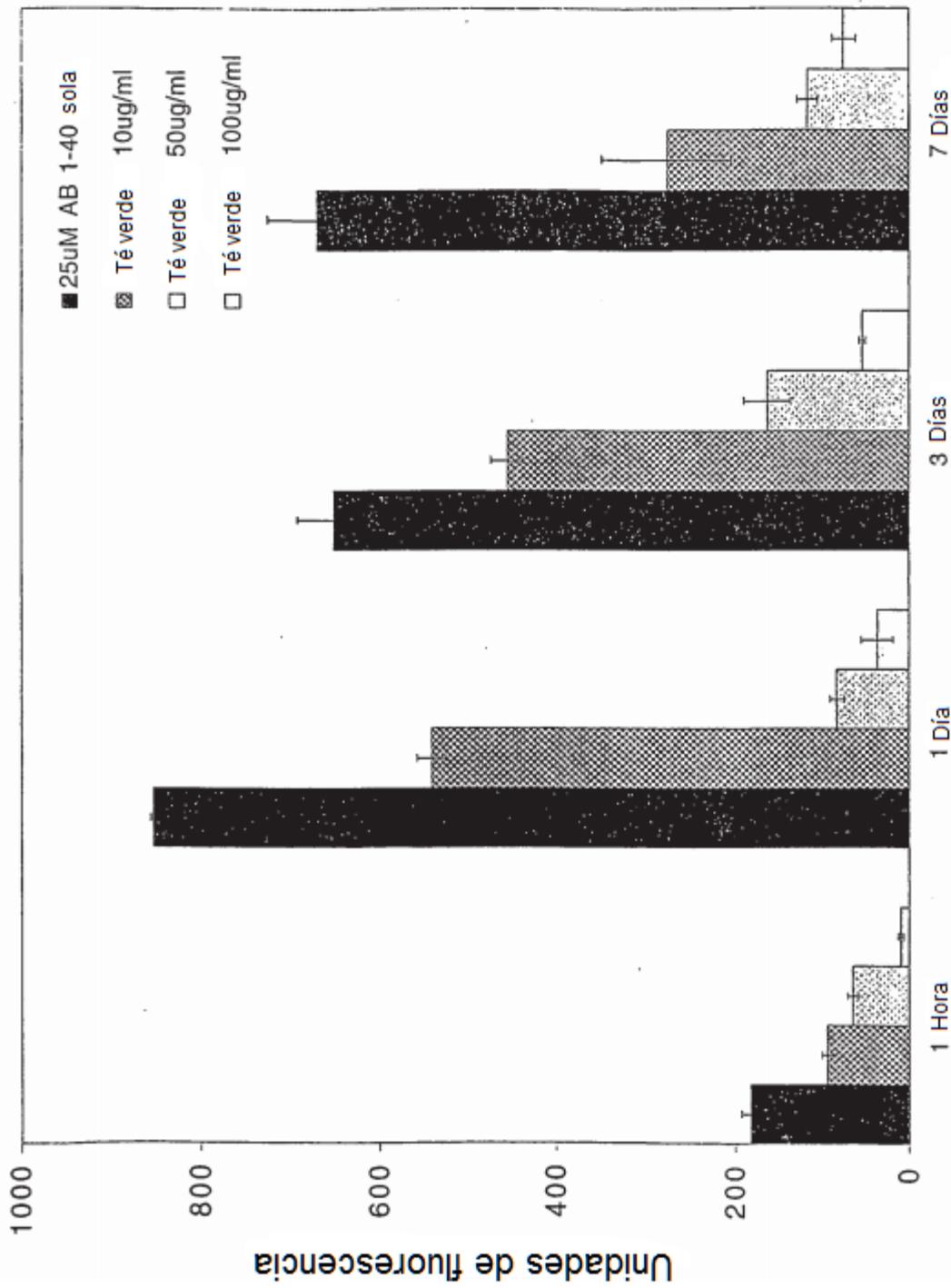
