



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 452 916

61 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01) A61P 1/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 29.11.2011 E 11009430 (7)
 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 12.02.2014 EP 2599488
- (54) Título: Vicenin 2 y derivados del mismo para utilizar como agente antiespasmódico y/o procinético
- (45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 03.04.2014

(73) Titular/es:

AMINO UP CHEMICAL CO., LTD. (100.0%) 363-32 Shin-ei Kiyota Sapporo 004-0839, JP

(72) Inventor/es:

BUCHWALD-WERNER, SYBILLE, DR. y FUJII, HAJIME

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

DESCRIPCIÓN

Vicenin 2 y derivados del mismo para utilizar como agente antiespasmódico y/o procinético

5 Campo técnico

10

15

50

55

60

[0001] La presente invención se refiere a un alimento, un suplemento dietético o una composición farmacéutica que comprenden vicenin 2 para utilizar en la obtención de efectos beneficiosos para el intestino. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende vicenin 2 como agente antiespasmódico y/o procinético para utilizar en i) prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), ii) tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), iii) reducir o equilibrar los trastornos digestivos, iv) reducir la hinchazón, v) mejorar la diarrea o vi) reducir la hipersensibilidad visceral y/o el dolor abdominal, y al uso de una composición comprende vicenin 2 para mantener un intestino sano, mantener una digestión normal, mejorar la regularidad del intestino, ayudar en la movilidad del intestino sano, el movimiento intestinal y/o una frecuencia de deposiciones, consistencia y/o forma de las deposiciones sanas y/o mejorar la función del intestino y/o inducir actividad antiespasmódica y/o procinética.

Antecedentes de la invención

- [0002] El mantenimiento de una salud digestiva óptima es particularmente importante para la vitalidad y el bienestar en todas las etapas de la vida. La eficacia del tracto digestivo de cada persona puede ser muy relevante en la energía diaria y la salud general. Casi todo el mundo sufre molestias gastrointestinales que afectan a la calidad de vida.
- [0003] Los síntomas pueden ser la hinchazón, la movilidad y el tránsito intestinal alterados, así como dolor abdominal. Muchas veces estos síntomas están combinados con un mal humor, falta de concentración y energía y pueden evitar consecuentemente que las personas duerman, trabajen, hagan ejercicio y se socialicen con amigos.
- [0004] Las molestias gastrointestinales se desencadenan principalmente por contracciones del íleon, que pueden estar causadas por varios factores. Por ejemplo, el estrés diario, la sensibilidad y alergias a la comida, infecciones, predisposición genética, flora intestinal alterada o desregulación de la interferencia de cerebro-intestino pueden conducir al desarrollo de trastornos gastrointestinales, dispepsia o irritaciones del tipo de síndrome del intestino irritable (IBS) o enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).
- [0005] La inducción del alivio digestivo incluye la regulación del tránsito a través del tracto gastrointestinal y el alivio del dolor asociado con la digestión, así como ayudar en la reducción de las causas que conducen a las molestias gastrointestinales.
- [0006] Los trastornos gastrointestinales se dividen en trastornos estructurales y funcionales. Las enfermedades estructurales, por ejemplo, hemorroides, tipos de colitis, tales como enfermedad de Crohn o C. ulcerosa, así como cáncer de colon, se pueden identificar por patólogos y, a veces, curar mediante tecnología médica. Los trastornos gastrointestinales funcionales no estructurales, tales como la dispepsia funcional (FD) o IBS, son menos susceptibles de tratamiento con explicación o tratamiento eficaz. Por un lado, los médicos buscan habitualmente una evidencia estructural a efectos de hacer diagnósticos y, por otro lado, los pacientes son reticentes a hablar claramente sobre su intestino y su mal funcionamiento. Esto conduce a la situación de que los trastornos gastrointestinales funcionales a menudo no se diagnostican ni se tratan correctamente. Ref: 2,5.
 - [0007] Estudios científicos más recientes relacionan el mente y el cuerpo como parte de un sistema en el que su desregulación puede producir malestar y enfermedad. En los primeros años de vida, la genética, además de factores medioambientales, tales como las influencias familiares en la expresión de la enfermedad, abuso, pérdidas principales o exposición a infecciones, puede afectar al desarrollo psicosocial en cuanto a la susceptibilidad de una persona al estrés de la vida o al estado psicológico y destrezas de afrontamiento, así como la susceptibilidad a la motilidad anormal-disfunción de los intestinos, la inmunidad de la mucosa alterada o la hipersensibilidad visceral. Además, estas variables de "cerebro-intestino" influyen de manera recíproca en su expresión. Por lo tanto, los trastornos gastrointestinales funcionales son un producto de esta interacción de factores psicosociales y la fisiología alterada de los intestinos a través del eje cerebro-intestino. Ref: 5.
 - [0008] El desarrollo actual de fármacos está dirigido a neuropéptidos y receptores presentes en el sistema entérico y el SNC para tratar los efectos mediados por el estrés de la modulación del SNC del intestino. Bajo desarrollo se encuentran fármacos que reconocen la serotonina, agonista de encefalinas y opioides, sustancia P, polipéptido relacionado con el gen de la calcitonina, coleocistoquinina, receptor de neuroquinina y antagonistas de la hormona liberadora de corticotrofina, etc.
- [0009] Se han aprobado nuevos fármacos para IBS-d que reconocen el neurotransmisor serotonina y sus receptores. Debido a los serios efectos secundarios, sólo se han aprobado con una limitación significativa sólo para mujeres e IBD severa, que no han respondido a la terapia convencional. Ref. 3,5.

[0010] Se estima que del 10 al 20% de la población mundial total está afectada de IBS. Se estima que entre todos los afectados con IBS, el 60% son mujeres y el 40% son hombres. También se cree que aproximadamente el 70% ente los afectados con IBS no buscan ayuda médica. El IBS es un problema común, pero la mayoría de las personas afectadas no es consciente del problema o tiende a evitarlo y no comentarlo con el médico.

[0011] De este modo, es importante desarrollar ingredientes para alimentos funcionales y suplementos dietéticos, además de desarrollar fármacos.

- [0012] La longitud completa del intestino está controlada por el sistema nervioso, el cual devuelve transporta y devuelve señales entre el intestino y el cerebro, controlando factores, tales como la rapidez con que los alimentos son empujados a través de los intestinos. El entendimiento de estos mecanismos neuroentéricos básicos y el eje cerebro-intestino demostró la necesidad de un agente que mejore las irritaciones gastrointestinales a nivel neurotrópico y musculotrópico.
 - **[0013]** A pesar de esfuerzos considerables por los investigadores académicos y la industria farmacéutica y alimenticia, el desarrollo de nuevos ingredientes para prevenir, reducir o tratar trastornos gastrointestinales funcionales o para reducir sus síntomas ha sido lenta y no conducía a innovaciones.
- 20 **[0014]** El objetivo de la presente invención era proporciona nuevos principios activos para prevenir y mejorar molestias y enfermedades gastrointestinales funcionales, tales como IBS, adecuados como alimentos funcionales, ingredientes de suplementos dietéticos y fármacos.

Descripción resumida de la invención

5

25

- **[0015]** Los presentes inventores han hallado sorprendentemente que una composición que comprende el principio activo vicenin 2 tiene actividad antiespasmódica que inhibe a nivel neurotrópico y musculotrópico, así como actividad procinética, actuando ambas en la inhibición reversible de la colinesterasa y el agonista de acetilcolina.
- 30 **[0016]** De este modo, la presente invención describe un nuevo agente antiespasmódico y/o procinético, que ayuda a prevenir y mejorar la salud del intestino, tal como las molestias gastrointestinales, la dispepsia funcional (FD) o el síndrome de intestino irritable (IBS).
- [0017] La presente invención se refiere a una composición que comprende vicenin 2 como agente antiespasmódico y/o procinético para utilizar en i) prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), ii) tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), iii) reducir o equilibrar los trastornos digestivos, iv) reducir la hinchazón, v) mejorar la diarrea o vi) reducir la hipersensibilidad visceral y/o el dolor abdominal, y al uso de una composición comprende vicenin 2 para mantener un intestino sano, mantener una digestión normal, mejorar la regularidad del intestino, ayudar en la movilidad del intestino sano, el movimiento intestinal y/o una frecuencia de deposiciones, consistencia y/o forma de las deposiciones sanas y/o mejorar la función del intestino y/o inducir actividad antiespasmódica y/o procinética. Este ingrediente es, preferiblemente, un ingrediente derivado de una planta.
- **[0018]** Para fines de ejemplo, se describe en el presente documento que se puede utilizar un derivado funcionalmente activo de vicenin 2 para las afecciones mencionadas anteriormente.
 - **[0019]** En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende como principio activo vicenin 2 para utilizar en la mejora de la salud de los intestinos.
- [0020] Además, la presente invención se refiere a, en particular, una composición que comprende como principio activo vicenin 2 para utilizar como agente antiespasmódico y/o procinético. Preferiblemente, la composición comprende o deriva de una preparación vegetal que comprende el principio activo y, más preferiblemente, la preparación vegetal se ha enriquecido con el principio activo.
- [0021] La preparación vegetal se selecciona, preferiblemente, de un grupo que consiste en Perilla, Urtica, Passiflora, Camelia, Cayaponia, Colocasia, Desmodium, Hordeum, Origanum, Ocimum, Jatropha, Parkinsonia, Peperomia, Piheranthos, Centaurea, Indigo, Bomba, Lychnophera, Asplenium, Chinotto, Citrus, Viola, Trigonella, romero, menta, tomillo, albahaca, salvia, orégano, lavanda y otras especies que pertenecen a Lamiaceae, Labiatae y Urticaceae, Rosales o Malpighiales y puede ser una preparación de hojas, una preparación de frutas, una preparación de semillas, una preparación de tallos, una preparación de flores, una preparación de capullos, una preparación de raíces o una mezcla de diferentes partes de la planta. De la manera más preferente, la preparación es una preparación de hojas o una preparación de la parte de las áreas de la planta.
- [0022] En una realización más preferida, el principio activo es un vicenin 2 aislado obtenido mediante aislamiento o síntesis química.

