

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 595**

51 Int. Cl.:

C07D 311/30 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008 E 08172572 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2199289**

54 Título: **Sistema destinado al uso como un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos relacionados con el epitelio pigmentario de la retina (RPE)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2014

73 Titular/es:

**NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (100.0%)
NO. 155, SEC.2 LINUNG ST. BEITOU CHIU
TAIPEI CITY TAIWAN 112, R.O.C., TW**

72 Inventor/es:

WU, RONG TSUN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 525 595 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

Sistema destinado al uso como un medicamento para tratar y/o prevenir trastornos relacionados con el epitelio pigmentario de la retina (RPE)

5 Este invento se refiere a una sustancia destinada al uso como un medicamento para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con el epitelio pigmentario de la retina (RPE).

10 Como se ha descrito en la Patente de los EE.UU. N° 7.101.577, se sabe que la especie de Dendrobium es considerada por ser la hierba china más valiosa para tratar defectos oftálmicos. De acuerdo con nuestra experiencia adquirida de investigaciones anteriores, se deduce que la planta Herba Dendrobii (que, tradicionalmente, es el nombre generalizado para las plantas de especies de Dendrobium que tienen los efectos curativos) tiene la mayor parte los efectos biológicos. Sin embargo, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que hay una tendencia a que las plantas de Dendrobium que tienen los efectos curativos en sus tallos sean denominadas generalmente Caulis Dendrobii y a que las plantas de Dendrobium que tienen los efectos curativos en sus plantas enteras sean denominadas generalmente Herba Dendrobii.

15 Basándose en las descripciones que se presentan en la solicitud de patente mencionada, es conocido que el epitelio pigmentario de la retina (RPE) es una monocapa de células que está situada en la capa superficial de la retina, que está colocada entre la membrana de Bruch y los fotorreceptores. Puesto que el RPE puede eliminar o transmitir de una manera eficaz los materiales tóxicos y los metabolitos del revestimiento de las coroides y de la retina, él desempeña la función de una muy importante barrera entre la sangre y la retina. Además, el RPE tiene muchas funciones, tales como las de recibir luz, fagocitar a los segmentos exteriores que se han separado de las células de bastones y de las células de conos a causa de una estimulación por luz, catabolizar el fagosoma, sintetizar la matriz extracelular y la melanina, desintoxicar a la medicina, proporcionar el material esencial para reproducir los segmentos exteriores de los fotorreceptores, almacenar y transmitir a la vitamina A, sintetizar la rodospina y formar la fuerza adherente de la retina. La fagocitosis normal del RPE desempeña un cometido crítico para mantener la salud de los fotorreceptores en la retina. Una vez que haya sido reducida la función de fagocitosis, esto dará como resultado la degeneración de los fotorreceptores. Aunque el RPE morirá o se moverá a algún sitio cualquiera al aumentar su edad, el RPE envejecido todavía posee una capacidad fagocítica. Además, la cantidad perdida de las células de bastones es mayor que la de las células de conos, lo que causa las enfermedades y la degradación de la visión de las personas ancianas. Por lo tanto, el hecho de mantener la función del RPE es bastante importante para el sistema visual.

20 25 30 En el sistema inmunitario, el NO (óxido nítrico) desempeña un cometido defensivo y es tóxico para las células. En el sistema vascular sanguíneo, el NO es el denominado factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). Asimismo, en el sistema nervioso central, el NO actúa como un neurotransmisor.

35 El NO es liberado a partir del proceso de transferir L-arginina a L-citrulina mediante una sintasa de óxido nítrico (NOS). La NOS incluye tres clases de isoformas, la NOS neuronal, la NOS endotelial y la NOS inmunológica. La NOS neuronal y la NOS endotelial son unas formas constitutivas, que se denominan cNOS, cuyas actividades son reguladas por el ion de calcio (Ca^{++}) y por la calmodulina, y la concentración del NO puesto en libertad está al nivel de la nano-molaridad (nM). La NOS inmunológica es una forma inducible, denominada iNOS, cuya actividad no es regulada ni por el Ca^{++} ni por la calmodulina, y la concentración del NO puesto en libertad está al nivel de la mili-molaridad (mM). Los genes de la cNOS y de la iNOS están situados respectivamente en diferentes cromosomas.

40 En la retina, la NOS ha sido hallada en las neuronas retinianas, en el RPE, en las células amacrinas, en las células ganglionares y en las células de Müller. Se ha puesto de manifiesto que el NO desempeña un importante cometido en la fisiología y en la patología y está relacionado estrictamente con las funciones del ojo.