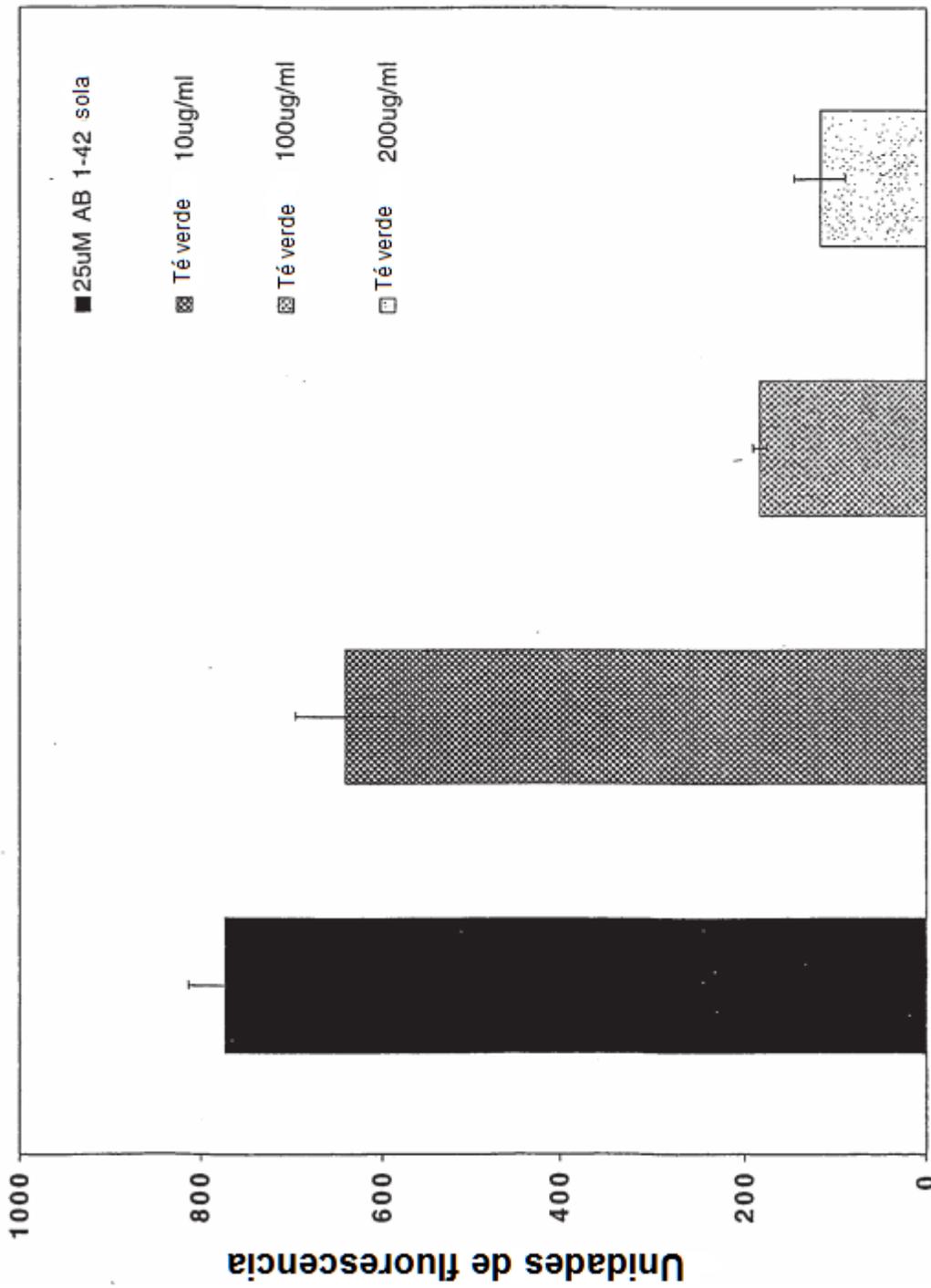


