

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 725**

51 Int. Cl.:

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 31/194 (2006.01)

A61K 31/7012 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2003 E 03782083 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1582209**

54 Título: **El uso de ésteres de derivados de succinato para el tratamiento de la demencia**

30 Prioridad:

31.12.2002 CN 02159342

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

14.02.2013

73 Titular/es:

**THE INSTITUTE OF MATERIA MEDICA OF
CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
(100.0%)**

**1 XIAN NONG TAN STREET
XUAN WU DIST., BEIJING 100050, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, JIANJUN;
SHI, JIANGONG;
WANG, YAFANG;
ZHANG, DAN;
GAO, MEI;
YANG, YONGCHUN y
HUANG, SHENGYANG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 395 725 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

El uso de ésteres de derivados de succinato para el tratamiento de la demencia

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con el uso de un extracto que contiene derivados de éster de succinato de Wangla (*Coeloglossum viride* (L.) Hartm- Var- *Bracteatum* (Wild.) Richter) (Orquídea de sátiro), a derivados sintéticos de ésteres de succinato, y a sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de la demencia, particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

Antecedente de la invención

15 Actualmente, la esperanza de vida promedio en China es de 70 años de edad. Según predicciones de una investigación científica realizada en el extranjero, se indica que en el año 2025 existirá un 18,8 % de personas en torno a los 65 años de edad. Estos datos indican que, 20 años después, existirá una persona mayor por cada 5 personas. La enfermedad de Alzheimer tiende a producirse en personas mayores de 50 años. La demencia multi infarto o la demencia senil debidas a cambios patológicos cerebro vasculares se producen en personas mayores de 20 60 años. A medida que la población mundial alcanza una edad más avanzada, se espera que aumente la incidencia de la enfermedad de Alzheimer y la demencia senil. El envejecimiento y las enfermedades degenerativas neurológicas peculiares -los diferentes tipos de demencia experimentan dos tipos de muerte, primero espiritual, y después física. Esto no solamente aflige a los pacientes, sino que también representa una carga para sus familias y la sociedad. Se considera que el envejecimiento de la población es un factor adverso que afecta al desarrollo y a la 25 estabilidad social, solo inferior a las guerras, plagas, hambrunas y a la falta de recursos.

La demencia es un síndrome obstaculizante del intelecto adquirido y duradero producido por un impedimento en la función cerebral que incluye declive cognitivo, deterioro de la memoria, lenguaje, pensamiento, comportamiento, y personalidad anormales. La demencia incluye principalmente la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular, y 30 etc. Los cambios patológicos de la enfermedad de Alzheimer implican la formación de placas seniles, compuestas principalmente por un componente denominado A β (péptido β -amiloide), la pérdida de neuronas colinérgicas y la deposición de A β en el endoteliecito de los vasos sanguíneos, etc. La demencia vascular está inducida por enfermedades cerebro vasculares, principalmente isquemia. Los cambios patológicos implican múltiples enfermedades lagunares, cambios por infarto y ateroscleróticos a gran escala. Recientes estudios indican que 35 factores vasculares participan en el proceso de la demencia senil y la ausencia de flujo sanguíneo es el principal factor de riesgo.

Existen muchos tipos de fármacos para evitar el envejecimiento y tratar la demencia senil. Hasta el momento los remedios más destacados aplicados clínicamente son los fármacos colinérgicos y los **inhibidores de la 40 acetilcolinerasa** (ChEI), acompañados con un tratamiento adyuvante para la mejora de la circulación cerebro vascular y la protección del cerebro, aunque su efecto es limitado. Entre los fármacos que aumentan la función del sistema colinérgico, solo el precursor de Ach muestra leves efectos terapéuticos. Aunque los agonistas del receptor Ach y los ChEI tienen algunos efectos, la duración es demasiado corta y los efectos adversos relativamente grandes. Los fármacos de dilatación cerebro vascular ayudan en el suministro de energía y en la mejora intelectual 45 potenciando el suministro sanguíneo al cerebro, pero los fármacos realmente valiosos para la dilatación cerebro vascular deben tener una elevada selectividad, junto a inacción sobre el metabolismo cerebral y 'hurto de sangre' y tengan efectos antiagregadores de las plaquetas sanguíneas y antitrombo. Nimodipina, un antagonista del calcio, cumple alguno de los anteriores criterios, pero actúa solamente sobre el canal de Ca $^{2+}$ regulado por tensión de tipo L y no tiene efectos sobre las canales de Ca $^{+2}$ de tipo N y de tipo T. Algunos neuropéptidos y NGF se consideraban prometedores para el tratamiento de la demencia, pero los resultados de sus ensayos clínicos fueron 50 desalentadores, y principalmente atribuidos a la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y a ejercer sus acciones en el cerebro. Desde que se inició la comercialización de 2-pirrolidona acetamida (nombre comercial Piracetam), no hay duda según los informes iniciales de que se trata de un nuevo agente nootrópico. Se ha notificado recientemente en el país de los inventores y en el extranjero que tiene un leve efecto o no actúa en todos 55 los tipos de deterioro de la memoria y demencia senil. Es un compuesto soluble en agua y tiene una baja permeabilidad a través de la BHE, y es difícil concentrarlo en la diana para ejercer su efecto.

Coeloglossum viride (L.) Hartm. Var. *bracteatum* (Wild.) Richter está ampliamente distribuida, principalmente en el oeste de China, tal como en Tíbet, Mongolia interior, Shanxi, Gansu, Qinghai, etc. El rizoma seco de *Coeloglossum 60 viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* es la famosa medicina tibetana denominada Wangla, que tiene una larga historia de uso en las minorías del oeste de China. Las indicaciones eran múltiples, tal como estimular la energía vital, promover la producción de fluido corporal, tranquilizar y potenciar la inteligencia.

Mediante la selección preliminar de la actividad biológica de esta planta, los inventores han encontrado que el extracto etanólico del rizoma de esta planta tiene actividades de mejora intelectual, sedación y contra la fatiga 65 intelectual preferibles, lo que es consistente con sus indicaciones. Basándose en los resultados, los investigadores

han investigado sistemáticamente el componente químico y la actividad biológica de esta planta, y se han aislado e identificado algunos derivados de los monoésteres y diésteres de succinato. Los componentes químicos de *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter han sido publicados por los inventores, pero no se han notificado las actividades biológicas del extracto y los compuestos purificados. (Véanse: Huang Sheng-Yang, Shi Jian-Gong, Yang Yun-Chun, Hu Shi-lin, Studies on the Chemical Constituents of *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter., Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(3), 199-203; Sheng Yang HUANQ Jian Gong SHI, Yong Chun YANQ, Shi Lin HU. Two new isobutyltartrate monoesters from *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter Chinese Chemical Letters, 2002, 13(6): 551-554.).

10 **Descripción detallada de la invención**

Para superar la falta de la técnica anterior, el objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para el tratamiento de la demencia, particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular utilizando un extracto que contiene derivados de ésteres de succinato de Wangla (*Coeloglossum viride* (L.) Hartm. Var. *Bracteatum* (Wild.) Richter), y derivados sintéticos de ésteres de succinato definidos por la fórmula L.

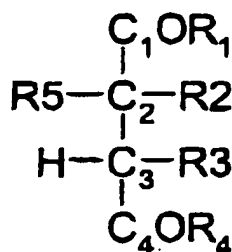
La composición farmacéutica utilizada en el presente documento comprende derivados del éster de succinato de fórmula (I) como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Los compuestos de la presente invención incluyen sus derivados, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables.