[0023] Además, la presente invención se refiere a la utilización de vicenin 2 para mantener un intestino sano, prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), mantener una digestión normal, reducir o equilibrar los trastornos digestivos, mejorar la regularidad intestinal, apoyar una movilidad saludable del intestino, un movimiento intestinal y/o una frecuencia, consistencia y/o forma de las deposiciones saludable, reducir la hinchazón, mejorar la función intestinal, tal como la mejora del estreñimiento, mejorar la diarrea, reducir la hipersensibilidad visceral, el dolor abdominal y/o inducir efectos antiespasmódicos y/o procinéticos.

[0024] En particular, la presente invención se refiere a vicenin 2 para utilizar en mantener un intestino sano, prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), mantener una digestión normal, reducir o equilibrar los trastornos digestivos, mejorar la regularidad intestinal, apoyar una movilidad saludable del intestino, un movimiento intestinal y/o una frecuencia, consistencia y/o forma de las deposiciones saludable, reducir la hinchazón, mejorar la función intestinal, tal como la mejora del estreñimiento, mejorar la diarrea, reducir la hipersensibilidad visceral, el dolor abdominal y/o inducir efectos antiespasmódicos y/o procinéticos.

[0025] En una realización adicional, la presente invención es útil en un método para mantener un intestino sano, prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), mantener una digestión normal, reducir o equilibrar los trastornos digestivos, mejorar la regularidad intestinal, apoyar una movilidad saludable del intestino, un movimiento intestinal y/o una frecuencia, consistencia y/o forma de las deposiciones saludable, reducir la hinchazón, mejorar la función intestinal, tal como la mejora del estreñimiento, mejorar la diarrea, reducir la hipersensibilidad visceral, el dolor abdominal y/o inducir efectos antiespasmódicos y/o procinéticos, que comprende administrar una composición que comprende como principio activo vicenin 2.

[0026] Para fines de ejemplo, se describe en el presente documento un kit que comprende una composición que comprende el principio activo antiespasmódico y/o procinético vicenin 2 o derivados funcionalmente activos del mismo e instrucciones para la administración de dicha composición.

30 **[0027]** Preferiblemente, la composición para utilizar según la presente invención está comprendida en un producto alimenticio, suplemento dietético o medicamento y la concentración del principio activo es de 0,1 μ g a 500 μ g, preferiblemente de 2,5 μ g a 50 μ g y lo más preferiblemente de 5 μ g a 15 μ g.

[0028] En una realización preferida adicional, la preparación es un extracto vegetal, lo más preferiblemente un extracto líquido o en polvo obtenido mediante extracción.

[0029] La composición para utilizar según la presente invención puede comprender adicionalmente un agente adicional capaz además de mejorar la salud intestinal. Este agente adicional puede ser, preferiblemente, un agente prebiótico, un agente probiótico, un lípido, un agente de carga, un medicamento, un agente antiespasmódico o un agente antiinflamatorio.

[0030] Preferiblemente, el medicamento es un agente antiespasmódico adicional, un antidepresivo tricíclico, un antagonista de colecistoquinina-1, un agente serotonérgico, una benzodiazepina o análogo, un antagonista de la neuroquinina, un agonista de guanilato ciclasa C, un activador del canal C1-C2, un bloqueador de la secreción de Cl, un análogo de GLP1, un agonista de κ -opioide, un antiácido, un fosfato de sodio, un inhibidor de la recaptación de NA, análogo de omeprazol, glucocorticoide o un antibiótico.

[0031] Además, para fines de ejemplo, se describe en el presente documento un proceso de producción de una preparación del principio activo tal como se define anteriormente, que comprende las etapas de:

a) la selección de la materia prima vegetal,

10

15

20

25

35

40

45

55

60

- b) la preparación de la materia prima vegetal,
- c) aplicar un proceso de extracción utilizando extracción con disolventes y/o técnicas de filtración, preferiblemente seguido por concentración y/o secado por pulverización del extracto líquido en un polvo,
- d) determinar la concentración del principio activo y
- e) seleccionar la preparación que comprende el principio activo a una concentración de por lo menos el 0.01%.

[0032] En el proceso mencionado anteriormente, la preparación puede comprender el principio activo a una concentración de por lo menos, el 0,02%, o, a una concentración de por lo menos el 0,1%, 0,15%, 0,2% o lo más preferiblemente a una concentración de por lo menos el 0,2%, 0,25% o 0,3 %.

[0033] En algunos casos, la preparación puede comprender el principio activo en una concentración de por lo menos, el 0,2%, más preferiblemente, a una concentración de por lo menos el 0,5%, 1,5%, 3,0% o lo más preferiblemente a una concentración de por lo menos el 2,0%, 3,0% o 5,0%.

[0034] Las descripciones detalladas de métodos convencionales, tales como los empleados en el presente documento se pueden encontrar en la literatura, por ejemplo en el libro " Industrial Scale Natural Products

Extraction", publicado en el 2011 por Wiley-VCH.

[0035] El método analítico para determinar la concentración de vicenin 2 puede ser, por ejemplo, un método cromatográfico llamado cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas más populares de la química analítica. Se utiliza un detector de UV, detectando a 320 nm. Para la determinación de la concentración de vicenin 2, se pueden utilizar una referencia de vicenin 2 o sus derivados como material de referencia. Por ejemplo, se puede utilizar apigenina como sustancia de referencia y el contenido de vicenin 2 se calcula a través de la diferencia del peso de la molécula y la pendiente y la intersección de la curva de calibración para la apigenina.

10

15

25

[0036] En el proceso, la materia prima vegetal puede ser de la especie Perilla, en particular Perilla frutescens Britton variedad crispa o variedad acuta Kudo. La materia prima vegetal se puede preparar mediante secado, corte y/o molienda. La extracción puede realizarse preferiblemente con una materia prima cuyo tamaño de partícula se redujo a menos de 2 mm². El disolvente puede ser agua, metanol, etanol, propanol, isopropanol, acetato de etilo, hexano, cloroformo o diclorometano. Lo más preferiblemente se utiliza agua, ya que los glucósidos, tales como vicenin 2, que tienen propiedades higroscópicas, se extraen mediante agua caliente de manera más eficiente que con el alcohol. Además, algunos compuestos volátiles alergénico, tales comos perilaldehído, metileugenol y miristicina, que pueden aparecer en las especies diana que contienen vicenin 2, pueden eliminarse mediante agua caliente.

20 **[0037]** La proporción de materia prima con respecto al disolvente es preferiblemente entre 1:100 a 20:100 y más preferiblemente entre 2:100 y 10:100.

[0038] La extracción se puede realizar preferiblemente a temperatura ambiente hasta 150°C. La extracción se lleva a cabo más preferiblemente de 90°C a 125°C. En una realización más preferida, se puede utilizar calor con presión adicional

[0039] El tiempo de extracción puede ser de 10 minutos a 2 horas, más preferiblemente de 20 minutos a 50 minutos.

[0040] La planta para el proceso se puede seleccionar del grupo que consiste en Perilla, Urtica, Passiflora, Camelia, Cayaponia, Colocasia, Desmodium, Hordeum, Origanum, Ocimum, Jatropha, Parkinsonia, Peperomia, Piheranthos, Centaurea, Indigo, Bomba, Lychnophera, Asplenium, Chinotto, Citrus, Viola, Trigonella, romero, menta, tomillo, albahaca, salvia, orégano, lavanda y otras especies que pertenecen a Lamiaceae, Labiatae y Urticaceae, Rosales o Malpighiales.