Fig. 2

Tiempo



Tratamiento

Fig. 3

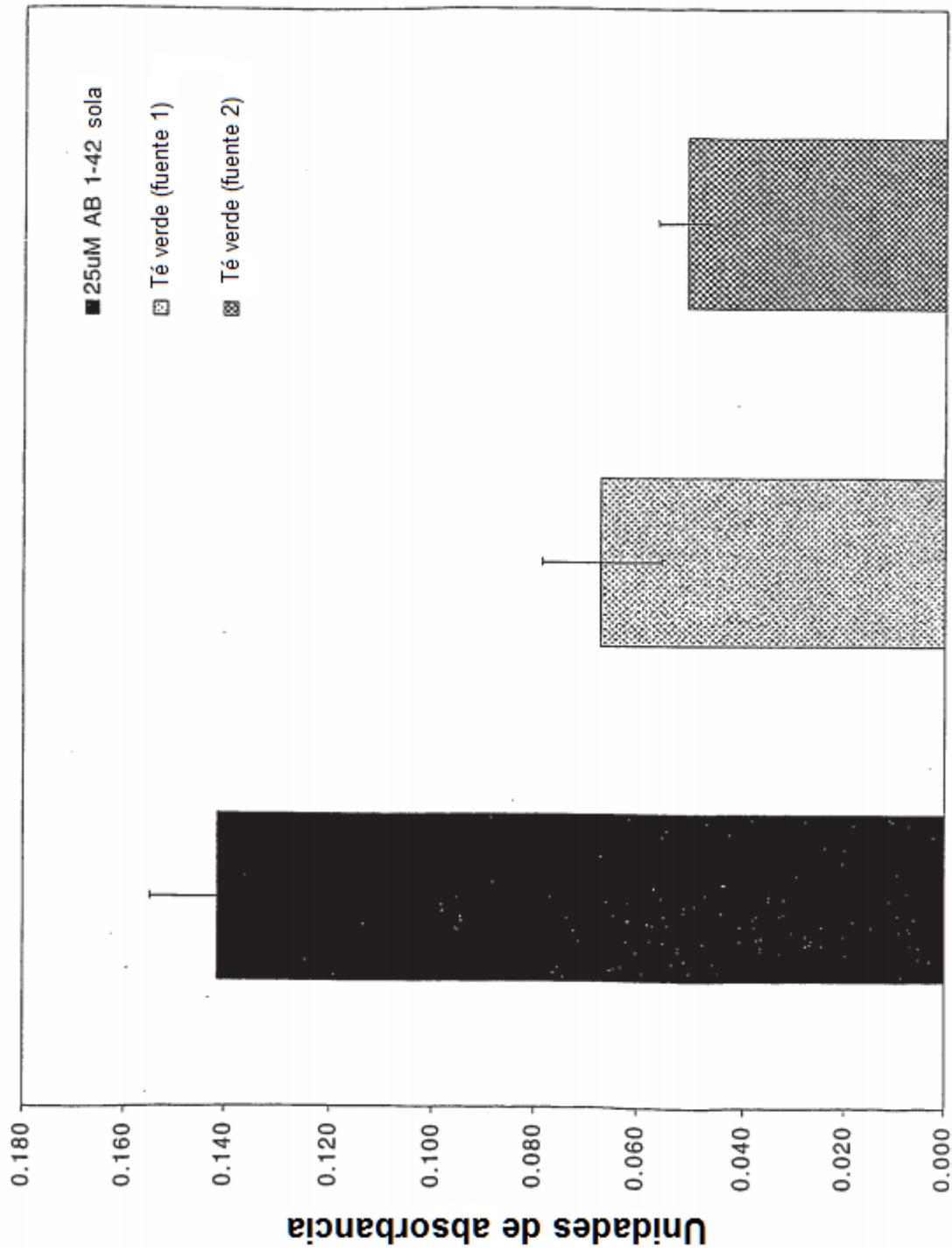