El objeto de la presente invención es proporcionar el uso del extracto de *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la demencia, particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

La composición farmacéutica utilizada en el presente documento comprende el extracto de *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. Var. *bracteatum* (Wild.) Richter como principio activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

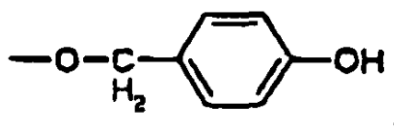
30 Particularmente la presente invención está relacionada con los compuestos de fórmula (I):



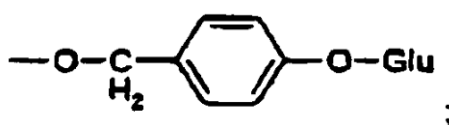
(I)

en la que

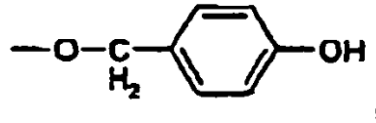
R₁ y R₄ se seleccionan entre -OCH₃, -OH, -O-Glu,



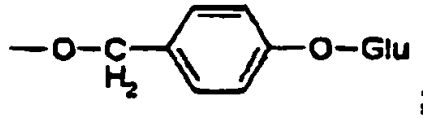
y



R₂ y R₃ se seleccionan entre H, -OH, -O-Glu,



y

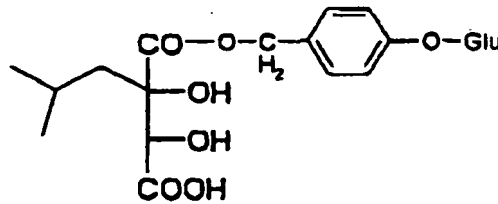


R₅ se selecciona entre alquilo C₁₋₆ ramificado o no ramificado, preferiblemente entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, más preferiblemente, entre isopropilo, terc-butilo, e isobutilo;

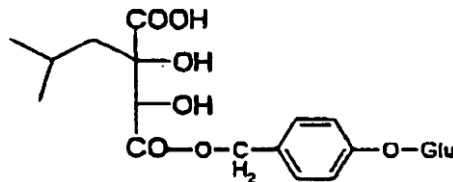
5

La configuración de los centros quirales en C-2 y C-3 es 2R3S, 2R3R, 2S3S y 2S3R respectivamente.

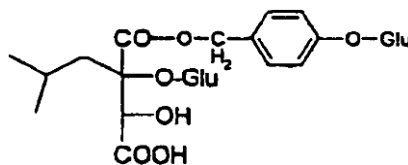
A fin de conseguir el objetivo de esta invención, las estructuras preferibles incluyen, pero no se limitan a:



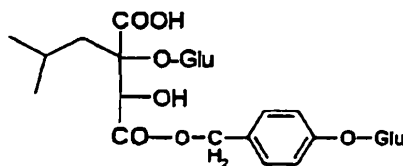
1-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-isobutiltartrato (coelovirina A) (W1)



10 4-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-isobutiltartrato (coelovirina B) (W2)

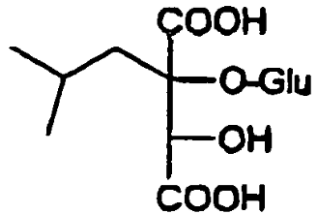


1-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutiltartrato (coelovirina C) (W3)



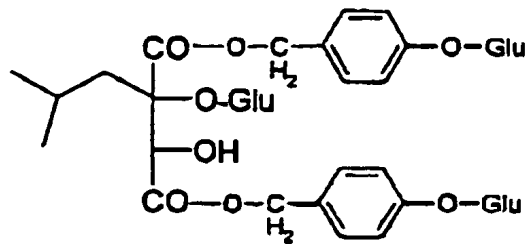
4-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutiltartrato (coelovirina D) (W4)

5

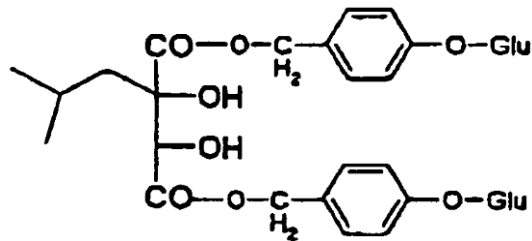


10

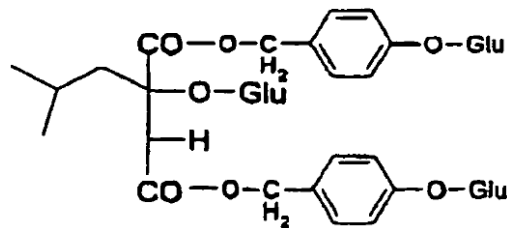
15 2-β-D-glucopiranosil-2-isobutiltartrato (W5)



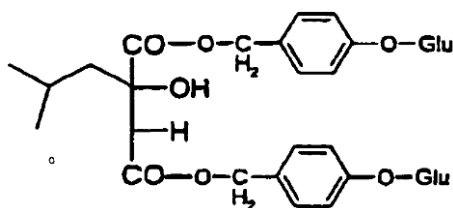
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutiltartrato (dactilorina B) (W6)



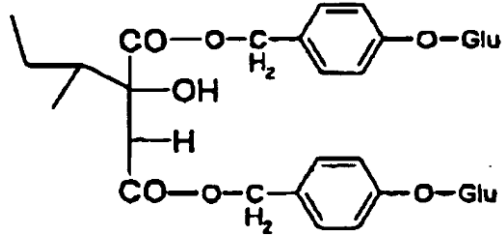
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-isobutyltartrato (loroglosina) (W7)



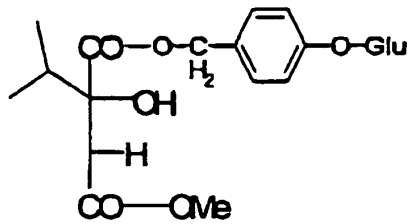
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutilmalato (dactilorina A) (W8)



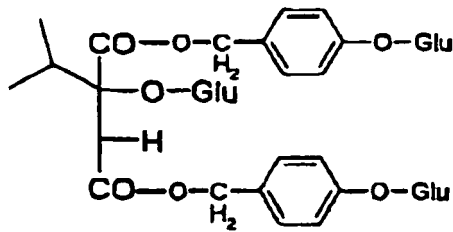
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-hidroxi-2-isobutilmalato (militarina) (W9)



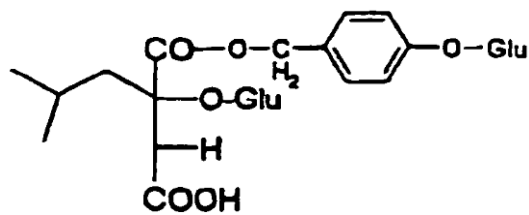
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-hidroxi-2-(butan-2-il)-malato (W10)



5 Éster metílico del 1-(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-hidroxi-2-isopropil-malato (W11)

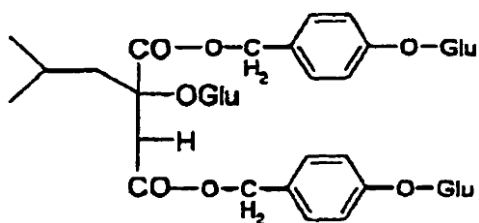


1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isopropil-malato (W12)



10

1-β-D-glucopiranosiloxibencil-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutilmalato (W13)



1,4-bis(β -D-glucopiranosiloxibencil)-Z- β -D-glucopiranosil-2-isopropil-malato (W14)

5 Ensayado en el modelo animal para el deterioro de la adquisición del aprendizaje producido por la escopolamina, a muy baja dosificación, el tratamiento con el extracto y los compuestos de la presente invención es capaz de prolongar significativamente la latencia hasta iniciar el descenso de escalones y disminuir el número de errores en la sesión de prueba. Estos resultados indican que el extracto y los compuestos de la presente invención pueden mejorar eficazmente el deterioro de la adquisición del aprendizaje inducido por escopolamina en ratones.