[0041] El proceso proporciona un extracto con una concentración superior del principio activo a los procesos de la técnica anterior debido a la concentración del principio activo. La concentración superior se consigue utilizando el equipo de extracción del estado de la técnica, lo cual permite una interacción óptima entre la materia prima y los disolventes de extracción. Todas las etapas críticas del proceso, por ejemplo la temperatura, están controladas en el proceso en cualquier instante y son posibles adaptaciones continuas para asegurar el mayor rendimiento para el principio activo. Debido a la selección de los disolventes de extracción combinados con condiciones físicas optimizadas, es posible disminuir las sustancias no deseadas que pueden aparecer de forma natural en las diferentes materias primas.

[0042] Además, se puede obtener una preparación de principio activo mediante el proceso descrito anteriormente.
La preparación se utiliza como agente antiespasmódico y/o procinético y para mantener un intestino sano, prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), mantener una digestión normal, reducir o equilibrar los trastornos digestivos, mejorar la regularidad intestinal, apoyar una movilidad saludable del intestino, un movimiento intestinal y/o una frecuencia, consistencia y/o forma de las deposiciones saludable, reducir la hinchazón, mejorar la función intestinal, tal como la mejora del estreñimiento, mejorar la diarrea, reducir la hipersensibilidad visceral, el dolor abdominal y/o inducir efectos antiespasmódicos y/o procinéticos.

Breve descripción de las figuras:

55 **[0043]**

Figura 1: Efecto de vicenin 2 en la contracción del íleon de rata. Los datos se normalizan al efecto máximo de acetilcolina (control del 100%). Promedio \pm SE de 1-15 experimentos.

Figura 2: Efecto de AUC-V (0,005 mg/ml) sobre la contracción del íleon de rata inducida por concentraciones crecientes de acetilcolina. Los datos se normalizan al efecto máximo de acetilcolina (control del 100%). Se utilizó atropina (5x10⁻⁵ mg/ml) como control positivo. Promedio ± SE de 4 experimentos independientes. Las curvas de acetilcolina moduladas por el compuesto AUC-V y atropina fueron significativamente diferentes de la curva de acetilcolina (sin adiciones adicionales).

65

Figura 3: Efecto del compuesto AUC-V (0,05 mg/ml) sobre la contracción del íleon de rata inducida por

concentraciones crecientes de acetilcolina. Los datos se normalizan al efecto máximo de acetilcolina (control del 100%). Promedio \pm SE de 7-10 experimentos independientes. Las curvas inducidas por AUC-V son significativamente diferentes de la curva de acetilcolina (sin adiciones adicionales).

- Figura 4: Efecto del compuesto AUC-V (0,005 mg/ml) sobre la contracción del íleon de rata inducida por concentraciones crecientes de ion bario. Se utilizó paraverina (4x10⁻² g/ml) como control positivo. Los datos se normalizan al efecto máximo de ion bario (control del 100%). Las curvas mediadas por el compuesto AUC-V y papaverina fueron significativamente diferentes de la curva de acetilcolina sin adiciones. Promedio ± SE de 4 experimentos independientes.
 - **Figura 5:** Efecto de AUC-V (0,05 mg/ml) sobre la contracción del íleon de rata inducida por concentraciones crecientes de ion bario. Los datos se normalizan al efecto máximo de ion bario (control del 100%). Las curvas inducidas por AUC-V son significativamente diferentes de la curva de acetilcolina sin adiciones adicionales. Promedio ± SE de 6-9 experimentos independientes.
 - **Figura 6:** Efectos agudos de vicenin 2 (AUC-V) sobre la actividad de la red cortical in vitro. Se representan los cambios en la velocidad de los potenciales de acción para el tratamiento de 9 concentraciones acumuladas en el intervalo de 10 pg/ml a 300 μ l/ml (promedio \pm error estándar, n = 17; test t de Student apareado: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001).

Descripción detallada de la invención

15

20

25

30

35

55

60

65

[0044] Los presentes inventores hallaron sorprendentemente un agente que tiene efectos antiespasmódicos y efectos procinéticos.

- **[0045]** En particular, los inventores hallaron sorprendentemente que vicenin 2 presenta efectos antiespasmódicos a los músculos lisos del tracto gastrointestinal y efectos procinéticos que apoyan la movilidad GI. Esta eficacia es muy beneficiosa para la salud del intestino, ya que las molestias digestivas y la irritación intestinal se producen cuando los músculos en el intestino se contraen más rápidamente o más lentamente de lo normal, causando dolor, calambres, hinchazón, diarrea o estreñimiento. Ref: 4, 5, 6.
- [0046] El efecto antipespasmódico de vicenin 1 o un extracto que comprende vicenin 2 mantiene un intestino sano, previene o mejora el síndrome del intestino irritable (IBS), tiene un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), mantiene una digestión normal, reduce o equilibra los trastornos digestivos, mejora la regularidad intestinal, apoya una movilidad saludable del intestino, un movimiento intestinal y/o una frecuencia, consistencia y/o forma de las deposiciones saludable, reduce la hinchazón, mejora la función intestinal, tal como la mejora del estreñimiento, mejora la diarrea, reduce la hipersensibilidad visceral, el dolor abdominal o induce efectos antiespasmódicos y/o procinéticos.
- [0047] Los síntomas típicos para el IBS son la hipersensibilidad y el dolor abdominal, hinchazón, gases, malestar y hábitos alterados del intestino (es decir, ya sea el estreñimiento (IBS-E), la diarrea (IBS-d) o ambos (IBS alternado), que pueden destruir la calidad de vida de las personas gravemente afectadas, pero no conducen a enfermedades mortales y no desarrollan un cáncer de intestino. Ref: 4.
- [0048] Aunque la causa exacta es altamente variable entre individuos, existen ciertos tópicos que desencadenan ataques, incluyendo estrés, infecciones, flora intestinal alterada, sensibilidad a los alimentos o alergias, tiempos de comida irregulares o falta de fibra en la dieta. En el IBS, el intestino responde con contracciones o espasmos potentes a estímulos que no molestarían a otras personas simplemente comiendo alimentos. Los tipos de IBS y las causas entre individuos requieren un tratamiento diferente.
 - **[0049]** La terapia de primera línea para todas las formas de IBS incluye la educación, la reconfirmación, el ejercicio, evitar el desencadenamiento y modificaciones en la dieta. Ref.1 Terapias psicosociales para reducir el estrés diario y la ansiedad son importantes e incluyen el asesoramiento o seminarios para aprender a optimizar el comportamiento cognitivo.
 - **[0050]** Existen varios alimentos funciones o suplementos dietéticos para apoyar una digestión saludable. Los ingredientes actuales de alimentos funcionales para mantener una digestión saludable se dirigen a una flora microbiológica saludable (probióticos y prebióticos). Estos ingredientes ayudan a reducir la flatulencia, la sensación estar lleno, o estreñimiento. Además, se han anunciado una serie de terapias a base de hierbas sin pruebas que apoyen su beneficio, como por ejemplo el aceite de menta y TCM.
 - [0051] Las terapias farmacológicas tradicionales, en general, sólo se dirigen a síntomas individuales. Los laxantes osmóticos se prescriben para el IBS-c y los agentes antidiarreicos, tales como la loperamida, para el IBS-d. El dolor asociado con el IBS puede abordarse con antiespasmódicos, tales como hiosciamina o antidepresivos tricíclicos, tales como la amitriptilina. El alivio general de los múltiples síntomas del IBS rara vez se ha demostrado con estos agentes y a menudo están asociados con efectos adversos, algunos de los cuales imitan los síntomas del IBC.

[0052] La presente invención proporciona una nueva posibilidad importante de terapia para la salud de los intestinos que no sólo se dirige a los síntomas, sino que ataca los problemas sistémicamente.

<u>Definiciones</u>

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[0053] Debe indicarse que el término "un o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, "un anticuerpo", se entiende que representa uno o más anticuerpos. Por tanto, los términos "un" (o "una"), "uno/a o más", y "por lo menos uno/a" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

[0054] Por un ingrediente o principio "aislado", variante, o derivado del mismo, se entiende un agente que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un principio activo aislado se puede extraer de su entorno nativo o natural. Los principios activos producidos sintéticamente se consideran "aislados" para el propósito de la invención, ya que son principios activos nativos o sintéticos que han sido separados, fraccionados, o parcial o sustancialmente purificados mediante cualquier técnica adecuada

[0055] A menos que se indique lo contrario, los términos "trastorno" y "enfermedad" se utilizan indistintamente en el presente documento.

[0056] Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para los que se desea el diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

[0057] "Mantener un intestino sano", según la presente invención, se puede entender como mantener una digestión normal con una movilidad del intestino y una frecuencia de deposición, dolor e hinchazón normales.

[0058] "Prevención o mejora de la dispepsia funcional o la enfermedad del síndrome irritable", según la presente invención, puede entenderse como que el principio activo presenta efectos fisiológicos beneficiosos para evitar o mejorar el estreñimiento, la diarrea, o ambos alternados, dolor abdominal e hipersensibilidad visceral, hinchazón y molestias.