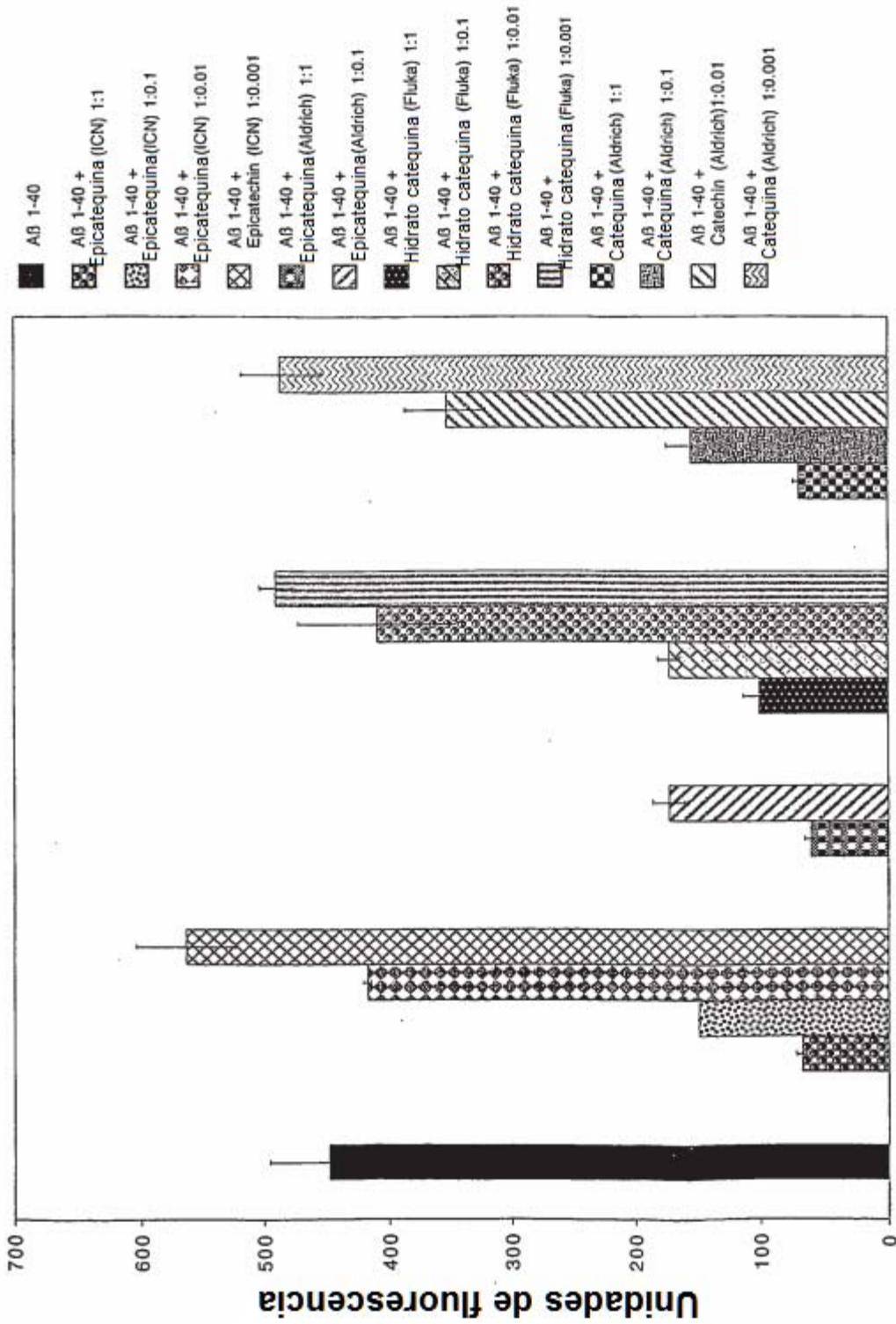