10 La inyección ICV de A β (1-42) afectó al aprendizaje y a la función de la memoria. El tratamiento de ratones y ratas con el extracto y los compuestos de la presente invención bloqueó significativamente el deterioro inducido por A β (1-42) en el comportamiento de evitación pasiva, también mejoró significativamente la disminución inducida por A β (1-42) en la memoria espacial de trabajo. Estos hallazgos sugieren que el extracto y los compuestos de la presente invención pueden tener efecto preventivo frente al deterioro de la memoria relacionado con el A β de la enfermedad de Alzheimer.

15 Es bien conocido que la hipoperfusión cerebral crónica inducida por la oclusión permanente de las arterias carótidas comunes bilaterales en animales está asociada con alteraciones en el comportamiento e histopatológicas. La hipoperfusión cerebral en ratones y ratas produjo déficits de aprendizaje y memoria. El tratamiento a largo plazo con el extracto y los compuestos de la presente invención alivió significativamente estos cambios en el comportamiento (ensayo de descenso de escalones y ensayo del laberinto de agua). Los datos de los inventores sugieren el papel beneficioso del extracto y de los compuestos de la presente invención en los estados de insuficiencia cerebro vascular y demencia.

20 Ensayado sobre el modelo de demencia en ratones inducido por cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas), el extracto y los compuestos de la presente invención invirtieron significativamente la reducción inducida por cicloheximida de la latencia hasta iniciar el descenso de escalones, y disminuyó el número de errores en la sesión de prueba. El resultado indica que el extracto y los compuestos de la presente invención pueden mejorar el deterioro de la evitación pasiva inducida por cicloheximida y el aumento del comportamiento del aprendizaje y la memoria de los ratones.

25 Para investigar la influencia del extracto de la presente invención sobre la memoria en ratones normales, los inventores han encontrado que el tratamiento con el extracto de la presente invención acortó la latencia de escape de los ratones en el ensayo del laberinto del agua, y disminuyó significativamente el número de errores. El resultado indica que el extracto de la presente invención puede potenciar la capacidad de aprendizaje y la memoria en ratones normales.

30 En el experimento de detección de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) in vivo, los inventores han encontrado que una única dosis o dosis múltiples del extracto y los compuestos de la presente invención a ratones y ratas no tiene inhibición sobre la actividad de la AChE en el cerebro animal. Esto indica que la mejora del mecanismo del extracto y los compuestos de la presente invención sobre la función cognitiva en animales no está mediada por la ruta de anticolinesterasa.

35 El resultado de un estudio de toxicidad aguda en ratones mostró que no se observaron diferencias significativas en el comportamiento de los ratones, y no hubo muerte de animales y el peso corporal de los ratones aumentó como el de ratones normales después de administrarse por vía oral una única dosis de 5 g/kg del extracto o de los compuestos de la presente invención. Esto sugiere que el extracto o los compuestos de la presente invención tienen una toxicidad aguda muy baja en ratones.

40 Los estudios farmacológicos demostraron que el extracto o los compuestos de la presente invención tienen efectos sobre el tratamiento de la demencia, particularmente la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, así como en el deterioro leve de la cognición en la etapa inicial de la demencia, el deterioro de las facultades mentales y la amnesia, etc. Además, el extracto y los compuestos de la presente invención tienen una toxicidad muy baja, una elevada seguridad y una falta de inhibición sobre la actividad de la AChE en el cerebro animal.

45 La presente invención está relacionada también con una composición farmacéutica preparada mezclando cualquiera del extracto y los compuestos de la presente invención utilizados como principio activo y excipientes y/o aditivos del fármaco utilizados comúnmente. Normalmente, una composición farmacéutica contiene de 0,1 a 95 % en peso del extracto o los compuestos de la presente invención.

50 La composición farmacéutica utilizada en el presente documento se puede preparar de acuerdo con el procedimiento bien conocido en la técnica. A este fin, si es necesario, cualquiera del extracto y los compuestos de la presente invención se pueden mezclar con los excipientes y/o aditivos del fármaco utilizados comúnmente en la forma de sólido o líquido. La composición puede formularse en la forma para la administración de uso humano o veterinario.

55 El extracto o los compuestos de la presente invención o una de sus composiciones farmacéuticas pueden formularse

en forma de dosificación unitaria. Los compuestos se pueden administrar mediante una variedad de rutas que incluyen la ruta oral, rectal, transdérmica, peritoneal, subcutánea, intravenosa, intramuscular, oral mucosal e intranasal. Se prefiere que se administre por ruta oral.

- 5 El extracto o los compuestos de la presente invención o una de sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante inyección, tal como inyectando por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intracutánea.

10 La dosificación puede ser en forma líquida o forma sólida. En cuanto a la forma líquida, esta puede ser una solución verdadera, un coloide, una micropartícula, una emulsión y una suspensión. Las otras formas de dosificación pueden ser comprimidos, cápsulas, gotas, píldoras, aerosoles, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, partículas, supositorios, y polvo criodesecado para inyección. El extracto o composiciones de la presente invención se pueden formular en una formulación común, formulación de liberación continua, formulación de liberación controlada, formulación diana o diversos sistemas de micropartículas.

15 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se pueden emplear diversos vehículos bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de vehículos adecuados incluyen: diluyentes y absorbentes, tales como almidones, dextrina, sulfato de calcio, lactosa, manitol, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina, silicato de aluminio; agentes humectantes y aglutinantes, tales como agua, glicerol, polietilenglicol, etanol, propanol, pasta de almidón, dextrina, jarabe, miel de abeja, solución de glucosa, 20 pasta de goma acacia, pasta de gelatina, carboximetilcelulosa de sodio, laca, metilcelulosa, fosfato de sodio y polivinilpirrolidona; agentes desintegrantes, tales como almidón de maíz, alginatos, agarosa, laminarano, bicarbonato de sodio, ácido cítrico, carbonato de calcio, éster de ácido graso de polietilensorbitán, dodecil sulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa; inhibidores de la desintegración, tales como sacarosa, triestearina, manteca de cacao, aceite hidrogenado, agentes absorbentes, tales como sal de amonio cuaternario, lauril sulfato de sodio; agentes 25 lubricantes, tales como talco, sílice, almidón de maíz, sal de estearato, ácido bórico, vaselina líquida, polietilenglicol. Los comprimidos de la presente invención se pueden revestir, tal como con un revestimiento de azúcar, revestimiento de película, revestimiento entérico, o revestido por dos capas o múltiples capas.

30 Para preparar píldoras, se pueden utilizar diversos vehículos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichos vehículos son diluyentes y absorbentes, tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, polivinilpirrolidona, gelucire, caolín, talco; aglutinantes, tales como goma acacia, goma tragacanto, gelatina, etanol, miel de abeja, azúcar líquido, pasta de arroz o pasta de harina; agentes desintegrantes, tales como polvo de agarosa, almidón seco, alginatos, dodecil sulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa.

35 Para preparar cápsulas, el extracto o el compuesto de la presente invención se mezcla con los diversos vehículos mencionados anteriormente, y se introduce la mezcla resultante en una cápsula de gelatina dura o blanda. También, el compuesto de la presente invención se puede preparar en microcápsulas, suspenderse en el medio acuoso tal como una suspensión, encapsularse en cápsulas duras o preparar se en inyecciones.

40 Por ejemplo, el extracto o el compuesto de la presente invención se pueden preparar en formulaciones inyectables, tales como una solución, suspensión, emulsión y polvo criodesecado. Dicha formulación puede ser acuosa o no acuosa, y puede contener uno o más de un vehículo, diluyente, aglutinante, lubricante, conservante, tensioactivo o dispersante. El diluyente se puede seleccionar entre agua, etanol, polietilenglicol, 1,3-propanol, alcohol estearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxidado, éster de ácido graso de polioxiethylensorbitán, etc.