45 Se ha encontrado que el NO posee la capacidad de regular el flujo sanguíneo de la retina bajo una condición basal o en un entorno con isquemia. Además, se cree que el NO puede poseer la capacidad de regular los grados de daño causados a los vasos sanguíneos en la retina, en donde el daño es causado por una diabetes. Además, cuando las células gliales de la retina y el RPE se estimulan por un LPS (lipopolisacárido), por el IFN-g (interferón gamma) y por el TNF-a (factor de necrosis tumoral alfa), la NOS será expresada ampliamente, lo que aumentará en gran manera la producción del NO. En otras palabras, en unas condiciones en las que la retina está inflamada o infectada, el NO puede desempeñar un importante cometido en los mecanismos de defensa y protección.

50 Hasta ahora, no están todavía claras la posición y las características de las cNOS en un fotorreceptor. Algunas referencias describen que el cuerpo principal del fotorreceptor tiene las actividades de las cNOS y otras referencias describen que solamente los segmentos exteriores de un fotorreceptor poseen las actividades de las cNOS. El NO puesto en libertad puede regular la transmisión de la luz, el mensaje transmitido por la sinapsis neuronal y el flujo sanguíneo de la retina bajo una condición fisiológica o en un entorno con isquemia. La actividad de las iNOS puede ser hallada también en algunas células en la retina, tales como las del RPE y las células de Müller. En el cultivo de un RPE bovino, después de haber sido estimulado durante 12 horas con el IFN- γ , los LPS y el TNF- α , una masa de

NO se pondrá en libertad en por lo menos 96 horas. Los efectos de las citocinas sobre la actividad de las iNOS en el RPE son bastante complejos. En un RPE bovino, por ejemplo, es necesario que sea estimulado por los LPS y por el IFN- γ o el IFN- α para poner en libertad una masa de NO. El bFGF inhibe a las funciones de las NOS, pero el TGF- β intensifica ligeramente las funciones de las NOS. Para un RPE humano, es necesario que sea estimulado por la interleucina-1 β para poner en libertad una masa de NO. Sin embargo, los LPS no constituyen el factor necesario para estimular a un RPE humano. Por añadidura, el TGF- β inhibe evidentemente la puesta en libertad del NO en un RPE humano.

Cuando se ha infectado por bacterias, las expresiones de las iNOS pueden ser beneficiosas puesto que el NO puesto en libertad matará al microorganismo que ha invadido. Por el contrario, en algunos casos, cuando el NO puesto en libertad se presenta en cantidades excesivas, el NO puesto en libertad dará como resultado las enfermedades autoinmunitarias o el choque séptico. En 1994, se propuso la primera evidencia para explicar la relación entre el NO y la inflamación del fundus oculi (fondo de ojo), y la referencia propuso también que la uveítis resultante de las endotoxinas puede ser bloqueada por los inhibidores de la iNOS. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que el aFGF y el bFGF pueden inhibir que el RPE genere una masa de NO por tratamiento del RPE con IFN- γ y LPS. Puesto que es la expresión de las iNOS, pero no las estabilidades de las iNOS que son ARNm (ácidos ribonucleicos mensajeros), lo que se inhibe, se conjetura que el FGF protegerá al RPE de ser dañado por las endotoxinas y las citocinas. Por lo tanto, se puede observar que las iNOS también desempeñan un cometido en la regulación de la inmunidad de la retina.