Fig. 4  
Tratamiento



Tiempo de tratamiento (7 días)

Fig. 5

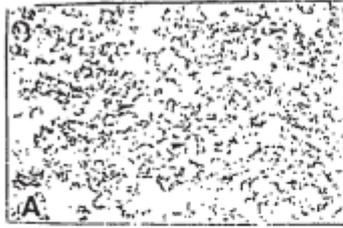


Fig. 6A

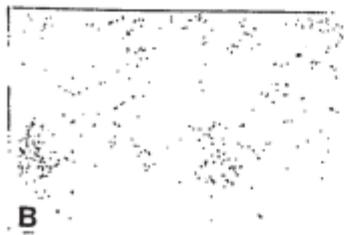


Fig. 6B

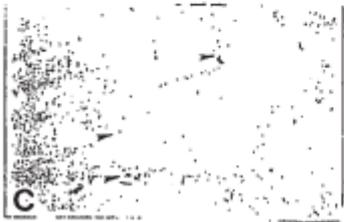


Fig. 6C

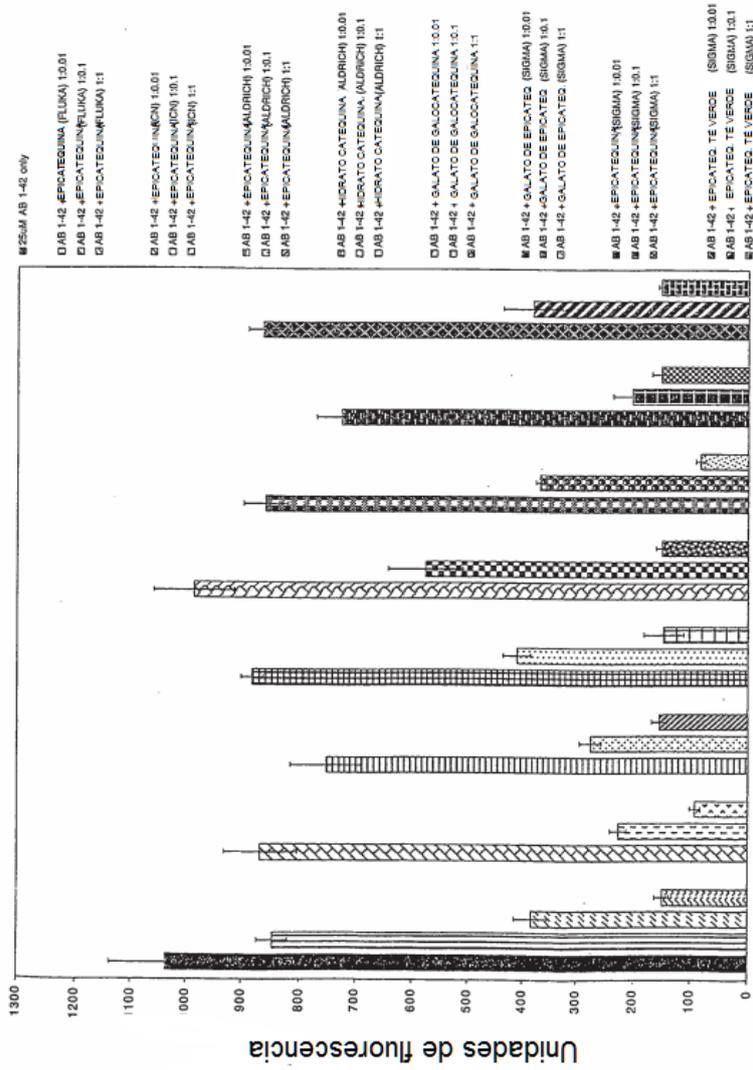


Fig. 7

Tiempo de tratamiento

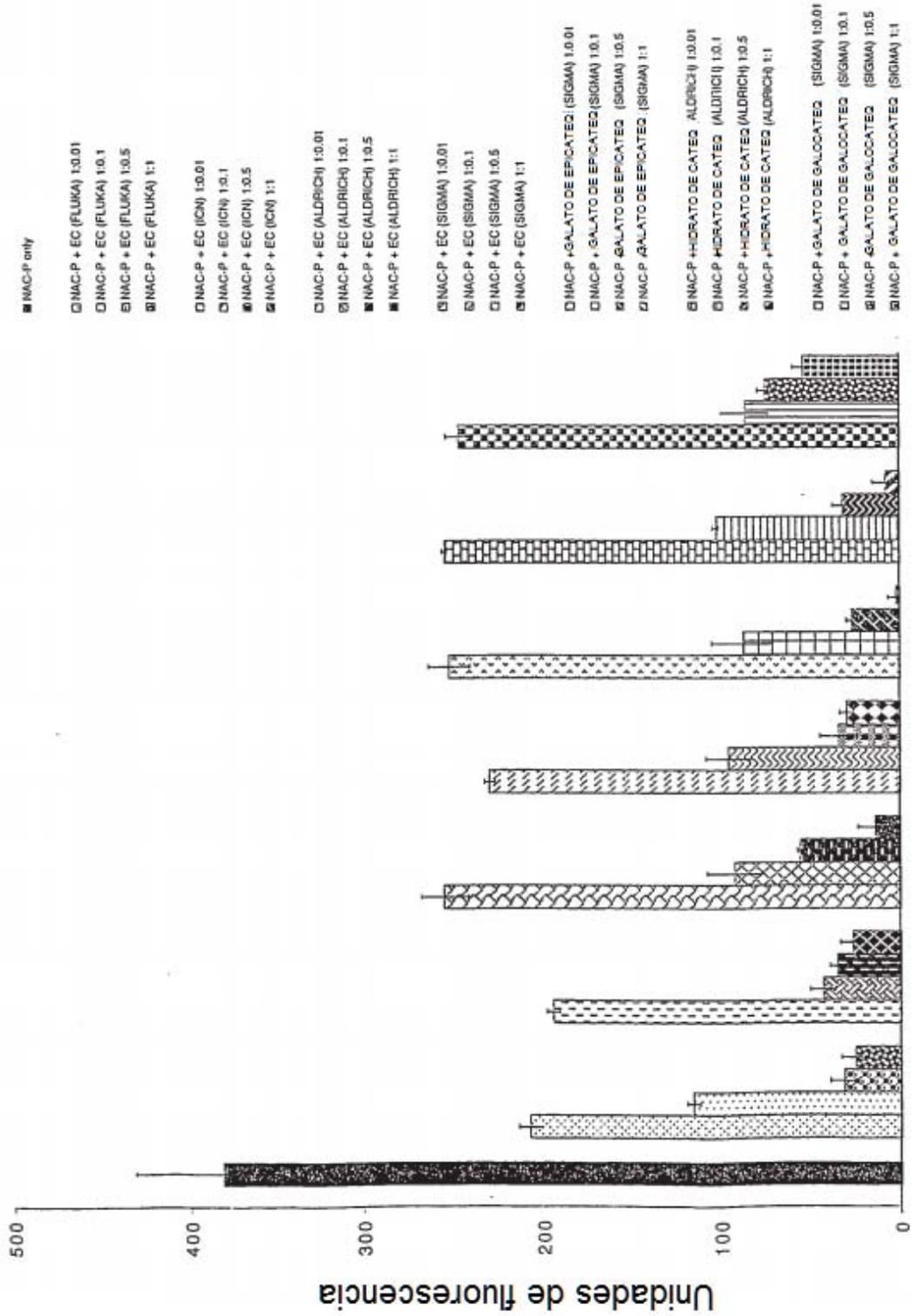


Fig. 8

Tiempo de tratamiento (7 días)