45 Además, a fin de preparar inyecciones isotónicas, se puede añadir a las formulaciones inyectables una cantidad adecuada de NaCl, glucosa o glicerol. También se pueden añadir de forma rutinaria un cosolvente, tampón, agente de ajuste del pH y similares. Estos aditivos se usan frecuentemente en este campo.

50 Es evidente para un experto en la técnica que la dosis terapéuticamente eficaz de los compuestos activos de la presente invención o de una de sus composiciones farmacéuticas dependerá de diversos factores, tales como las características y la gravedad de las enfermedades que se van a tratar, el género, la edad, el peso, las respuestas características e individuales de los pacientes o animales, la ruta y el número de administraciones, y los objetivos del tratamiento. Por tanto, la dosis terapéutica de acuerdo con la invención puede variar mucho. En general, los 55 expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones que se van a administrar. Una dosis terapéuticamente eficaz para uso del presente extracto o de los compuestos de la presente invención comprende un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0,001 a aproximadamente 150 mg/kg/día, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg/día, en particular, entre aproximadamente 0,01 a aproximadamente 60 mg/kg/día, de forma más particular, entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 60 mg/kg/día de principio activo. La dosificación diaria total se puede administrar de una vez o en dosis divididas en dos, o cuatro veces al día. Deberá entenderse, sin embargo, que la cantidad del compuesto realmente administrada la determinará un médico de acuerdo con su experiencia clínica y otras terapias utilizadas simultáneamente.

65 Cada dosificación total del remedio se puede administrar de una vez o dividida en algunas tomas. El extracto, los compuestos y la composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar de forma única o combinarse con otros fármacos terapéuticos con la dosificación ajustada.

Los compuestos de la presente invención existen en los siguientes 6 géneros de la familia de las orquidáceas, *Coeloglossum*, *Galeola*, *Gastrodia*, *Loroglossum*, *Orchis*, *Vanda*. (Véase la tabla).

Compuestos incluidos en esta invención procedentes de plantas orquidáceas

Nº	Compuestos	Fórmula molecular	Peso molecular	Fuente vegetal*
1	W1	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	474	a
2	W2	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	474	a
3	W3	C ₂₁ H ₄₀ O ₁₇	636	a
4	W4	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₇	636	a
5	W7	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	742	a, f, g, h
6	W6	C ₄₀ H ₅₆ O ₂₃	904	a, f
7	W13	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₀	620	a, f
8	W11	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	458	c
9	W12	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₇	712	b, c
10	W10	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	726	b
11	W9	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	726	f, g
12	W14	C ₄₀ H ₅₆ O ₂₅	888	f

* a: *Coeloglossum viride* ; b: *Galeola faberi* ; c: *Galeola septentrionalis* ; d: *Gastrodia elata* ; e: *Loroglossum hircinum* ; f: *Orchis latifolia* ; g: *Orchis militaris* ; h: *Orchis papilionacea* ;

5

Ilustración de las figuras

Fig. 1: Diagrama de flujo de la extracción y el aislamiento de Wangla

Fig. 2: El tiempo necesario para que los ratones lleguen diariamente hasta la región diana

10 Fig. 3: Errores de tiempo diarios de los ratones

Ejemplos

15 Se utilizan los siguientes ejemplos para ilustrar la presente invención, pero no significan ninguna limitación de la invención

CE: Una fracción eficaz extraída de Wangla

20 W6, W7, W8, W9 : compuestos eficaces aislados de CE

Preparación del ejemplo de preparación del extracto y el compuesto de la invención

25 Rizomas molidos y se secaron al aire de *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter (5 kg) se extrajeron con ocho volúmenes de EtOH al 95 % con calentamiento por tres veces, se filtraron, y los filtrados se combinaron, a continuación se eliminó el solvente a presión reducida para dar un residuo (220 g). El residuo se suspendió en agua y a continuación se repartió en EtOAc. La fase acuosa se sometió a cromatografía en columna sobre una resina macroporosa, eluyendo sucesivamente con H₂O, y EtOH al 20 %, 40 % y 80 % en H₂O. La solución eluida con EtOH al 20% y al 40 % se concentró para dar un residuo (29 g) que se cromatografió sobre gel de sílice RP-18 en fase inversa, eluyendo con un gradiente creciente en MeOH en H₂O (0-60 %), para dar algunas fracciones según el análisis de TLC. Estas fracciones se purificaron adicionalmente mediante técnicas de recristalización, cromatografía en gel de sílice, Sephadex LH 20, y HPLC preparativa en fase inversa para dar como resultado los compuestos W1 (70 mg), W2 (95 mg), W3 (85 mg), W4 (173 mg), W5 (65 mg), W6 (4,2 g), W7 (4,8g), W8 (3,4 g), y W9 (1,2 g). Véase en la Figura 1 el diagrama del procedimiento de aislamiento.

35 Experimentos de farmacología:

Ejemplo 1: Efectos de CE y los compuestos W6, W7, W8, W9 sobre el deterioro del comportamiento de la tarea de evitación pasiva producido por escopolamina

40 Objetivo del estudio:

Escopolamina, un antagonista muscarínico del receptor colinérgico, ha demostrado afectar la retención de la memoria cuando se proporciona a ratones poco tiempo antes del entrenamiento en la tarea de la evitación pasiva, la prueba de amnesia inducida por escopolamina se ha utilizado ampliamente como prueba de selección principal de los denominados fármacos contra el Alzheimer. El presente estudio se diseñó para investigar si CE y W6-W9 podrían modular el deterioro de la memoria inducido por escopolamina, utilizando las tareas de evitación pasiva hasta iniciar el descenso de escalones en ratones.

Procedimiento:

Se utilizaron ratones ICR machos de 24-28 g. Los ratones se enjaularon durante 2 días de periodo de habituación antes del experimento. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupo (n=20)

5 Se administró a los ratones mediante sonda nasogástrica solución salina fisiológica, o fármacos a diferentes dosis, respectivamente en el control negativo, el grupo de escopolamina, y los grupos de fármacos del ensayo. Dos veces diarias durante 2 días.

10 En el D3, 30 min después de la administración de los fármacos del ensayo, se administró escopolamina (1 mg/kg i.p.), excepto para el grupo del control.

15 30 min después, se colocó cada ratón individualmente sobre la plataforma de seguridad en la caja del equipo del ensayo de descenso de escalones. Cuando los ratones bajaron los escalones y tocaron el piso cuadrículado, se les administró un choque eléctrico con una tensión de 36 V, y saltaron hacia atrás sobre la plataforma de caucho. Se adiestró a cada animal durante 5 min y se devolvió a la jaula de alojamiento

20 24 horas después de la prueba de aprendizaje, el animal se colocó de nuevo sobre la plataforma y se registraron la latencia hasta iniciar el descenso de escalones y el número de acontecimientos de descenso de escalones (número de errores) durante 5 min. En la tabla 1 se muestran los resultados.

Resultado:

25 El ensayo de descenso de escalones muestra que el tiempo de latencia se redujo significativamente en el grupo de la escopolamina con respecto al grupo del control, y el número de errores durante los 5 min aumentó marcadamente. Esto demuestra que la escopolamina, en la dosificación de 1 mg/kg, puede afectar la capacidad de aprendizaje y de la memoria en el animal. El tratamiento con CE, W6, W7, W8 o W9 inhibió la reducción de la latencia hasta iniciar el descenso de escalones y disminuyó el número de errores durante la sesión de la prueba, atenuando el deterioro inducido por la escopolamina de los comportamientos de evitación pasiva. Los datos
30 indicaron que todos de CE, W6, W7, W8 y W9 pueden mejorar el deterioro de la evitación pasiva inducida por escopolamina.

35 Tabla 1. Efectos de CE y W6-W9 sobre el deterioro de la tarea de evitación pasiva producido por la escopolamina en ratones (ensayo de descenso de escalones).