Las enfermedades habituales de la retina incluyen la retinopatía diabética proliferativa causada por la diabetes, la vitreorretinopatía proliferativa y la degeneración macular relacionada con la edad. Sin embargo, las enfermedades de la retina son las enfermedades más difíciles de curar en los defectos oftálmicos. La hiperglucemia acelera la glicosilación, que forma los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs acrónimo de advanced glycation end products), y se cree que los AGEs se relacionan estrechamente con una complicación vascular o con una complicación neuronal. Una base de Schiff inestable se forma a través de una reacción no enzimática entre un grupo de aldehído o un grupo de cetona del azúcar reductor y los aminoácidos primarios de la proteína. Entonces se forma un producto de Amadori a partir de la base de Schiff pasando por la transposición de Amadori. Asimismo, un producto final de la glicosilación avanzada (AGE) se formará a partir del producto de Amadori pasando por el proceso de transposición. Es conocido que la glicosilación no enzimática no es una reacción reversible y usualmente se presenta en una proteína que tiene una larga vida de semidescomposición. Mientras que la formación de los AGE da como resultado una reticulación, una molécula de proteína podría tener una resistencia a las proteasas. Por lo tanto, una acumulación de los AGE podría ser una señal de envejecimiento. Al aumentar la edad, aumentarán gradualmente las cantidades de los AGE en las neuronas piramidales del cerebro, de la membrana de Bruch y del colágeno. La velocidad de reacción de la glicosilación no enzimática constituye una reacción primaria y esta velocidad de reacción es dependiente de las concentraciones de los azúcares reductores y de las proteínas. Usualmente, un paciente diabético tiene una concentración de glucosa en sangre más alta que las personas normales, de manera tal que aumentará la situación de glicosilación. Es sabido que los pacientes diabéticos tienen unas probabilidades de sufrir algunas enfermedades o algunos síntomas que son más altas que en las personas normales y se relacionan en su totalidad con los AGE, en donde la enfermedad o los síntomas incluyen la aterosclerosis, un perjuicio de los riñones, un daño vascular, una enfermedad neuronal, una retinopatía y una apoplejía. La razón principal para la aglomeración de los eritrocitos, que es un resultado de la diabetes, es que la estructura terciaria de la albúmina es cambiada después de haber sido glicosilada, de manera tal que la albúmina glicosilada pierde las funciones de antagonizar una aglomeración. Además, la razón de cambiar la permeabilidad de los glomérulos es la glicosilación de la albúmina pero no la glicosilación de la membrana de base glomerular. Además, la proteína glicosilada tiene una mejor capacidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica (entre la sangre y el cerebro).

Los AGE pueden combinarse con algunos receptores en la superficie celular o con algunas proteínas. Los receptores conocidos incluyen los receptores escobas del tipo I, los receptores escobas del tipo II, los receptores para AGE (RAGE), el OST-48 (AGE-R1), la fosfoproteína 80K-H (AGE-R2), y la galectina-3 (AGE-R3).

Junto a esto los RAGEs pueden ser hallados en las superficies de los monocitos, los macrófagos, las células endoteliales y las células gliales. Cuando una célula es activada por los AGE, aumentarán las expresiones de la proteína de matriz extracelular, de las moléculas de adhesión vascular y de los factores de crecimiento. Dependiendo de los diferentes tipos de células y de las señales transmitidas, aparecerán acompañando a la situación anterior algunos fenómenos, tales como la quimiotaxis, la angiogénesis, el estrés oxidativo, la proliferación celular y la muerte celular programada. Se pone de manifiesto que las diversas células presentes en el cerebro humano son capaces de expresar diferentes RAGEs, que eliminan a los AGE. Cuando se ha perdido la capacidad de eliminación, los AGE se acumularán fuera de las células, lo cual inducirá una reacción de inflamación del sistema nervioso central. Además, los AGE inducirán las expresiones tanto del factor de crecimiento endotelial vascular de la retina del RPE como del PDGF- β . Los AGE desempeñan un importante cometido en el proceso de envejecimiento, de manera tal que es muy importante diseñar un modelo patológico con la albúmina glicosilada para desarrollar una nueva medicina.

5 El factor de crecimiento más importante en el hígado es el factor de crecimiento de hepatocitos/factor de
 10 diseminación (HGF/SF) que se forma combinando la cadena pesada de 60 KDa (cadena α) con la cadena ligera de
 30 KDa (cadena β) mediante unos enlaces de disulfuro. El HGF/SF formado de nuevas es el prepro HGF/SF, que
 necesita ser modificado por una enzima para formar la forma heterodímera antes de que presente una actividad
 biológica. El HGF es un factor de crecimiento de funciones múltiples, que no solamente tiene la capacidad de
 regular el crecimiento de las diversas células sino que también desempeña un importante cometido en la reparación
 de los tejidos y en la regeneración de los órganos. La distribución interna del HGF es muy extensa, en donde el
 hígado tiene la más alta cantidad del HGF. Además, el HGF puede ser hallado en el páncreas, en el timo, en la
 sangre, en los intestinos delgados, en la placenta y así sucesivamente. Además, el HGF/SF o los receptores de
 HGF/SF son encontrados en las secreciones oculares y en los tejidos oculares, tales como las lágrimas, las
 glándulas lagrimales y la córnea, de manera tal que se conjetura que el HGF puede desempeñar un cometido en la
 regulación de los ojos. Además de esto, es conocido que el RPE tiene tanto el HGF como un receptor de HGF (c-
 Met). Puesto que la fosforilación de la tirosina por el c-Met expresa en todo momento, el HGF puede ser un factor de
 crecimiento con la función de autoestimulación para el RPE. Además el HGF puede estar relacionado con el
 desarrollo de la retina, de la curación de heridas y de los vasos retinianos de los recién nacidos.