[0059] "Mejorar el síndrome del intestino irritable" significa en este contexto que produce un efecto beneficioso en un trastorno gastrointestinal funcional con síntomas de hipersensibilidad y dolor abdominal, hinchazón, gases, molestias y hábitos intestinales alterados (es decir, ya sea estreñimiento (IBS-c), diarrea (IBS-d) o ambos (IBS alternado), que puede destruir la calidad de vida de las personas gravemente afectadas, pero no conducen a enfermedades mortales y no desarrollan un cáncer de intestino. Ref: 4.

[0060] "Inducir efectos antiespasmódicos" se puede definir como la modulación del sistema colinérgico, de manera que se suprimen los espasmos musculares. Según la presente invención, se reduce la estimulación de las neuronas colinérgicas lo que resulta en la relajación del músculo liso intestinal. Preferiblemente, la modulación de un efecto antiespasmódico local musculotrópico se encuentra dentro de los músculos del intestino.

[0061] Se demostró que la actividad antiespasmódica del principio activo de la invención era local en el íleon, muscolótropo, para contrarrestar los factores desencadenantes, tales como alimentos o aditivos. Además, se confirmó una actividad neurotrópica que indicaba que un efecto espasmolítico resultante del estrés, comunicado a través de la conexión cerebro-intestino, se puede modular positivamente. Este concepto es nuevo y existía un hueco en la prevención y la mejora que podría cerrarse con el principio activo de la invención y la eficacia investigada.

[0062] "Actividad antiespasmódica", según la presente invención, se puede definir como una actividad que suprime los espasmos musculares, en particular para contracciones de músculos lisos, especialmente en órganos tubulares del tracto gastrointestinal.

[0063] "Actividad procinética", según la presente invención, se puede definir como la mejora de la movilidad gastrointestinal mediante el incremento de la frecuencia de contracciones del intestino, pero sin alterar su ritmo.

[0064] Vicenin 2 es un flavonoide que tiene una serie de derivatizaciones. Vicenin 2 o sus sinónimos Apigenin-6,8-di-C-glicósido, 5,7,4'-Trihidroxiflavona-6,8-di-C-glucósido, 5,7-Dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6,8-bis[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6 (hidroximetil)oxan-2-il]cromen-4-ona con el número de registro CAS 23666-13-9 es un flavonoide hallado en un conjunto de especies de plantas. Vicenin 2 se puede hallar, entre otras, en especies de Perilla, especies de Urtica, especies de Passiflora, especies de Camelia, especies de Cayaponia, especies de Colocasia, especies de Desmodium, especies de Hordeum, especies de Origanum, especies de Ocimum, especies de Jatropha, especies de Parkinsonia, especies de Peperomia, especies de Piheranthos, especies de Centaurea, especies de Indigo, especies de Bomba, especies de Lychnophera, especies de Asplenium, especies de Chinotto, especies de Citrus, especies de Viola, especies de Trigonella, especies que pertenecen a Lamiacea, Labiatae y, por ejemplo, romero, menta, tomillo, albahaca, salvia, orégano, lavanda y especies que pertenecen a Lamiaceae, Labiatae y Urticaceae, Rosales o Malpighiales.

[0065] El proceso estándar para purificar vicenin 2 fuera del material de la planta se basa en diferentes métodos cromatográficos conocidos por el experto en la materia y, consecuentemente, se puede identificar vicenin 2 mediante espectroscopía. Estos procesos se pueden revisar en varias publicaciones. Ref. 15, 16

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[0066] Hasta ahora la literatura describe que vicenin 2 tiene efectos anticáncer, antiinflamatorios y antinociceptivos. Ref. 7, 8, 9, 10, 11 "Un extracto vegetal que comprende vicenin 2 o un derivado funcionalmente activo del mismo' significa aquí, según la presente invención, un extracto que comprende vicenin 2 a una concentración que se puede medir. El extracto o preparación vegetal comprende preferiblemente el principio activo preferiblemente a una concentración del 0,02% al 0,3%, más preferiblemente del 0,1% al 0,2%, y lo más preferiblemente del 0,15% al 0,2%.

[0067] En algunos casos, la preparación puede comprender el principio activo a una concentración de por lo menos el 0,2%, más preferiblemente, a una concentración de por lo menos el 0,5 %, 1,5 %, 3,0 % o lo más preferiblemente a una concentración de por lo menos el 2,0%, 3,0% o el 5,0 %.

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, "derivados funcionalmente activos" o "análogos funcionalmente activos", que se utilizan indistintamente en el presente documento, de vicenin 2 se refieren a compuestos estructuralmente similares a vicenin 2, por ejemplo, flavona c-glicósidos o flavona o-glicósidos, en particular, apigenin 7-O-β-glucurónido, apigenin-7-O-[β-glucuronosil(1-2 β-glucurónido], luteolin 7-O-β-glucurónido o escutelarein O-β-glucurónido (escutelarina), que también muestran actividad antiespasmódica y/o procinética. La actividad antiespasmódica y/o procinética se puede medir tal como se muestra en los ejemplos. Existen varias posibilidades para investigar la actividad antiespasmódica y/o procinética que son conocidas por el experto en la materia. Los estudios in vitro, como ensayos de unión a receptor o estudios de inhibición enzimática, son métodos estándar para identificar la actividad y su modo de acción. Además, se utilizan estudios ex vivo para confirmar la eficacia en el área diana, por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 1, en el que se investigó el efecto antiespasmódico en intestinos de rata aislados. Además, en estudios de animales in vivo y humanos in vivo, se utilizan para confirmar el efecto en el sistema biológico. Las mediciones para cuantificar la actividad antiespasmódica y procinética en los estudios in vivo que se dirigen a la movilidad gastrointestinal son, por ejemplo, la frecuencia de las deposiciones y la consistencia de las deposiciones. Estos tipos de estudios son conocidos por el experto en la materia.

[0069] "El principio activo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ingrediente o principio que tiene actividad antiespasmódica y/o procinética, preferiblemente, vicenin 2 o un derivado funcionalmente activo o análogo del mismo.

[0070] A efectos de inducir los efectos antiespasmódicos y/o procinéticos, la concentración del principio activo en la composición es de 0,1 μ g a 500 μ g, preferiblemente de 2,5 μ g a 50 μ g y, lo más preferiblemente, de 5 μ g a 15 μ g de vicenin 2.

[0071] La composición es una preparación vegetal o extracto vegetal, lo más preferiblemente un extracto líquido o en polvo obtenido mediante extracción y que comprende vicenin 2.

[0072] La composición según la presente invención puede estar comprendido en un producto de alimento funcional, suplemento dietético o en un fármaco. "Un producto alimento funcional", según la presente invención se entiende que es un producto alimento, bebida o fórmula infantil, que ofrece, adicionalmente a un valor nutricional, un beneficio a la salud, lo cual apoya y mejora la salud y el bienestar o ayuda a reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad.

[0073] "Un producto suplemento dietético", según la presente invención son productos alimenticios en forma de pastilla, comprimido, cápsula, polvo o líquido, que se pretende tomar por la boca, y contienen sustancias, tales como vitaminas, minerales, alimentos, agentes vegetales, aminoácidos y pretende complementar la ingesta habitual de estas sustancias a través de la dieta normal.

[0074] "Un medicamento/fármaco/medicina", según la presente invención, es cualquier sustancia con el potencial para prevenir o curar una enfermedad o mejorar el bienestar físico o mental. Si no se indica lo contrario, los términos "fármaco", "medicina" o "medicamento" se utilizan indistintamente en este documento e incluirán, pero sin limitación, todos (A) los artículos, medicinas y preparaciones para uso interno o externo, así como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a ser utilizadas para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad del hombre o de otros animales; y (B) los artículos, medicinas y preparaciones (excepto alimentos) cuyo propósito es afectar a la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre o de otros animales; y (C) los artículos destinados a ser utilizados como componente de cualquier artículo especificado en las cláusulas (A) y (B). El término "fármaco", "medicina" o "medicamento" incluirá la fórmula completa de la preparación destinada a ser utilizada en el hombre u otros animales que contienen uno o más "agentes", "ingredientes", "compuestos", "sustancias" o "composiciones (químicas)" y, en algún otro contexto, también otros excipientes farmacéuticamente inactivos, tales como cargas, disgregantes, lubricantes, deslizantes, aglutinantes para asegurar un transporte fácil, la disgregación, la desagregación, la disolución y la disponibilidad biológica del "fármaco", "medicina", o "medicamento" en un lugar

diana deseado dentro del cuerpo del hombre u otros animales, por ejemplo, en la piel, en el estómago o el intestino. Los términos "agente", "compuesto" o "sustancia" se usan indistintamente en el presente documento y deberán incluir, en un contexto más particular, pero sin limitación, todos los agentes farmacológicamente activos, es decir, agentes que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado o se investigan o analizan por la capacidad de inducir dicho posible efecto farmacológico mediante los métodos de la presente invención.