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)	Número de errores
Control		266±20	0,2±0,1
Escopolamina		147±32#	1,7±0,4###
CE	2,5	218±19*	0,2±0,1**
	5	245±22*	0,4±0,2*
	10	280±27**	0,6±0,2*
W6	0,03	283±38**	0,2±0,1**
	0,3	259±34*	0,4±0,2*
	3	258±17*	0,3±0,1**
W7	0,25	205±142	0,4±0,7*
	1	237±125*	0,2±0,4**
W8	0,25	197±144	0,7±0,9
	1	218±127*	0,3±0,5*
W9	0,25	140±129	0,8±0,7
	1	210±134*	0,4±0,5*

55 Los datos representan el promedio ± S.E.M, n=20 de cada grupo. #. P < 0,05, ###. P < 0,01 frente al control; *. P < 0,05, **. P < 0,01 frente a únicamente el grupo de la escopolamina.

60 **Ejemplo 2:** Efectos de CE y W6 sobre el deterioro del comportamiento de la tarea de evitación pasiva producido cicloheximida (CHX)

Objetivo del estudio:

65 Cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas. Puede afectar al comportamiento de los animales experimentales en una amplia variedad de tareas de aprendizaje y de la memoria, que incluyen la evitación pasiva. En este experimento, se investigó el efecto de W6 y CE sobre el déficit de memoria inducido por cicloheximida.

Procedimiento:

La distribución aleatoria y la administración de fármacos son como antes. Se administró cicloheximida a los ratones (120 mg/kg i.p.), excepto al grupo del control. 30 min después se colocó cada ratón individualmente sobre la plataforma del equipo del ensayo de descenso de escalones, y se adiestró durante 5 min. La prueba de retención comenzó 24 horas después, se registraron la latencia hasta iniciar el descenso de escalones y el número de acontecimiento de descenso de escalones (número de errores) durante 5 min.

Resultados:

Cicloheximida (120 mg/kg, i.p.) afectó significativamente la adquisición de aprendizaje cuando se proporcionó antes del ensayo de adiestramiento. CE y W6 invirtieron significativamente la reducción de la latencia hasta iniciar el descenso de escalones inducida por cicloheximida y disminuyeron el número de errores. El resultado indica que CE y W6 pueden mejorar los deterioros de la evitación pasiva inducidos por cicloheximida, y aumentar el comportamiento de aprendizaje y la memoria de los ratones. En la tabla 2 se muestran los resultados.

Tabla 2. Efecto de CE y W6 sobre el deterioro de los comportamientos de evitación pasiva inducidos por cicloheximida en ratones (ensayo de descenso de escalones)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)	Mejora (%)	Nº de errores
Control		255±16		0,2±0,1
Cicloheximida		174±20###		1,0±0,2###
CE	2,5	183±31	11	0,7±0,2
	5	217±20	53	0,5±0,1**
	10	231±33	70	0,4±0,1*
Control		276±17		0,1±0,3
cicloheximida		124±30###		1,6±1,9##
W6	1,25	211±31	57	0,6±1,2
	2,5	223±24*	65	0,7±0,9*
	5	182±33	38	0,4±0,5**
	10	216±29*	61	0,3±0,5**

Los datos representan el promedio ± SEM, n=20 de cada grupo. ##: P < 0,01, ###: P < 0,001 frente al control; *: P < 0,05, **: P < 0,01

Ejemplo 3: Efectos de CE y W6 sobre el deterioro del comportamiento de aprendizaje y de la memoria producido por Aβ en ratones

Objetivo del estudio:

Se cree que el péptido beta-amiloide (A beta), un péptido de 39 – 43 aminoácidos, induce el estrés oxidativo y la inflamación en el cerebro, que se postulan que tienen importantes papeles en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Una amplia evidencia experimental indica que la inyección o infusión intracerebral de péptidos beta-amiloides (Aβ) a roedores induce los deterioros del aprendizaje y la memoria así como la neurodegeneración en las áreas cerebrales relacionadas con la función cognitiva. En el presente estudio, los inventores evaluaron los efectos de la administración oral a largo plazo de CE y W6 en una única inyección intracerebroventricular (i.c.v.) en ratones y la inyección en ratas de péptido 1-42 beta-amiloide agregado (Aβ (1-42) indujo el deterioro de la memoria

Procedimiento:

Se administró Aβ (1-42) (10 µg/ratón) mediante inyección ICV. Se proporcionó al grupo simulado el mismo volumen de solución de Ringer. Una semana después los ratones con inyección de Aβ (1-42) se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, y se les administró solución salina, CE (5 mg/kg) o W6 (1 mg/kg) por vía oral, respectivamente. Dos semanas después, se llevaron a cabo el ensayo de descenso de escalones y el ensayo del laberinto del agua para evaluar la capacidad del aprendizaje y la memoria de los ratones.

Ensayo del laberinto de agua: se colocó cada ratón en primer lugar sobre las escaleras, a continuación se soltó en el agua desde la posición 1 y se les dejó durante 120 segundos encontrar las escaleras. El ratón realizó 2 intentos por día durante 3 días. La localización inicial varió desde la posición 1 a la posición 2 y a la posición 3 durante los siguientes 2 días. La distancia y el callejón sin salida aumentaron cada día. En el D4, se introdujo al ratón en agua desde la posición 3, se midieron el tiempo de escape desde el agua hasta las escaleras y el número de veces que se introdujo en los callejones sin salida (número de errores). Se utilizó este procedimiento para evaluar el comportamiento espacial y el comportamiento de aprendizaje y la memoria del animal.

Se repitió este experimento para CE con ratas Wistar machos. El protocolo es casi el mismo, excepto que se inyectó Aβ (1-42) (10 µg/cada lado) en el hipocampo. Se llevó a cabo el ensayo de descenso de escalones para evaluar la capacidad de aprendizaje y la memoria de las ratas.

5 Resultados:

La inyección ICV o intra-hipocampo de los ratones del control con Aβ (1-42) afectó al comportamiento del ensayo de evitación pasiva (disminuyó significativamente la latencia hasta iniciar el descenso de escalones), y el ensayo del laberinto de agua (prolongó significativamente la latencia para escapar del agua y aumentó el número de errores).

10 El tratamiento de ratones o ratas con CE y W6 durante 2 semanas bloqueó significativamente el deterioro inducido por Aβ (1-42) en el comportamiento de evitación pasiva, mejoró también significativamente la disminución de la memoria espacial de trabajo inducida por Aβ (1-42). Estos hallazgos sugieren que CE y W6 pueden tener efectos preventivos frente al deterioro de la memoria relacionado con el Aβ de la enfermedad de Alzheimer.

15 Tabla 3. Efectos de CE y W6 sobre el deterioro en el comportamiento de evitación pasiva inducido por Aβ (1-42) en ratones (ensayo de descenso de escalones).

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)	Número de errores
Simulado		156±35	1,3±0,3
Únicamente Aβ		30±14###	1,6±0,2
Aβ + CE	5	118±34*	1,4±0,3
Aβ + W6	1	110±37*	0,9±0,2

25

Tabla 4. Efectos de CE y W6 sobre el deterioro del aprendizaje y la memoria inducido por Aβ (1-42) en ratones. (ensayo del laberinto de agua)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia de escape (s)	Número de errores
Simulado		34±8	4,3±1,1
Únicamente Aβ		62±10#	6,4±1,1#
Aβ + CE	5	36±10*	3,1±1,4*
Aβ + W6	1	46±11	3,1±0,8*

30

35

40

Tabla 5. Efecto de CE sobre el deterioro en el comportamiento de evitación pasiva inducido por Aβ (1-42) en ratas. (ensayo de descenso de escalones)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)	Número de errores
Simulado		241±39	0,2±0,1
Únicamente Aβ		107±34#	1,3±0,3#
Aβ + CE	1,25	188±69*	0,4±0,2
	5,0	237±42*	0,2±0,1*

45

50

Los datos representan el promedio ± SEM, n=12-15. #: P < 0.05, ### P< 0.01 frente a grupo simulado. *: P <0.05, frente a grupo únicamente con Aβ

55

Ejemplo 4: Efectos de CE y W6 sobre el deterioro de la memoria inducido por el modelo de demencia vascular

Objetivo del estudio:

60 Es bien conocido que la hipoperfusión cerebral crónica inducida por la oclusión permanente de las arterias carótidas comunes bilaterales en animales se asocia con alteraciones histopatológicas y del comportamiento. En este estudio, los inventores investigaron los efectos de CE y W6 sobre el deterioro del comportamiento de aprendizaje y la memoria producido por la oclusión permanente de las arterias carótidas en ratones y ratas.