20 A partir de lo que antecede es conocido que el RPE desempeña un importante cometido en los mecanismos de
 regulación de la retina. Mientras tanto, se ha probado que la hierba china, especie de *Dendrobium* es capaz de
 intensificar o inhibir algunas funciones o algunos mecanismos de regulación en el RPE. Más específicamente, la
 especie de *Dendrobium* puede aumentar las expresiones de fagocitosis del RPE, la formación de NO por el RPE,
 las expresiones de genes del factor de crecimiento de hepatocitos del hígado en el RPE. La especie de *Dendrobium*
 puede inhibir las expresiones de genes del bFGF, del VEGF y del TGF- β en el RPE bajo una condición normal y en
 un entorno con isquemia. Consiguientemente, las investigaciones relevantes acerca de factores de intensificación
 de las actividades del RPE son importantes para mejorar la salud del cuerpo. En las investigaciones precedentes,
 se ha conocido que el extracto procedente de *Herba Dendrobii* tiene el efecto de acelerar una fagocitosis del RPE y
 aumentar la degradación de los AGE. Con el fin de controlar aún más el efecto de acelerar una fagocitosis del RPE,
 se desea una comprensión adicional acerca del extracto procedente de *Herba Dendrobii*.

30 En un aspecto, el presente invento proporciona una sustancia destinada a usarse como un medicamento para tratar
 y/o prevenir un trastorno relacionado con el epitelio pigmentario de la retina (RPE), seleccionándose la sustancia
 entre el conjunto que consiste en el 6,8-di-C- α -L-arabinopiranosido de apigenina y el 6-C- β -D-xilopiranosil-8-C- α -L-
 arabinopiranosido de apigenina.

35 De manera preferible, la sustancia tiene el efecto de acelerar una fagocitosis de una célula del epitelio pigmentario
 de la retina (RPE).

40 De manera preferible, el trastorno relacionado con las células del RPE es uno que se selecciona entre un conjunto
 que se compone de una degeneración del RPE, una degeneración macular relacionada con la edad, una
 degeneración de los fotorreceptores, una diabetes, una arterioesclerosis, un daño vascular, una neuropatía de la
 retina, una disfunción celular amacrina, una degeneración de las células ganglionares de la retina, una disfunción de
 células de Müller, una uveítis, una neovascularización coroidal, una retinopatía proliferativa, una retinitis, un
 trastorno de la membrana de Bruch y una complicación de éstos.

45 De acuerdo con otro aspecto del presente invento, se proporciona una composición que incluye una sustancia que
 está seleccionada entre el conjunto que se compone del 6,8-di-C- α -L-arabinopiranosido de apigenina y del 6-C- β -D-
 xilopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosido de apigenina.

De manera preferible, la composición incluye un vehículo aceptable fisiológicamente para transportar a la sustancia.

50 De manera preferible, el vehículo aceptable fisiológicamente es un vehículo farmacéutico.

De manera preferible, la composición es una composición activa fisiológicamente.

De manera preferible, la composición activa fisiológicamente es una composición farmacéutica.

55 De manera preferible, la composición tiene el efecto de acelerar una fagocitosis de una célula del RPE.

De manera preferible, la composición se usa en el tratamiento y/o en la prevención de un trastorno relacionado con
 células de RPE.

60 Los objetos y las ventajas anteriores del presente invento resultarán evidentes con más facilidad para los que
 poseen una experiencia ordinaria en la especialidad después de haber revisado las siguientes descripciones
 detalladas y los dibujos anejos, en los que:

La Fig. 1 es un diagrama de flujos del protocolo de separación para un extracto de Herba Dendrobii de acuerdo con una preferida forma de realización del presente invento;

La Fig. 2 es una cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3;

La Fig. 3 es una cromatografía HPLC de DCMPbL6,7D2H2H3;

5 La Fig. 4 es una cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H2;

La Fig. 5 es otra cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H2;

La Fig. 6 es una cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H3;

La Fig. 7 es un espectro de UV de la solución en metanol de DCMPbL6,7D2H2H3H4;

La Fig. 8 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3 sobre la fagocitosis total del RPE;