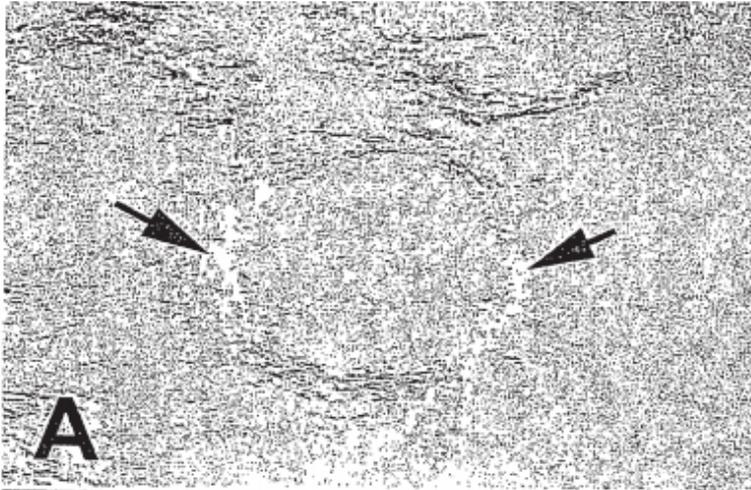


Fig. 9A

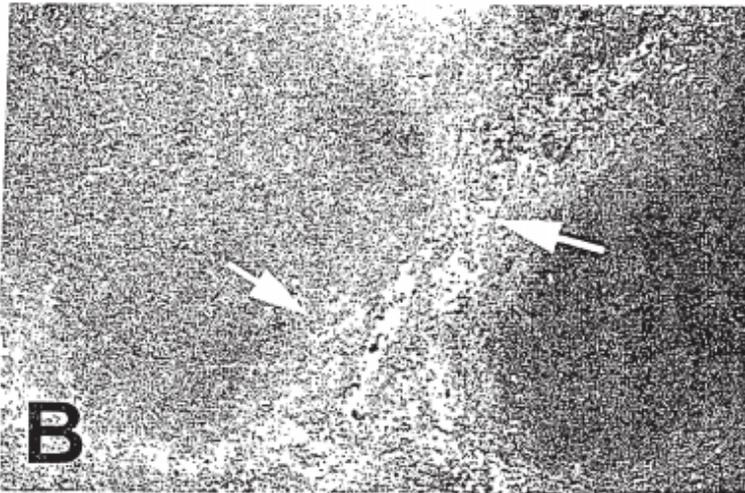


Fig. 9B



Fig. 9C

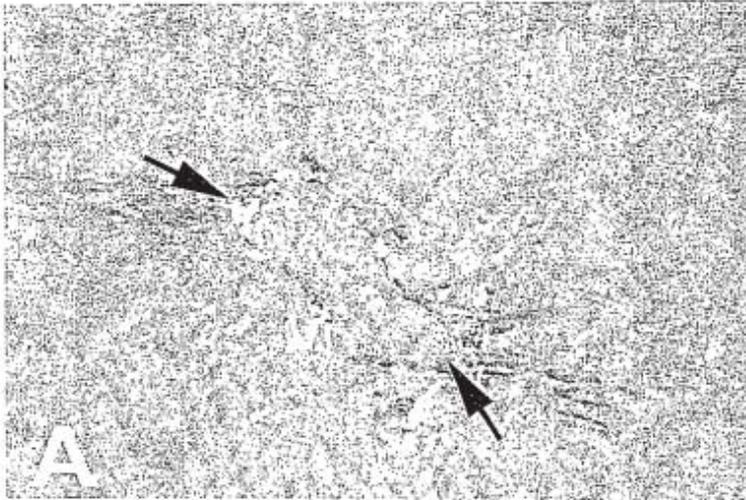


Fig. 10A

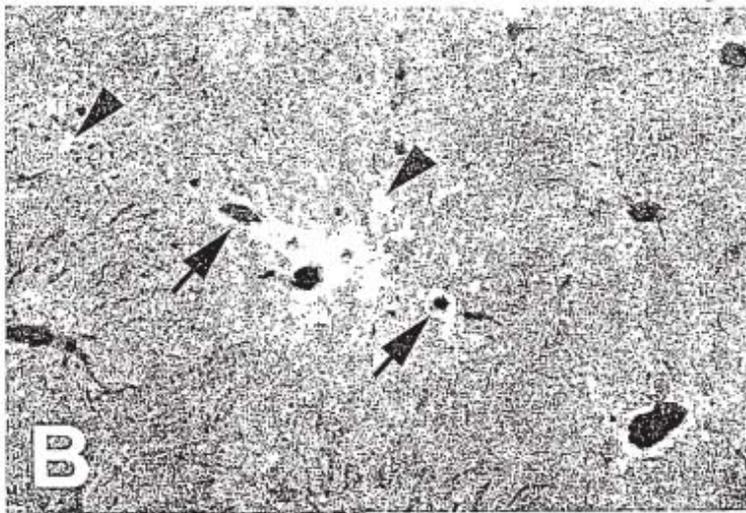


Fig. 10B

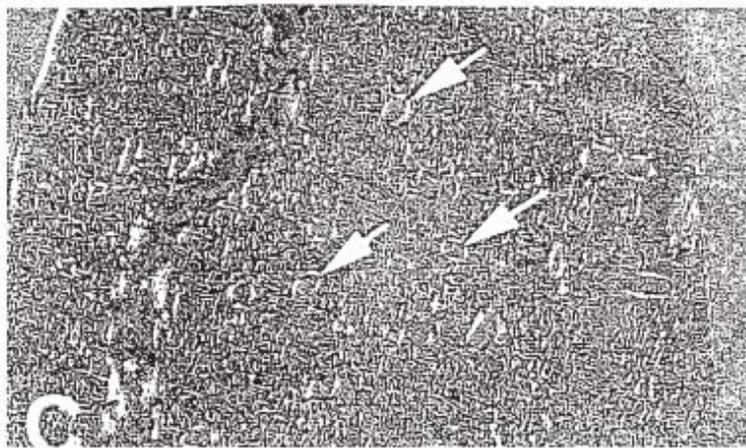


Fig. 10C

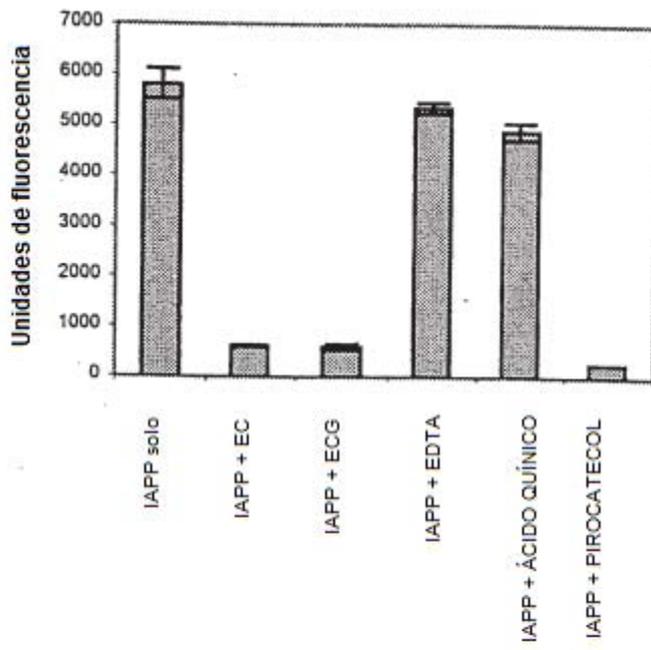