65 Procedimiento:

Con cirugía, bajo anestesia con pentobarbital (40 mg/kg i.p.), las arterias comunes de los ratones se expusieron y

ocluyeron con sutura permanente y se suturó la piel que las rodeaba. Los controles con operación simulada se sometieron a exposición de carótidas expuestas, pero no a oclusión. Después de 1 semana, los ratones supervivientes con las carótidas ocluidas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, en 2 grupos, se repitió la administración con CE (5 mg/kg, po) o W6 (1 mg/kg, po) diariamente. Cuatro semanas después de la cirugía, se adiestraron los ratones y se llevó a cabo el ensayo en un equipo de laberinto de agua y de descenso de escalones.

Se repitió este experimento para CE con ratas SD macho. El protocolo es casi el mismo, excepto que se utilizó el ensayo del laberinto de agua de Morris para las ratas.

Piracetam es el fármaco nootrópico mejor conocido. Su mecanismo de acción es desconocido, pero la mayoría lo describiría como un refuerzo de la inteligencia y un estimulante del SNC (sistema nervioso central) y es remarcablemente eficaz en la contrarrestación de la hipoxia cerebral. Por tanto, se utilizó Piracetam como fármaco de referencia en este estudio.

Ensayo del laberinto de agua de Morris: Se llevaron a cabo los ensayos con animales en un laberinto de agua (Morris y col., 1982). Después de un ensayo de habituación de 1 min en el primer día, se llevaron los ensayos en animales en los siguientes tres días para determinar su capacidad para escapar de la piscina buscando una plataforma de plexiglás de 6 cm montada 1,5 cm por debajo del nivel del agua. Cada rata se sometió a 4 ensayos de escape cada día, con las localizaciones iniciales en dos posiciones fijas. Inmediatamente después del ensayo de escape final, se llevó a cabo el ensayo del sesgo espacial durante un ensayo de prueba que duraba 2 minutos, durante el cual se retiró la plataforma y se registraron el número de animales que cruzaban de la posición de la plataforma original y el tiempo empleado en el cuadrante localizado en la plataforma original en un lapso de tiempo de 2 minutos, como un índice del aprendizaje espacial y la memoria.

Resultados:

Cuatro semanas de hipoperfusión cerebral en ratones y ratas produjeron déficits de comportamiento y de memoria (ensayo de descenso de escalones y ensayo del laberinto de agua). El tratamiento a largo plazo con CE y W6 alivió significativamente estos cambios en el comportamiento. Los datos de los inventores sugieren el papel beneficioso de CE y W6 en estados de insuficiencia cerebro vascular y demencia

Tabla 6: Efectos de CE y W6 sobre el deterioro del comportamiento de aprendizaje y la memoria producido por la oclusión permanente de 2 arterias carótidas en ratones (ensayo de descenso de escalones)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)	Número de errores
Simulado		256±40	0,3±0,2
Únicamente 2-VO		125±38#	0,9±0,2#
2-VO + CE	5	245±30*	0,2±0,2*
2-VO + W6	1	253±31*	0,2±0,1*

Tabla 7. Efectos de CE y W6 sobre el deterioro del comportamiento de aprendizaje y la memoria producido por la oclusión permanente de 2 arterias carótidas en ratones (ensayo del laberinto de agua)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia de escape (s)	Número de errores
Simulado		25±14	4,0±0,3
Únicamente 2-VO		51±24##	7,5±0,7#
2-VO + CE	5	22±11***	4,3±0,5*
2-VO + W6	1	33±19*	5,4±1,4

Se expresaron los datos como promedio ± SEM, n=10-15. #:P < 0,05, ##:P < 0,01 frente a grupo simulado. *:P < 0,05, **:P < 0,01, ***:P < 0,001 frente a grupo únicamente con 2-VO

Ejemplo 5. Efecto de CE sobre el comportamiento de aprendizaje y la memoria en ratones normales

Objetivo del estudio:

Este experimento es para observar si CE podría potenciar la capacidad de aprendizaje y la memoria en ratones normales jóvenes.

Procedimiento:

Se utilizaron ratones ICR machos (24-28 g). Se administró a los ratones de forma repetida CR (1,25 y 5 mg/kg)

durante 3 días. A continuación, se llevó a cabo para cada ratón el ensayo de aprendizaje de 3 días en el laberinto de agua. Desde el D4 al D6 los ratones se liberaron en agua desde el punto inicial y se registraron la latencia de escape y el número de veces que se introdujeron en los callejones sin salida.

5 Resultado:

En comparación con ratones normales, el tratamiento con CE acortó la latencia de escape de los ratones en el ensayo del laberinto de agua, y el número de veces que los ratones se introdujeron en los callejones sin salida disminuyó significativamente. El resultado indica que CE puede potenciar la capacidad de aprendizaje y la memoria en ratones jóvenes normales (véanse la Fig. 2 y la Fig. 3).

Ejemplo 6: estudio de toxicidad aguda de CE y W6 en ratones:

Se utilizaron ratones KM en este experimento. Se incluyeron 10 ratones machos y 10 ratones hembras en cada grupo. Se proporcionaron CE (5 g/kg) o W6-W9 (0,5 g/kg) por vía oral o por vía i.p.- Se observó a los animales cuidadosamente y se vigiló su peso corporal cada 3 días en un lapso de tiempo de 2 semanas.

Conclusión:

Tras administrarse por vía oral una única dosis de CE a 5 g/kg, no hubo muertes de animales y el peso corporal de los animales aumentó con respecto a los ratones normales.

El resultado es el mismo con W6, W7, W8 o W9 a 0,5 g/kg (i.p. o p.o.).

Estos resultados sugieren que CE y W6-W9 tuvieron poca o incluso ninguna toxicidad aguda en ratones.

Ejemplo 7: Efecto de CE y W6 *in vivo* sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)

Objetivo del estudio:

Se acepta generalmente que el papel fisiológico de la AChE es la hidrólisis e inactivación rápidas de Ach. Los inhibidores de AChE pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la demencia por Alzheimer. El objetivo de este ensayo es determinar la influencia de CE y W6 sobre la actividad de AChE.

Procedimiento

Se dividieron aleatoriamente ratas Wistar en 5 grupos (n=6): control normal, HupA (1 mg/kg), CE (5 mg/kg), W6 (5 mg/kg), y W6 (20 mg/kg). Se hizo ayunar a las ratas durante la noche y se les proporcionó una única dosis de fármacos. 1 hora después, se decapitaron las ratas, y se retiraron rápidamente los prosencéfalos en un baño de hielo, se pesaron y homogeneizaron en solución salina al 0,9 % utilizando un homogeneizador ultrasónico para obtener un homogenizado cerebral al 10 %. Se centrifugó el homogenado (6000 rpm) durante 20 minutos a baja temperatura, y se retuvo el sobrenadante. A continuación se midió la actividad de la AChE con un kit de ensayo.