10 La Fig. 9 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE;

La Fig. 10 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H2 sobre la fagocitosis total del RPE;

15 La Fig. 11 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H2 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE;

La Fig. 12 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H3 sobre la fagocitosis total del RPE;

La Fig. 13 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H3 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE;

20 La Fig. 14 es un diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H4 sobre la fagocitosis total del RPE; y

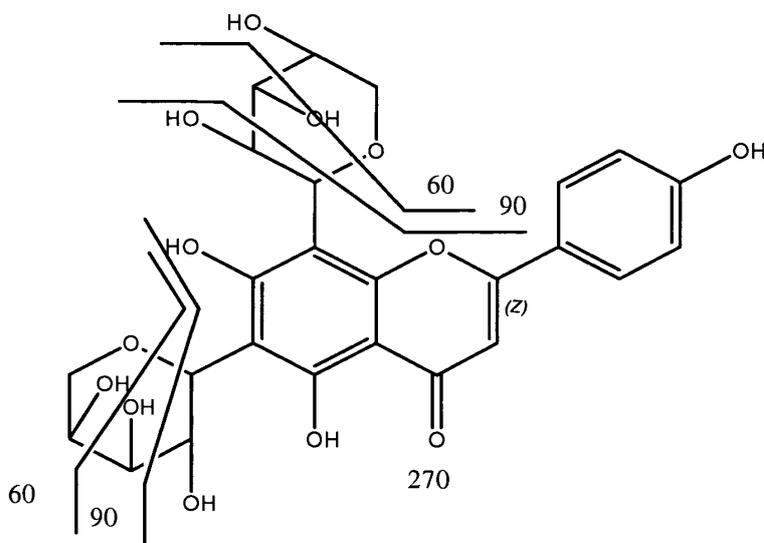
La Fig. 15 es el diagrama de barras que ilustra los efectos de DCMPbL6,7D2H2H3H4 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE.

25 El presente invento será descrito ahora más específicamente haciendo referencia a las siguientes formas de realización. Ha de hacerse observar que las siguientes descripciones de las formas preferidas de realización de esta solicitud se presentan aquí solamente con finalidades de ilustración y de descripción y no se pretende que ellas sean exhaustivas o estén limitadas a la forma precisa que se describe.

30 Preparación del extracto de Herba Dendrobii y separación del contenido activo purificado de éste.

Hágase referencia por favor a la Fig. 1. La Fig. 1 es un diagrama de flujos del protocolo de separación para un extracto de Herba Dendrobii de acuerdo con una preferida forma de realización del presente invento. Tres componentes activos se separan a partir de Herba Dendrobii. 1,9 kg de Herba Dendrobii se extraen tres veces mediante metanol para obtener el extracto con metanol de Herba Dendrobii. Luego el extracto con metanol de Herba Dendrobii se reconcentra y se seca completamente para formar el patrón con DCM. El patrón con DCM se disuelve en 2 l de EtOAc y luego se reparte con 2 l de agua para obtener una capa de EtOAc y una primera capa de agua. La capa de agua se extrae con 2 l de EtOAc dos veces más. Todas las capas de EtOAc se recogen, se reconcentran y se secan completamente para obtener el extracto con EtOAc. El extracto con EtOAc seco se reparte respectivamente tres veces con 4 l de hexano y 2 l de metanol para obtener una capa de hexano y una capa de metanol. Después de haber sido reconcentradas y secadas, la capa de hexano y la capa de metanol secadas son denominadas como patrón con DCMPe/h (Pe/h) y patrón con DCMPe/m (Pe/m) respectivamente. Además, la primera capa de agua se ajusta a un volumen de 2 l por adición de agua desionizada, y luego se reparte por adición de 2 l de butanol para obtener una capa de butanol y una segunda capa de agua. Después de haber sido reconcentradas y secadas, la capa de butanol y la segunda capa de agua secadas son denominadas como patrón con DCMPb (Pb) y patrón con DCMPw (Pw) respectivamente. El Pb se extrae por cromatografía en gel de LH20 con una columna de moléculas (2,5 x 10⁷ cm, fase móvil < metanol : H₂O = 50 : 50 >). Después del escrutinio de la actividad, se obtienen las muestras de DCMPbL6,7. Luego, las muestras de DCMPbL6,7 se extraen por cromatografía en Diaion SP-20 SS con y una columna de absorción (1 x 30 cm). Cuando la fase móvil es