[0075] Tal como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tales como el desarrollo de una enfermedad intestinal. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Los que necesitan el tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno, así como los propensos a tener la afección o trastorno, o aquellos en los que la manifestación de la afección o trastorno debe prevenirse.

[0076] Éstas y otras realizaciones se describen y están comprendidas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. De las bibliotecas públicas y las bases de datos se puede extraer utilizando, por ejemplo, dispositivos electrónicos, bibliografía adicional referente a cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos a utilizar según la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline" o "Pubmed", que es producida por la National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine en el National Institutes of Health. Más bases de datos y direcciones web, tales como la biblioteca virtual "Martindale's center" son conocidos por el experto en la materia y también se pueden obtener utilizando los motores de búsqueda de internet.

[0077] Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria.

[0078] La descripción anterior describe, en general, la presente invención. Se puede obtener un entendimiento más completo mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLOS

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[0079] Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención en ningún caso.

[0080] La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología vegetal, química, bioquímica, fisiología y farmacología que están entre las técnicas habituales del sector.

Ejemplo 1: Vicenin 2 tiene actividad antiespasmódica

Métodos y compuesto

[0081] Se analizó un compuesto de vicenin 2 aislado por su efecto antiespasmódico con respecto al sistema colinérgico y con respecto a la concentración no específica mediada por Ba⁺⁺. Por lo tanto, se precontrajo el íleon de rata con concentraciones crecientes de acetilcolina o Ba⁺⁺. Se determinó el desplazamiento de cualquiera de las la curva de respuesta a la concentración por el compuesto. Como controles positivos se utilizaron atropina o papaverina dependiendo del tipo de experimento. El vicenin 2 aislado mostró una buena solubilidad.

Cálculo de las concentraciones a utilizar en los experimentos:

[0082] Se estimó que la dosis de vicenin 2 para humanos era entre 5 y 15 μ g/70 kg de peso corporal que corresponderá a 0.071 y 0,214 μ g/kg de peso corporal. Debido al mayor metabolismo en roedores en comparación con humanos, las dosis se calcularon que eran aproximadamente entre 0,5 y 1,49 μ g/kg de peso corporal. El compartimento (extractos hidrofílicos) central (sangre) es aproximadamente el 7% del volumen total del cuerpo, es decir, entre 0,5/70 g y 1.4 μ g/70 g de sangre. Dado que la sangre está en contacto directo con el íleon, se espera una concentración de 7 a 20,86 μ g/kg (0,007 a 0,021 μ g/g) para el íleon. Nota: los cálculos no se corrigieron para una gravedad (densidad) específica de los líquidos (que difieren posiblemente en exactamente 1,0) y para la absorción (que se asumió que era del 100%; sin datos disponibles). Por lo tanto, era razonable trasladar estos cálculos in vivo a los experimentos in vitro y en estos experimentos se utilizaron 10 y 100 μ l de una solución madre por 10 ml de baño de incubación. Por lo tanto, las concentraciones finales de AUC-V fueron de 0,005 ó 0,05 mg/ml de volumen del baño.

[0083] El sulfato de acetilcolina y el cloruro de bario eran de Roth, Karlsruhe, Alemania, y Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Alemania. Todos los otros reactivos y compuestos utilizados para las incubaciones se obtuvieron de Roth, Karlsruhe, Alemania.

Íleon de rata

10

15

20

30

35

40

45

60

65

[0084] Bajo el protocolo aprobado por el Comité de Cuidado y Utilización de Animales de Münster, Alemania, se utilizaron ratas macho y hembra (Charles River, Sulzfeld, Alemania) que pesaban 200 a 320 g. Las ratas se anestesiaron (CO₂). Se extrajo el íleon próximo, se lavó y se colocó en una solución de Krebs-Henseleit. Se colocaron segmentos de 1 cm en baños de órganos de 10 ml con una tensión de descanso de 1,0 g (precarga). Se unió un extremo a un transductor de desplazamiento de fuerza (transductor de palanca B40, Typ 373) combinado con un amplificador de dos canales (tipo 301, Hugo Sachs Elektronik, March, Alemania); se utilizó un dispositivo de registro multi-pen (Rikadenki Kogyo, Tokio, Japón). La composición de la solución de Krebs-Henseleit fue (mM): NaCl 118,1, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25 y glucosa 5,6. La solución se mantuvo a 37°C, p H 7,4 y se gaseó con carbógeno (una mezcla de 95 % O₂/5 % CO₂). El tiempo de equilibrado para el íleon antes de iniciar el experimento fue por lo menos de 30 minutos. Después de tratar los tejidos con los extractos durante 3 minutos, se registraron isotónicamente en el baño de órganos las curvas de respuesta a la concentración acumulada utilizando acetilcolina o ion bario y se dejó que el efecto alcanzara un estado estacionario a cada concentración.

[0085] Los resultados se normalizaron al 100% (efecto máximo de acetilcolina o ion bario solos).

Análisis estadístico

[0086] Se obtuvieron diferencias entre las curvas completas mediante la comparación de los valores F de las curvas mejor ajustadas utilizando GraphPad-Prism (versión 3.00, GraphPad Software, Inc., 1999). Se consideró P < 0,05 como estadísticamente significativo.

25 Resultados

[0087] Tal como se muestra en la figura 1, el vicenin 2 indujo una ligera (no significativa) relajación por sí solo. Los datos se muestran como el % del efecto máximo de acetilcolina (controles en presencia de 10 μ g/ml). Esto significa que carece de un efecto espasmolítico directo.

[0088] A continuación, se muestra el efecto de varias concentraciones de acetilcolina y la interacción con vicenin 2 (figura 2). Las concentraciones bajas del compuesto (0,005 mg/ml) desplazaron la curva de acetilcolina hacia la derecha de una manera competitiva. Los datos indican un efecto antiespasmódico neurotrópico. La atropina (control positivo) muestra el efecto antiespasmódico neurotrópico competitivo esperado, lo cual indica que la base del experimento funciona. La utilización de atropina se mimetiza por la N-butilescopolamina comercializada (Buscopan®).

[0089] Estos experimentos se repitieron mientras la concentración de vicenin 2 se incrementó 10 veces, de 0,005 a 0,05 mg/ml (concentración final del baño). Los datos se muestran en la figura 3. El incremento de las concentraciones del compuesto da lugar a un desplazamiento a derecha y abajo más intenso de la curva de acetilcolina, lo cual indica un efecto dependiente de la concentración.

[0090] A continuación, se muestra el efecto de varias concentraciones de Ba⁺⁺ y la interacción con vicenin 2 (figura 2). Las concentraciones bajas del compuesto (0,005 mg/ml) desplazaron la curva de Ba⁺⁺ hacia abajo, indicando un efecto antiespasmódico no competitivo. Los datos indican un efecto antiespasmódico musculotrópico. La papaverina (control positivo) muestra el efecto antiespasmódico musculotrópico no competitivo esperado, lo cual indica que la base del experimento es correcta y funciona.

[0091] Estos experimentos se repitieron mientras la concentración del compuesto se incrementó 10 veces, de 0,005 a 0,05 mg/ml (concentración final del baño). Los datos se muestran en la figura 5. El compuesto muestra resultados adicionales en un desplazamiento a derecha y abajo de la curva de Ba⁺⁺, lo cual indica una inhibición no competitiva (efecto antiespasmódico) del efecto del Ba⁺⁺. Los efectos fueron tan intensos como a concentraciones más bajas mostradas en la figura 5.

55 Discusión

[0092] Los extractos y fármacos se han analizado de dos maneras: en primer lugar, si tenían un efecto por sí solos (denominado efecto espasmolítico), y en segundo lugar, si tienen un efecto antiespasmódico contra compuestos que inducen la concentración del músculo liso.

[0093] El efecto antiespasmódico sobre los músculos lisos que conducen a un alivio de los síntomas gastrointestinales que incluyen los síntomas de la enfermedad del intestino se puede conseguir mediante dos tipos de compuestos eficaces: deben tener efectos espasmódicos neurotrópicos o musculotrópicos o incluso ambos. Fisiológicamente, un efecto neurotrópico está mediado a través de acetilcolina; un efecto musculotrópico está mediado a través de, por ejemplo, compuestos tóxicos. Sorprendentemente, el compuesto vicenin 2 tiene una actividad antiespasmódica, inhibiendo la actividad neurotrópica y musculotrópica. Lo que es importante, sus efectos

muestran una dependencia con la concentración con respecto a su actividad antiespasmódica. Sus efectos no son tan fuertes como los típicos compuestos cabeza de serie (controles positivos): en este caso, los efectos fueron menores en comparación con la atropina (experimentos con acetilcolina) o papaverina (experimentos con Ba⁺⁺).