Fig. 11

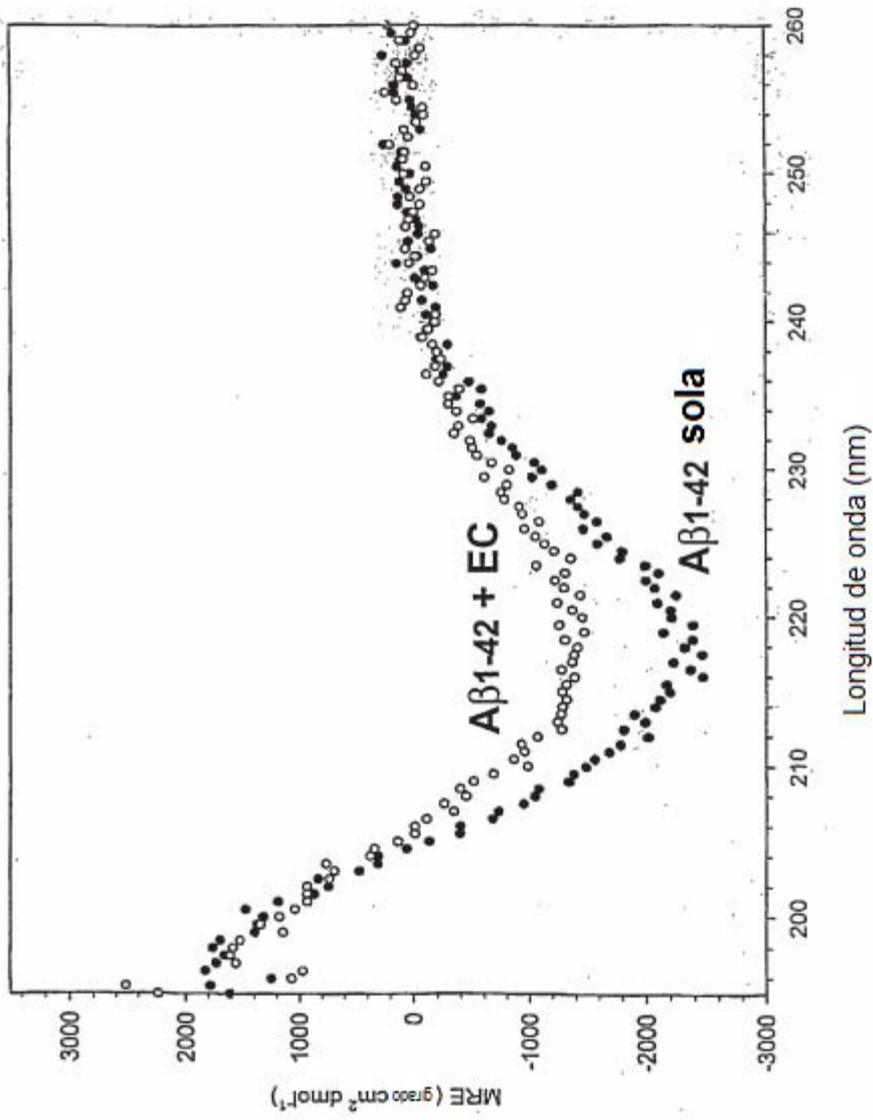


Fig. 12

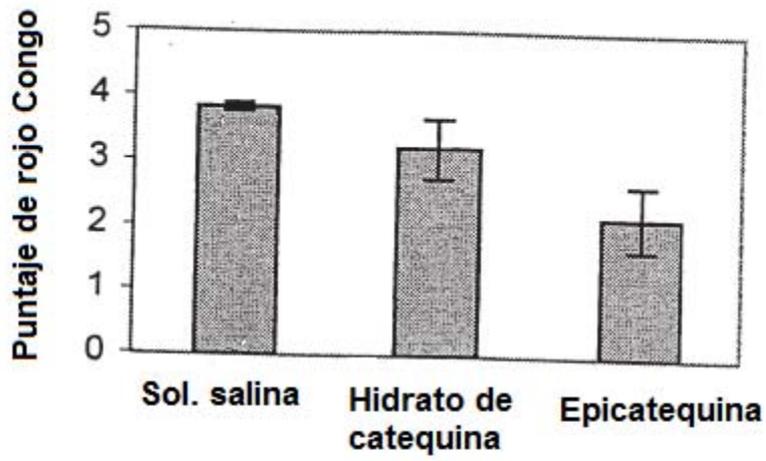


Fig. 13

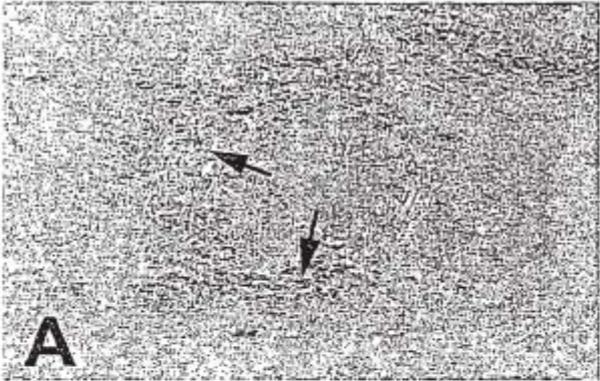


Fig. 14A

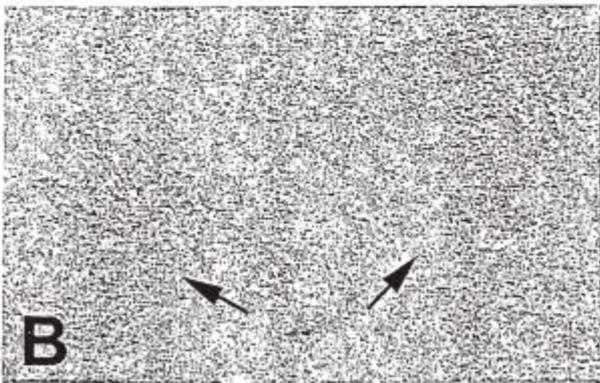


Fig. 14B

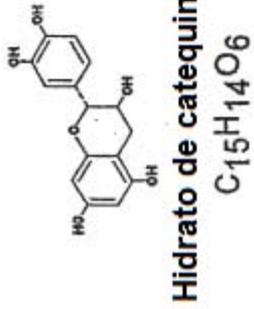


Fig. 15A

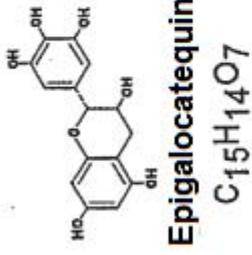


Fig. 15B

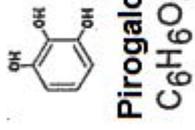


Fig. 15C

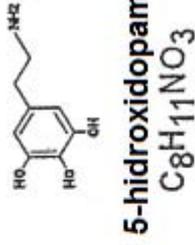


Fig. 15D

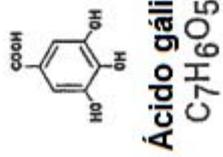


Fig. 15E

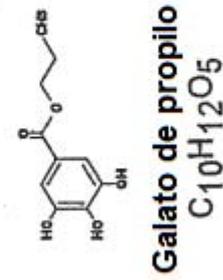


Fig. 15F

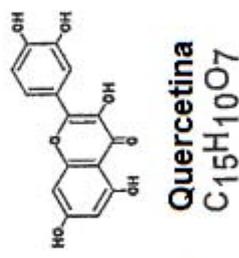


Fig. 15G

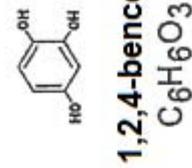


Fig. 15H