- isopropanol : H₂O = 20 : 80, se puede obtener el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2. Cuando la fase móvil es isopropanol : H₂O = 30 : 70, se puede obtener el material eluido denominado como DCMPbL6,7D3. Cuando la fase móvil es isopropanol : H₂O = 40 : 60, se puede obtener el material eluido denominado como DCMPbL6,7D4. Luego, el DCMPbL6,7D2 se cromatografía mediante una columna C18 para HPLC de fase inversa (10 x 300 mm) con la fase móvil de metanol : H₂O : ácido acético = 35 : 65 : 1, y se obtiene el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2H2.
- 5 Basándose en nuestras investigaciones precedentes, se ha conocido que el DCMPbL6,7D2H2 tiene el efecto de acelerar una fagocitosis del RPE y aumentar la degradación de los AGE. Con el fin de comprender adicionalmente el efecto de acelerar la fagocitosis del RPE, se realizan algunas operaciones adicionales.
- 10 El DCMPbL6,7D2H2 se cromatografía mediante una columna C18 para HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento) de fase inversa (10 x 300 mm) con la fase móvil de metanol : H₂O : ácido acético = 40 : 60 : 1, y se obtiene el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2H2H3. Luego, el DCMPbL6,7D2H2H3 se cromatografía adicionalmente mediante una columna C18 para HPLC de fase inversa (4.6 x 250 mm) con la fase móvil de metanol : H₂O = 35 : 65, y se obtiene el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2H2H3H2. Además, el
- 15 DCMPbL6,7D2H2H3 se cromatografía también mediante una columna C18 para HPLC de fase inversa (4.6 x 250 mm) con la fase móvil de metanol : H₂O = 40 : 60, y se obtiene el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2H2H3H3. Por lo demás, el DCMPbL6,7D2H2H3 se cromatografía también mediante una columna C18 para HPLC de fase inversa (4.6 x 250 mm) con la fase móvil de metanol : H₂O = 45 : 55, y se obtiene el material eluido denominado como DCMPbL6,7D2H2H3H4.
- 20 Hágase referencia por favor a la Fig. 2, que es una cromatografía LC-MS (cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas) de DCMPbL6,7D2H2H3. Las condiciones de análisis para la Fig. 2 son: columna: Mightysil RP-C18 (4,6 * 250 mm), 5 µm; fase móvil: 0~80 min MeOH / H₂O = 20 / 80 gradiente hasta 100 % de MeOH, 80~100 min 100 % de MeOH; volumen inyectado: 50 µl; peso inyectado: 5 µg; velocidad de flujo: 0,25 ml/min y UV: 337 nm.
- 25 Hágase referencia por favor a la Fig. 3, que es una cromatografía HPLC de DCMPbL6,7D2H2H3. Las condiciones de análisis para la Fig. 3 son: columna: Mightysil RP-C18 (4,6 * 250 mm), 5 µm; fase móvil: 0~40 min MeOH / H₂O = 35 / 65, 40~45 min MeOH / H₂O = 35 / 65 gradiente hasta 100 % de MeOH, 45~60 min 100 % de MeOH; volumen inyectado: 250 µl; peso inyectado: 250 µg; velocidad de flujo: 0,8 ml/min y UV: 280, 312, 337 nm. H2 representa al DCMPbL6,7D2H2H3H2, H3 representa al DCMPbL6,7D2H2H3H3 y H4 representa al DCMPbL6,7D2H2H3H4.
- 30 Hágase referencia por favor a la Fig. 4, que es una cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H2. Las condiciones de análisis para la Fig. 4 son: columna: Mightysil RP-C18 (4,6 * 250 mm), 5 µm; fase móvil: 0~80 min MeOH / H₂O = 20 / 80 gradiente hasta 100 % de MeOH, 80~100 min 100 % de MeOH; volumen inyectado: 100 µl; peso inyectado: 5 µg; velocidad de flujo: 0,8 ml/min; UV: 220 nm y condición de MS: modo APCI+.
- 35 Hágase referencia por favor a la Fig. 5, que es otra cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H2. Las condiciones de análisis para la Fig. 5 son: columna: Mightysil RP-C18 (4,6 * 250 mm), 5 µm; fase móvil: 0~80 min MeOH / H₂O = 20 / 80 gradiente hasta 100 % de MeOH, 80~100 min 100 % de MeOH; volumen inyectado: 100 µl; peso inyectado: 5 µg; velocidad de flujo: 0,8 ml/min; UV: 220 nm y condición de MS: modo APCI-.
- 40 Hágase referencia por favor a la Fig. 6, que es una cromatografía LC-MS de DCMPbL6,7D2H2H3H3. Las condiciones de análisis para la Fig. 6 son: columna Mightysil RP-C18 (4,6 * 250 mm), 5 µm; fase móvil: 0~80 min MeOH / H₂O = 20 / 80 gradiente hasta 100 % de MeOH, 80~100 min 100 % de MeOH; volumen inyectado: 100 µl; peso inyectado: 5 µg; velocidad de flujo: 0,8 ml/min; UV: 220 nm y condición de MS: modo APCI+
- Hágase referencia por favor a la Fig. 7, que es un espectro de UV de la solución en metanol de DCMPbL6,7D2H2H3H4 (50 µg/ml). Como se muestra en la Fig. 7, el DCMPbL6,7D2H2H3H4 tiene unas bandas características: I a λ • = 334 nm, y banda II at λ • • = 275 nm, lo que conduce a la conclusión de que el compuesto pertenece al grupo de los flavonoides.
- 45 Basándose en lo que antes se ha mencionado, se encuentra que el peso molecular del DCMPbL6,7D2H2H3 es de aproximadamente 534 y que podría ser un compuesto seleccionado entre el conjunto que se compone del 6,8-di-C-α-L-arabinopiranosido de apigenina, del 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranosido de apigenina, del 6-C-α-L-arabinopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosido de apigenina y de una mezcla de éstos. La estructura del 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranosido de apigenina se muestra a continuación:
- 50