5 [0094] Resumiendo, el compuesto vicenin 2 presenta efectos espasmódicos utilizando dos mecanismos diferentes de acción que probablemente ayudan cuando existe una contracción irregular que conduce a los síntomas de GI. Este efecto fue sorprendente, ya que se han descrito otros glicósidos de flavonoides que tienen efectos más débiles.

Ejemplo 2: Vicenin 2 tiene actividad procinética

Métodos y compuestos

10

15

20

25

35

65

[0095] El objetivo de este ejemplo fue la evaluación de los efectos neuroactivos agudos de vicenin 2 (denominado AUC-V) sobre la actividad neuronal de las redes del córtex frontal murino in vitro mediante registros electrofisiológicos multicanales.

[0096] Por lo tanto, en una primera etapa, se representó la curva dosis-efecto de vicenin 2 mediante el incremento acumulado de la concentración de la sustancia, de manera que se cubre de manera óptima el espectro de actividad de la sustancia con 9 concentraciones. Se utilizaron concentraciones de 100 fg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g /ml, 10 μ g /ml, 100 μ g /ml μ g /ml, 100 μ g /ml μ g /m

[0097] Posteriormente, se repitieron por lo menos 10 veces las mediciones de la curva dosis-efecto de las sustancias de análisis. Los patrones de actividad eléctrica registrada se caracterizaron por 220 características y se evaluaron estadísticamente sus cambios.

[0098] A continuación, se llevó a cabo un análisis adicional a través de un análisis de reconocimiento de patrones y a través de una comparación con la base de datos NeuroProof para determinar los mecanismos relevantes implicados en los cambios inducidos del patrón de actividad del córtex frontal por cada sustancia.

30 Materiales

[0099] Los productos químicos 5-fluoro-2'-desoxiuridina + uridina (FDU), y poli-D-lisina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical GmbH (Steinheim, Taufkirchen, Alemania). La DNase I (de páncreas bovino), y laminina se adquirieron de Roche (Mannheim, Alemania), suero fetal bovino de Biotech GmbH (Aidenbach, Alemania), y acutasa de PAA (Alemania). El suero de caballo y el medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) se adquirieron de GIBCO BRL (Paisley, Reino Unido).

Neurochips de grupos de microelectrodos

40 [0100] Se proporcionaron neurochips de grupos de microelectrodos (neurochips MEA) por el Center for Network Neuroscience (CNNS) en la University of North Texas. Estos chips de vidrio de 5x5 cm² presentan una matriz de registro central con 64 electrodos pasivos y conductores de de óxido de indio y estaño. La superficie del material de aislamiento hidrofóbico se activó mediante un pulso breve de llama de butano a través de una mascara de acero inoxidable. De este modo, se asegura la unión celular es una región adhesiva confinada (diámetro de 5 mm centrado en el grupo de electrodos). Las regiones de superficie activada se recubrieron con poli-D-lisina (25 μg/ml; 30-70kD) y laminina (16 μg/ml). Las técnicas de fabricación y métodos de cultivo se han descrito previamente.

Cultivo celular

50 [0101] Se recogió tejido de córtex frontal de ratones embrionarios chr:NMRI del día 14 ó 15. Después de anestesia con éter etílico, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical según la Acta 4 de la Protección de a animales de Alemania. Se cultivó tejido neuronal incluyendo el uso de DNAse I (8000 unidades/ml) y acutasa (10 U/ml) para la disociación del tejido. El tejido se disoció enzimáticamente con acutasa y mecánicamente con pipetas de transferencia. Las células se resuspendieron en DMEM 10/10 (10 % de suero de caballo y 10 % suero de ternera 55 fetal) a una densidad de 1.0 x 10⁶ células/ml, y se cultivaron 400 ml sobre superficies de MEA. Los cultivos se incubaron a 37℃ en una atmósfera de CO 2 al 10% hasta que estaban listos para su uso, que normalmente son de cuatro semanas a tres meses después del cultivo. Los medios de cultivo se rellenaron tres veces por semana con DMEM que contenía un 10% de suero de caballo. Como en el tejido de origen, se desarrollan redes a partir de una mezcla de diferentes tipos de neuronas y células gliales postmitóticas. Las células gliales presentan funciones 60 auxiliares importantes para el metabolismo y para suministrar a las neuronas iones y nutrientes. Los cocultivos en desarrollo se trataron con 5-fluoro-2'-desoxiuridina (25 µM) y uridina (63 µM) durante 48 h para prevenir una proliferación glial adicional.

[0102] Las células que crecían directamente sobre neurochips aparecen como redes neuronales naturales. Éstas están compuestas de una mezcla de neuronas y células gliales comparables con el tejido de origen, mientras que en la interacción con las neuronas, las células gliales cumplen varias funciones del metabolismo y transporte. Las

neuronas se acoplaron eléctricamente a los electrodos del neurochip, mediante lo cual se pueden registrar los potenciales de acción de las células y se pueden evaluar sus amplitudes y el patrón de actividad eléctrica.

[0103] La actividad empieza aproximadamente de tres a cuatro días in vitro en forma de potenciales de acción aleatorios. Sólo después de establecer un patrón de actividad estable después de 4 semanas, se utilizan las redes neuronales en el análisis de sustancias. Para este estudio, se utilizaron cultivos entre 26 y 29 días in vitro.

Registro multicanal

5

- [0104] Para el registro extracelular, se colocaron neurochips de MEA en cámaras de registro con un baño constante esterilizado y se mantuvieron a 37°C. Los registros se hicieron en DMEM/suero de caballo al 10%. El pH se mantuvo a 7,4 con una corriente continua de flujo de aire filtrado y humidificado con un 10% de CO₂. Se colocaron grupos de preamplificadores en cualquiera de los lados de la cámara de registro. El registro se realizó con un sistema procesador de adquisición multicanal, un sistema amplificador de 64 canales controlado por ordenador (Plexon, Inc., Dallas, TX, Estados Unidos) que proporciona una amplificación, filtración, cambios programables y un procesado digital de la señal de las señales del microelectrodo. La ganancia total del sistema fue de 10K con una velocidad de muestreo de 40 kHz. Las señales registradas de manera rutinaria por estos neurochips se localizan en el intervalo de 15-1800 mV.
- [0105] El sistema de adquisición de señales multicanal proporcionó datos de los potenciales de acción de neuronas individuales. La identificación y separación de los potenciales de acción se realizó con un algoritmo apareado a una plantilla en tiempo real. Esto permitió el registro extracelular de potenciales de acción de un máximo de 256 neuronas simultáneamente.
- [0106] Los potenciales de acción, o "spikes", se registraron en trenes de potenciales de acción y se agrupan en los denominados ráfagas. Las ráfagas se describieron cuantitativamente a través del análisis directo de los potenciales de acción utilizando el programa NeuroEXplorer (Plexon Inc., Dallas, TX, Estados Unidos) y programas internos. Las ráfagas se definieron por el inicio y el final de potenciales de acción cortos. Los intervalos máximos de los potenciales de acción que definen el inicio de una ráfaga se ajustaron de 50 a 150 ms y los intervalos máximos para acabar una ráfaga de 100 a 300 ms.

Análisis de datos multiparamétricos

[0107] El análisis del contenido elevado de los patrones de actividad de redes proporcionó una descripción multiparamétrica que caracteriza los cambios en cuatro categorías: actividad general, estructura de la ráfaga, sincronicidad y comportamiento oscilador. Se cuantificaron los cambios en la actividad específica de sustancia mediante el cálculo para cada fase de actividad estable después de la aplicación de la sustancia de un total de 200 parámetros del tren de potenciales de acción que describen la actividad para estas cuatro categorías.

40 Análisis estadístico

35

45

50

55

60

65

[0108] Los resultados se expresan como el promedio de la serie \pm SEM. Se analizaron las distribuciones absolutas de los parámetros para la normalidad. Se evaluó el nivel de significancia después de la aplicación del compuesto utilizando el test t de Student apareado. Se evaluó una significancia ente dos sustancias o en relación con un disolvente contenido (por ejemplo, DMSO) utilizando el test t de Student no apareado. P < 0,05 se consideró estadísticamente no significante.

[0109] Para la comparabilidad directa, se normalizaron todos los parámetros para cada experimento y cada tratamiento experimental con respecto a los valores correspondientes de la actividad de referencia (nativa o después del bloqueo de receptores si es aplicable fijado al 100%).

[0110] Para cada experimento, la velocidad de cambio de los potenciales de acción en función de la concentración se ajustó a una curva dosis-respuesta sigmoidal de una fase o sigmoidal multifásica proporcionada por la ecuación:

$$y = y_{\text{INICIO}} + \frac{y_{\text{FINAL}} - y_{\text{INICIO}}}{1 + 10^{\lceil \log(EC_{SO}) - \log(x) \rceil \cdot nH}}$$

que determina los valores de la concentración eficaz que causan el 10, 50, y 90% del efecto (EC₁₀, EC₅₀, y EC₉₀) y de la pendiente (coeficiente de Hill nH; describe la pendiente de la curva: un valor elevado corresponde a una disminución importante que podría corresponder a una neurotoxicidad funcional). En el caso de la respuesta multifásica debido a varios mecanismos de acción, el término de la derecha se añade repetidamente a las fases adicionales.