Resultado:

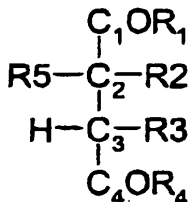
Los datos muestran que una única dosis de CE o W6 a las ratas no producen inhibición sobre la actividad de AChE. Esto indica que la mejora de CE y W6 sobre la función cognitiva en el animal no está mediada por la ruta de la anticolinesterasa.

Tabla 8: Efectos de CE y W6 sobre la actividad de la AChE *in vivo*

grupo	Actividad de la AChE	Inhibición (%)
control	0,72 ± 0,18	--
Hup A (1 mg/kg)	0,48 ± 0,10*	34
CE (5 mg/kg)	0,77 ± 0,20	0
W6 (5 mg/kg)	0,80 ± 0,16	0
W6 (20 mg/kg)	0,72 ± 0,16	0

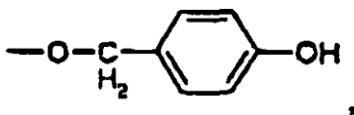
REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados de ésteres de succinato de fórmula general (I), y de sus estereoisómeros y sales farmacéuticas, en la fabricación de un medicamento para evitar o tratar la demencia:

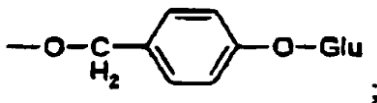


(I)

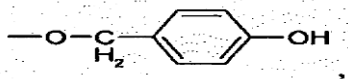
5 en la que
 R₁ y R₄ se seleccionan entre -OCH₃, -OH, -O-Glu,



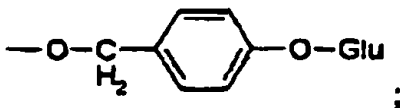
y



10 R₂ y R₃ se seleccionan entre H, OH, -O-Glu,

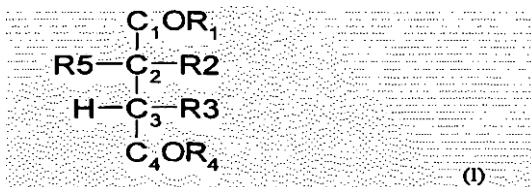


y



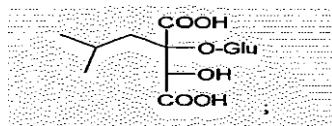
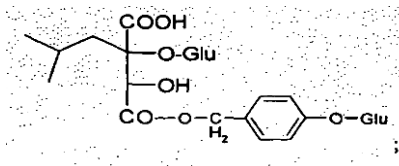
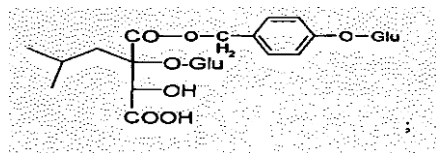
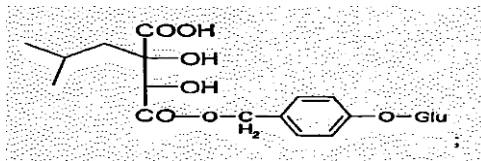
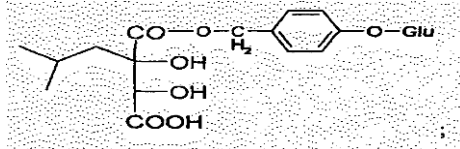
15 R₅ se selecciona entre alquilos C₁₋₆ ramificados o no ramificados;
 y las configuraciones de los centros quirales en C-2 y C-3 son 2R3S, 2R3R, 2S3S y 2S3R respectivamente.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho compuesto de fórmula (I) es:

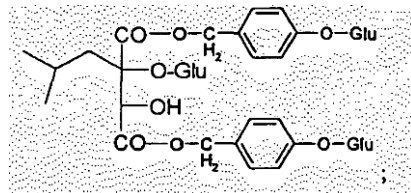


en la que R₅ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo; y R₁, R₂, R₃, y R₄ son iguales que en la reivindicación 1.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación **caracterizado por que** dichos compuestos incluyen

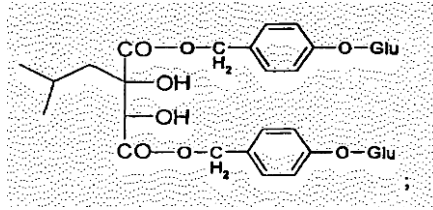


5

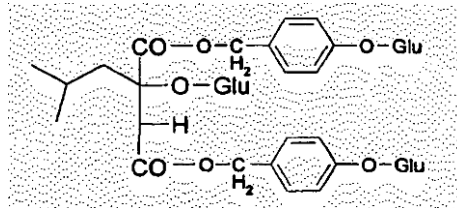


10

5



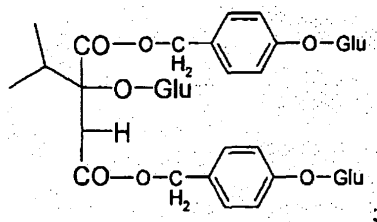
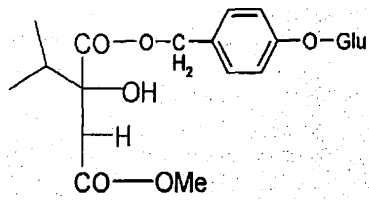
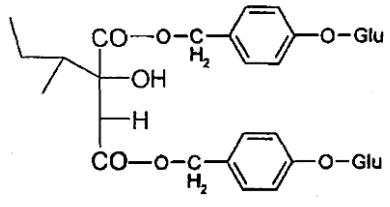
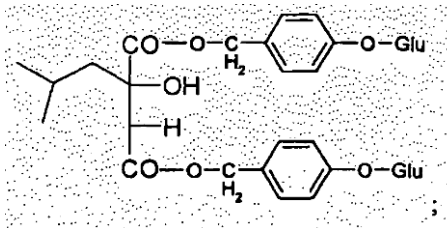
10