P.M. (peso molecular) = 534

Por lo demás, los análisis de IR (infrarrojos) del DCMPbL6,7D2H2H3 (que no se muestran en el presente texto) muestran que las características estructurales del DCMPbL6,7D2H2H3 coinciden con las de los 6,8-di-C-glicósidos de apigenina.

Por lo demás, después de haberseles añadido algunos agentes (AlCl_3 , NaOAc , $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) los DCMPbL6,7D2H2H3H2, DCMPbL6,7D2H2H3H3, DCMPbL6,7D2H2H3H2 y DCMPbL6,7D2H2H3H4 se prosiguen con los análisis de UV (ultravioletas). Los resultados de los UV muestran que las características estructurales de los DCMPbL6,7D2H2H3H2, DCMPbL6,7D2H2H3H3, DCMPbL6,7D2H2H3H2 y DCMPbL6,7D2H2H3H4 coinciden con las de los flavonoides (en donde hay grupos hidroxilo en las posiciones C-5 y C-7, pero no hay ningún grupo hidroxilo en la posición C-3).

Por lo demás, después de haberse proseguido con los análisis de RMN (resonancia magnética nuclear), los espectros de H-RMN y C-RMN de los DCMPbL6,7D2H2H3, DCMPbL6,7D2H2H3H2, DCMPbL6,7D2H2H3H3 y DCMPbL6,7D2H2H3H4 muestran que las características estructurales de los mismos coinciden con las de los 6,8-di-C-glicósidos de apigenina.

Hágase referencia por favor a la Fig. 8, que es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3 sobre la fagocitosis total del RPE. Como se muestra en la Fig. 8, se sabe que diversas concentraciones (0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) del DCMPbL6,7D2H2H3 pueden acelerar a la fagocitosis del RPE. Los contenidos experimentales relevantes se describen simplemente como sigue. Se siembran en una microplaca de 96 pocillos 1×10^4 células RPE por cada pocillo, que contiene 5 % de FCS en DMEM después de 48 horas, y el medio se cambia por 2 % de FCS en DMEM. Luego se añaden respectivamente diferentes concentraciones del DCMPbL6,7D2H2H3. Después de 24 horas, se añaden a cada pocillo 50 μl de 2×10^7 de FITC-ROS/ml. Cuatro horas más tarde, el FITC-ROS no fijado se separa por lavado con PBS + 2 % de sucrosa. La longitud de onda de emisión es de 485 nm y la longitud de onda de detección es de 530 nm. La intensidad de fluorescencia se detecta por medio de un sistema de medición con un contador 1420 Multilable (PE). La intensidad de fluorescencia detectada representa la fagocitosis total. Si se añade el tinte fluoro Quench, la intensidad de fluorescencia detectada representa la fagocitosis con ingestión. Se obtienen los valores de * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$ y **** $P < 0,001$ por comparación con una fagocitosis de un RPE tratado con 2 % de FCS. Además, la Fig. 9 es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE.