Reconocimiento y clasificación de patrones

[0111] Para clarificar el modo de acción de la sustancia de prueba sobre la actividad de las redes corticales, se analizaron estos experimentos adicionalmente utilizando métodos de reconocimiento de patrón. Para cada fase de actividad de concentración estable, se normalizaron los 200 parámetros del tren de potenciales de acción mediante la actividad de referencia nativa. Estos registros de datos se computerizaron para las sustancias de prueba y las sustancias de referencia.

[0112] Utilizando un algoritmo de selección de características, en base a las sustancias de referencia, se seleccionaron los 40 parámetros más descriptivos para los 200 parámetros del tren de potenciales de acción. Se calcularon las clasificaciones de las características de la actividad utilizando varios métodos de valoración basados en los experimentos de clasificación y comparados con sus predicciones correctas totales. De este modo, se obtuvieron los mejores resultados para un algoritmo modificado MDL (longitud mínima de descripción). Se estableció un grupo de datos de preparación con estos 40 parámetros del tren de potenciales de acción en forma de registros de datos de las sustancias de referencia. A continuación, se preparó una red neuronal artificial, una red proactiva multicapa y un algoritmo de retropropagación sin unidades escondidas. Posteriormente se clasificaron los registros de los datos respectivos de las cuatro sustancias. Se llevó a cabo una clasificación contra 105 sustancias en la base de datos.

20 Resultados:

5

10

15

25

30

35

[0113] En general, el vicenin 2 tiene el efecto de inducir una disminución de la actividad de redes corticales con una EC_{50} a 2 pg/ml y una disminución máxima hasta el 80% de la actividad nativa sin afectar a la estructura de la ráfaga, sino al comportamiento oscilatorio de la red. Estos resultados se muestran en la figura 6, que ilustra los cambios dependientes de la concentración en la actividad de la red cortical. Se podía observar que el vicenin 2 influye en la neuroactividad. En una segunda etapa, esta actividad se evaluó posteriormente mediante una clasificación contra controles positivos.

Clasificaciones

[0114] La clasificación contra 105 sustancias utilizando el registro electrofisiológico multicanal de vicenin 2 y las 105 sustancias identificó varias actividades para vicenin 2.

Tabla 1 muestra los resúmenes de las 10 clasificaciones más elevadas.

AUC-V, todos	143
referencia	#
Olanzapina	
Eserina	
Amisulpride	
Encefalina	
Dodecilsulfato sódico	
Bromuro de atropinmetilo	
Nicotina	
Indatralina	
Modafinilo	
DPDPE	

[0115] Tabla 1. Clasificación de vicenin 2 (AUC-V) contra la base de datos de NeuroProof. Se muestra una clasificación de los resultados de la clasificación, lo cual significa que x-% de todos los registros de datos de esta sustancia se clasificaron como la respectiva sustancia en la columna izquierda; DS corresponde a la clasificación general relativa.

[0116] Por ejemplo, fue posible identificar la actividad sedativa y ansiolítica de vicenin 2 mediante la clasificación contra olanzapina y amisulpride. La olanzapina es un agente serotonérgico como el antagonista de 5-HT₃, el agonista parcial de 5-HT₃ y el agonista de 5-HT₄.

[0117] Además, también fue posible confirmar la actividad de reducción del dolor de vicenin 2 mediante la clasificación contra encefalina. Las encefalinas son ligandos endógenos que se unen a los receptores de opioides del cuerpo que conducen a actividad antinociceptiva.

[0118] Sorprendentemente, vicenin 2 también mostró un registro electrofisiológico multicanal comparable con el patrón de de los controles positivos de eserina y nicotina. La eserina es un inhibidor de la colinesteresa reversible y la nicotina actúa como un agonista de acetilcolina.

Resultados:

45

50

40

13

[0119] El efecto procinético mejora la movilidad gastrointestinal mediante el incremento de la frecuencia de las contracciones en el intestino delgado, pero sin cambiar su ritmo. Esto conduce a un alivio de los síntomas gastrointestinales, tales como el malestar abdominal, la hinchazón, el estreñimiento y otros síntomas relacionados con la dispepsia funcional o el síndrome del intestino irritado. Sorprendentemente, el compuesto vicenin 2 tiene una actividad procinética actuando de dos manera diferentes. En primer lugar como un inhibidor de colinesterasa reversible, y en segundo lugar como un agonista de acetilcolina.

[0120] Resumiendo, el compuesto vicenin 2 presenta efectos procinéticos mediante dos modos de acción diferentes que probablemente ayudan cuando existe una contracción irregular que conduce a una movilidad GI reducida y a síntomas GI. Este efecto no se ha descrito previamente para ningún glicósido de flavonoide.

Resumen

10

20

25

30

35

55

- 15 [0121] Resumiendo, vicenin 2 demostró sorprendentemente una eficacia antiespasmódica y procinética.
 - **[0122]** Se analizó por su efecto antiespasmódico en un estudio de animales ex vivo utilizando intestino de rata aislado, ejemplo 1. Se investigó el efecto antiespasmódico con respecto al sistema colinérgico (acetilcolina) y con respecto a una contracción no específica mediada por Ba⁺⁺. Vicenin 2 presenta actividad antiespasmódica, inhibiendo la actividad neurotrópica y musculotrópica.
 - [0123] La actividad neurotrópica también se confirmó en un estudio in vitro analizando el efecto neuroactivo agudo de vicenin 1 en la actividad neuronal de las redes de córtex frontal murino mediante registros electrofisiológicos multicanal. El registro electrofisiológico multicanal de vicenin 2 mostró un patrón comparable con el control positivo de bromuro de atropinmetilo.
 - **[0124]** Además, se observó el efecto procinético basado en dos modos diferentes de acción. En primer lugar, vicenin 2 mostró un registro electrofisiológico multicanal comparable con el patrón del control positivo de serina para la inhibición de colinesterasa reversible, y en segundo lugar, mostró un patrón comparable con la nicotina, que actúa como agonista de acetilcolina. Ambos modos de acción incrementan la actividad del sistema parasimpático y, consecuentemente, conducen a una actividad gastrointestinal superior.
 - [0125] La combinación de efectos antiespasmódicos y procinéticos conducen a efectos beneficiosos que ayudan en la salud del intestino.

Referencias

[0126]

- 1. From the analyst's couch: The IBD market: Nature Reviews Drug Discovery, 5, 99-200, 2006
- 40 2. www.theibsnetwork.org
 - 3. Irritable bowel syndrome, Gastroenterology, 60, 1, 2005
 - 4. Irritable bowel syndrome, National Digestive Disease Information Clearinghouse, NIH Publication No. 07-693, 2007
- 5. The functional gastrointestinal disorder and the Rome III process, D.A. Drossmann, Gastroenterology, 130, 1377-45 1390, 2006
 - 6. University of Maryland, Medical center, Medical reference for IBS www.umm.edu/altmed/articl/irritable-bowel-000098.htm
 - 7. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. Nagaprashantha LD, et al., Biochem Pharmacol, 7, 2011
- 50 8. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of Urtica circularis, Marrassini C, et al, J Nat Prod. 24;74(6):1503-7, 2011
 - 9. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of Passiflora edulis 'edulis' and Passiflora edulis 'flavicarpa', Li H, et al, J Ethnopharmacol, 16;133(3):1085-90, 2011
 - 10. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of Urtica circularis. Gorzalczany S, et al, J Ethnopharmacol..:134(3):733-8, 2011
 - 11. Neuropharmacological activity of the pericarp of Passiflora edulis flavicarpa degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids, Sena LM, et al., Exp Biol Med (Maywood), (8):967-75, 2009
 - 12. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. Bülbring E., et al,Br. J. Pharmacol. 13, 44-57, 1958
- 13. The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis, the local production of 5-hydroxytryptamine and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity. Bülbring, E., et al, J. Physiol. (Lond) 140, 381-407, 1958
 - 14. Clinical practice. Irritable bowel syndrome", Mayer EA, N. Engl. J. Med. 358 (16): 1692-9, 2008
 - 15. Flavon C-Glycosides from Viola yedoensis Makino, Chen Xie, et al, Chem.Pharm.Bull. 51 (10) 1204-1207,2003
- 65 16. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of Urtica Circularis, Marrassini, C., et al., J. of Natural roducts, 74, 1503-1507, 2011

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende vicenin 2 como agente antiespasmódico y/o procinético para utilizar en i) prevenir o mejorar el síndrome del intestino irritable (IBS), ii) tener un efecto fisiológico beneficioso para mantener, prevenir y/o mejorar la dispepsia funcional (FD), iii) reducir o equilibrar los trastornos digestivos, iv) reducir la hinchazón, v) mejorar la diarrea o vi) reducir la hipersensibilidad visceral y/o el dolor abdominal.