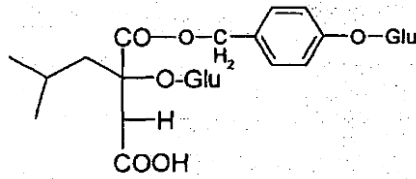


15

20

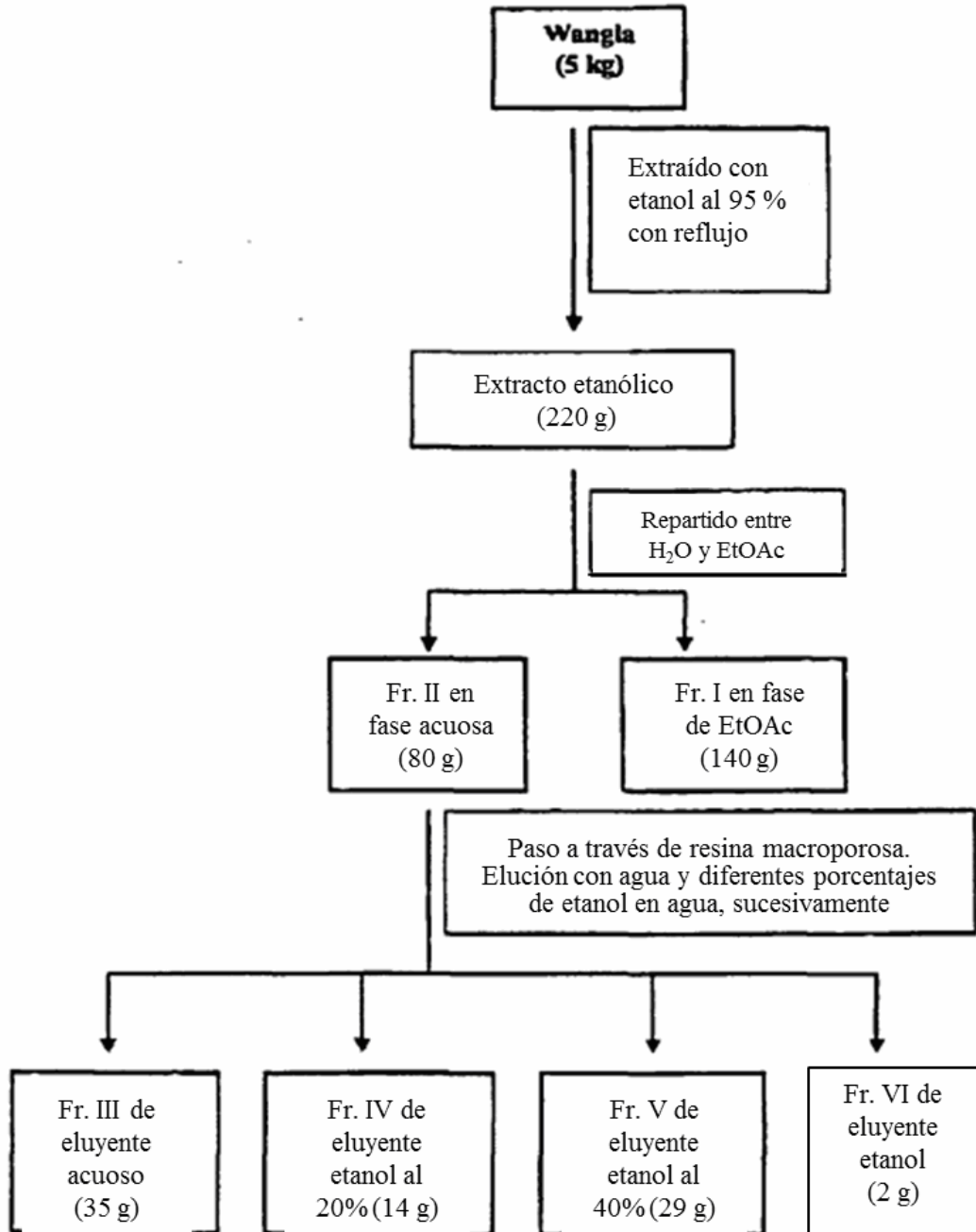
1,4-bis(β-D-glucopiranosiloxibencil)-2-β-D-glucopiranosil-2-isobutilmalato (dactilorina A) (W8);

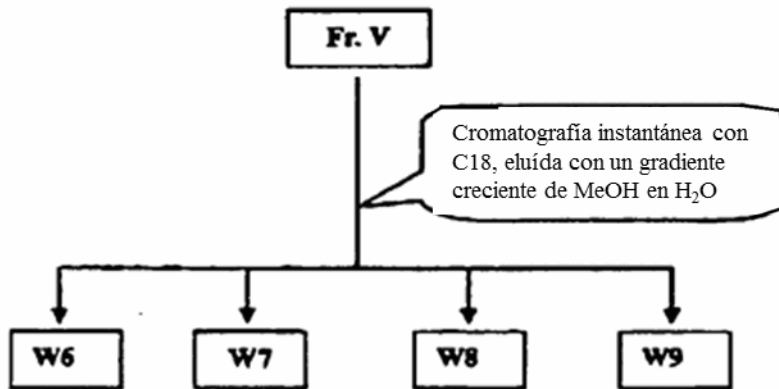
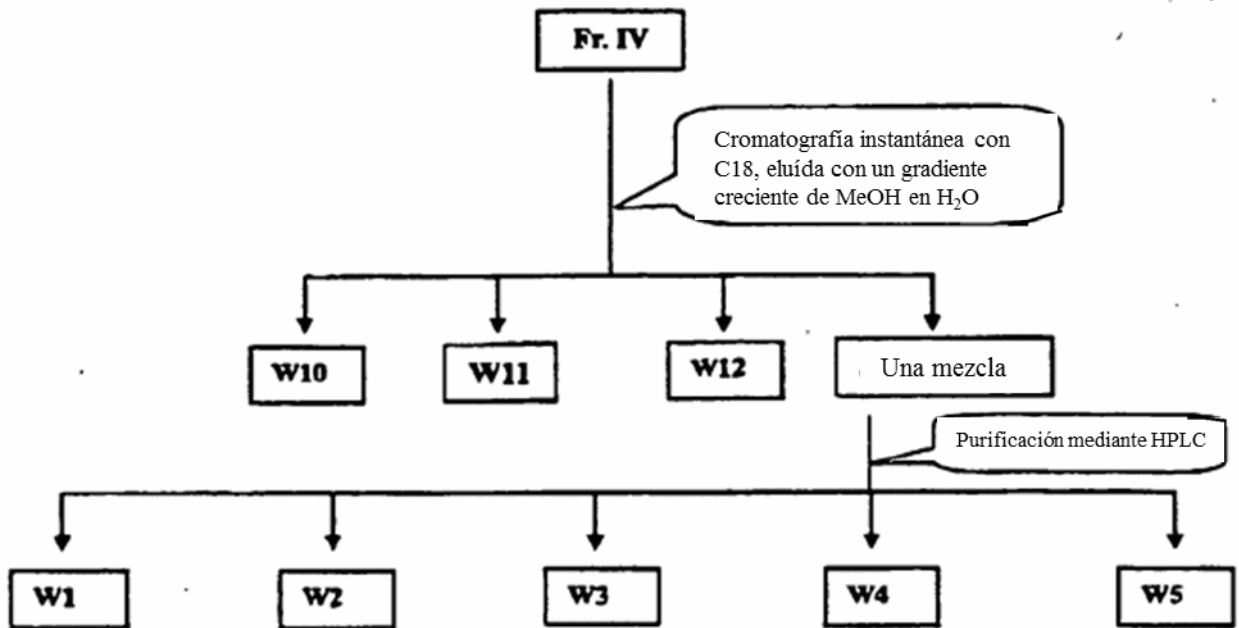




4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha demencia incluye la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, y obstáculos en el aprendizaje y la memoria.
5. Uso de extracto de *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Wild.) Richter en la fabricación de fármacos para evitar o tratar la demencia.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** dicha demencia incluye la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular y obstáculos en el aprendizaje y la memoria.

Figura 1. Diagrama de flujo de la extracción y aislamiento a partir de Wangla





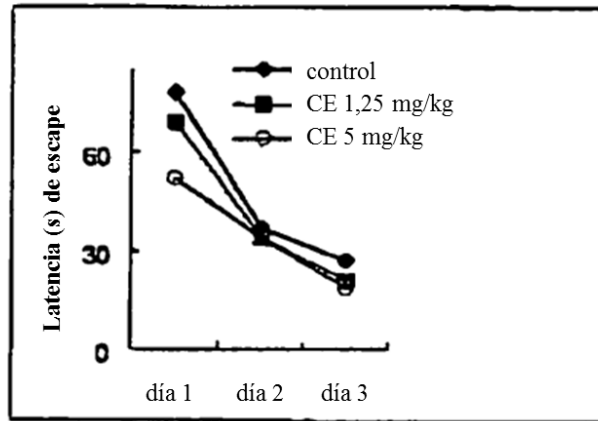


Fig. 2

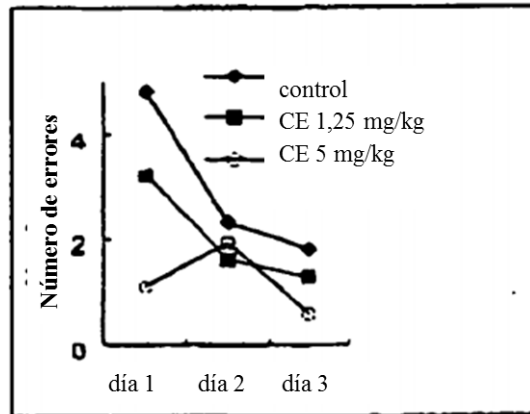


Fig. 3