5

10

15

35

45

50

- 2. Utilización de una composición que comprende vicenin 2 para mantener un intestino sano, mantener una digestión normal, mejorar la regularidad del intestino, ayudar en la movilidad del intestino sano, el movimiento intestinal y/o una frecuencia de deposiciones, consistencia y/o forma de las deposiciones sanas y/o mejorar la función del intestino y/o inducir actividad antiespasmódica y/o procinética.
- 3. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, o utilización, según la reivindicación 2, en las que la composición comprende o deriva de una preparación vegetal que comprende el principio activo o en las que el vicenin 2 es un vicenin 2 aislado obtenido mediante aislamiento o síntesis química.
- 4. Composición para utilizar, según la reivindicación 3, o utilización, según la reivindicación 3, en las que la preparación vegetal se ha enriquecido en el principio activo.
- 5. Composición para utilizar, según la reivindicación 4, o utilización, según la reivindicación 4, en las que la preparación vegetal se selecciona del grupo que consiste en Perilla, Urtica, Passiflora, Camelia, Cayaponia, Colocasia, Desmodium, Hordeum, Origanum, Ocimum, Jatropha, Parkinsonia, Peperomia, Piheranthos, Centaurea, Indigo, Bomba, Lychnophera, Asplenium, Chinotto, Citrus, Viola, Trigonella, romero, menta, tomillo, albahaca, salvia, orégano, lavanda y otras especies que pertenecen a Lamiaceae, Labiatae y Urticaceae, Rosales o Malpighiales y en las que, preferiblemente, la preparación vegetal es una preparación de hojas, una preparación de frutas, una preparación de semillas, una preparación de tallos, una preparación de flores, una preparación de capullos, una preparación de raíces o una mezcla de diferentes partes de la planta.
- 6. Composición para utilizar, según la reivindicación 1 ó 3 a 5, o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que está comprendida en un producto alimenticio, un suplemento dietético o medicamento.
 - 7. Composición para utilizar, según la reivindicación 1 ó 3 a 6, o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en las que la concentración del principio activo es de 0,1 μ g a 500 μ g, preferiblemente de 2,5 μ g a 50 μ g y lo más preferiblemente de 5 μ g a 15 μ g.
 - 8. Composición para utilizar, según la reivindicación 1 ó 3 a 7, o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en las que la preparación es un extracto vegetal, lo más preferiblemente un extracto líquido o en polvo obtenido mediante extracción.
- 9. Composición para utilizar, según la reivindicación 1 ó 3 a 8, o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende un agente adicional capaz de mejorar la salud del intestino.
 - 10. Composición para utilizar, según la reivindicación 9, o utilización, según la reivindicación 9, en las que el agente es un agente prebiótico, un agente probiótico, un lípido, un agente de carga, un medicamento, un agente antiespasmódico, un agente procinético o un agente antiinflamatorio.
 - 11. Composición para utilizar, según la reivindicación 10, o utilización, según la reivindicación 10, en las que el medicamento es un agente antiespasmódico adicional, un antidepresivo tricíclico, un antagonista de colecistoquinina-1, un agente serotonérgico, una benzodiazepina o análogo, un antagonista de neuroquinina, un agonista de guanilato ciclasa C, un activador del canal C1-C2, un bloqueador de la secreción de Cl, un análogo de GLP1, un agonista de κ-opioide, un antiácido, un fosfato de sodio, un inhibidor de la recaptación de NA, un análogo de omeprazol, glucocorticoide o un antibiótico.

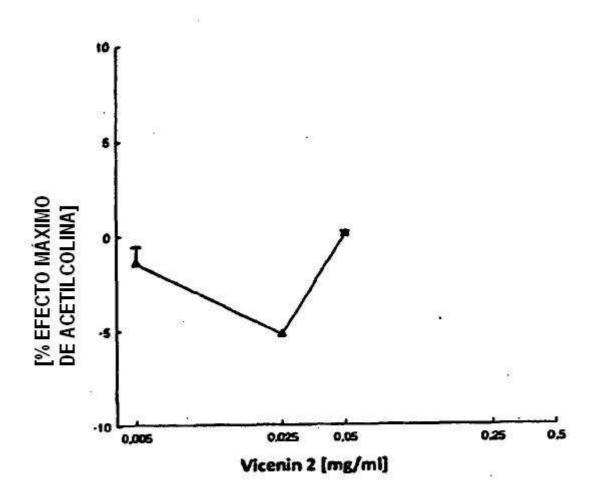


Figura 1

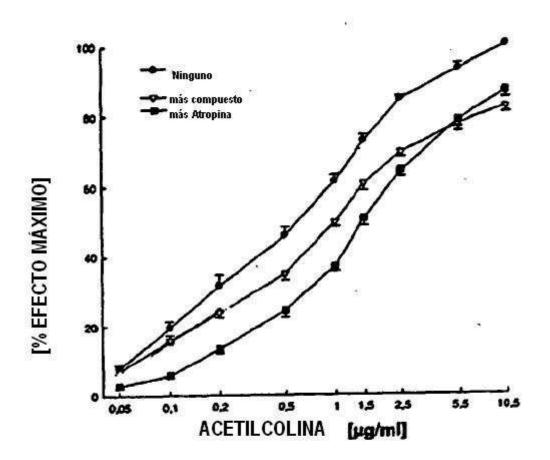


Figura 2

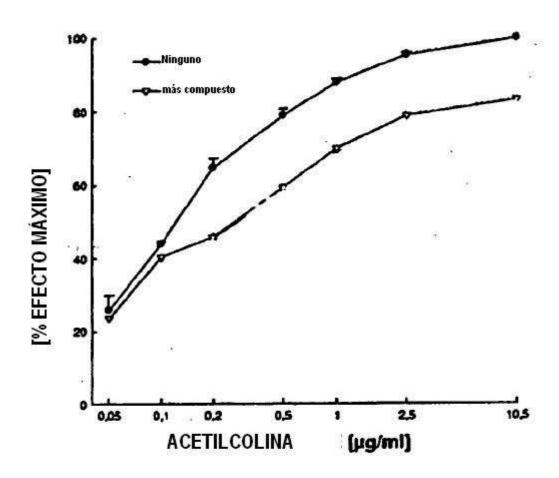


Figura 3

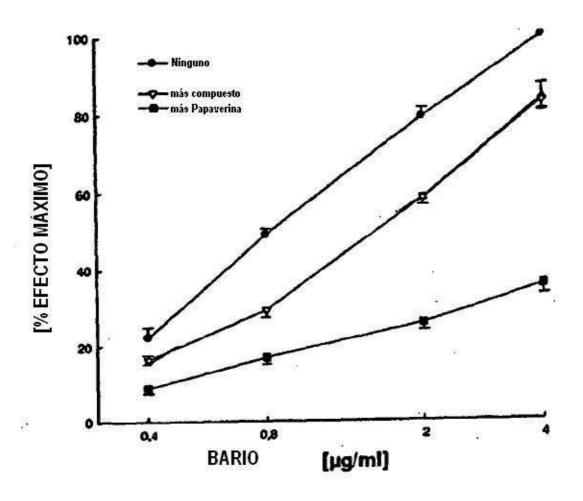


Figura 4

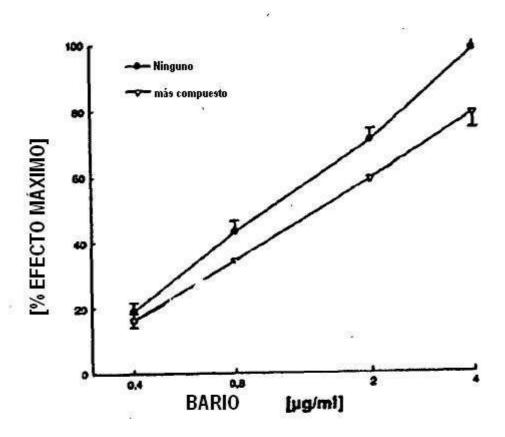


Figura 5

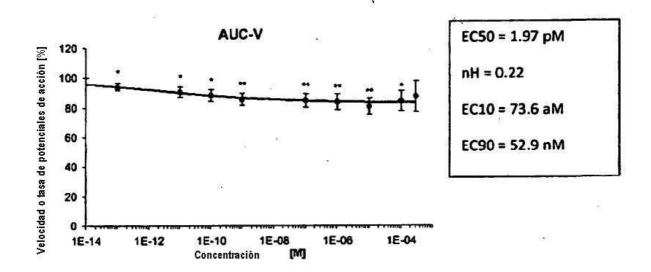


Figura 6