Hágase referencia por favor a la Fig. 10, que es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H2 sobre la fagocitosis total del RPE. Como se muestra en la Fig. 10, se sabe que diversas concentraciones (0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) del DCMPbL6,7D2H2H3H2 pueden acelerar la fagocitosis del RPE. Los contenidos experimentales relevantes se describen simplemente como sigue. Se siembran en una microplaca de 96 pocillos 1×10^4 células RPE por cada pocillo, que contiene 5 % de FCS en DMEM después de 48 horas, y el medio se cambia por 2 % de FCS en DMEM. Luego se añaden respectivamente diferentes concentraciones del DCMPbL6,7D2H2H3H2. Después de 24 horas, se añaden a cada pocillo 50 μl de 2×10^7 de FITC-ROS/ml. Cuatro horas más tarde, el FITC-ROS no fijado se separa por lavado con PBS + 2 % de sucrosa. La longitud de onda de emisión es de 485 nm y la longitud de onda de detección es de 530 nm. La intensidad de fluorescencia se detecta por medio de un sistema de medición con un contador 1420 Multilable (PE). La intensidad de fluorescencia

detectada representa la fagocitosis total. Si se añade el tinte fluoro Quench, la intensidad de fluorescencia detectada representa la fagocitosis con ingestión. Se obtienen los valores de * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$ y **** $P < 0,001$ por comparación con una fagocitosis de un RPE tratado con 2 % de FCS. Además, la Fig. 11 es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H2 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE.

5 Hágase referencia por favor a la Fig. 12, que es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H3 sobre la fagocitosis total del RPE. Como se muestra en la Fig. 12, se sabe que diversas
 10 concentraciones (0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) del DCMPbL6,7D2H2H3H3 pueden acelerar la fagocitosis del RPE. Los contenidos experimentales relevantes se describen simplemente como sigue. Se siembran en una microplaca de 96 pocillos 1×10^4 células RPE por cada pocillo, que contiene 5 % de FCS en DMEM después de 48 horas, y el medio
 15 se cambia por 2 % de FCS en DMEM. Luego se añaden respectivamente diferentes concentraciones del DCMPbL6,7D2H2H3H3. Después de 24 horas, se añaden a cada pocillo 50 μl de 2×10^7 de FITC-ROS/ml. Cuatro horas más tarde, el FITC-ROS no fijado se separa por lavado con PBS + 2 % de sucrosa. La longitud de onda de emisión es de 485 nm y la longitud de onda de detección es de 530 nm. La intensidad de fluorescencia se detecta por medio de un sistema de medición con un contador 1420 Multilable (PE). La intensidad de fluorescencia detectada representa la fagocitosis total. Si se añade el tinte fluoro Quench, la intensidad de fluorescencia detectada
 20 representa la fagocitosis con ingestión. Se obtienen los valores de * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$ y **** $P < 0,001$ por comparación con una fagocitosis de un RPE tratado con 2 % de FCS. Además, la Fig. 13 es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H3 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE.

Hágase referencia por favor a la Fig. 14, que es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H4 sobre la fagocitosis total del RPE. Como se muestra en la Fig. 14, se sabe que diversas
 20 concentraciones (0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) de DCMPbL6,7D2H2H3H4 pueden acelerar la fagocitosis del RPE. Los contenidos experimentales relevantes se describen simplemente como sigue. Se siembran en una microplaca de 96 pocillos 1×10^4 células RPE por cada pocillo, que contiene 5 % de FCS en DMEM después de 48 horas, y el medio se cambia por 2 % de FCS en DMEM. Luego se añaden respectivamente diferentes concentraciones del DCMPbL6,7D2H2H3H4. Después de 24 horas, se añaden a cada pocillo 50 μl de 2×10^7 de FITC-ROS/ml. Cuatro
 25 horas más tarde, el FITC-ROS no fijado se separa por lavado con PBS + 2 % de sucrosa. La longitud de onda de emisión es de 485 nm y la longitud de onda de detección es de 530 nm. La intensidad de fluorescencia se detecta por medio de un sistema de medición con un contador 1420 Multilable (PE). La intensidad de fluorescencia detectada representa la fagocitosis total. Si se añade el tinte fluoro Quench, la intensidad de fluorescencia detectada
 30 representa la fagocitosis con ingestión. Se obtienen los valores de * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$ y **** $P < 0,001$ por comparación con una fagocitosis de un RPE tratado con 2 % de FCS. Además, la Fig. 15 es un diagrama de barras que ilustra los efectos del DCMPbL6,7D2H2H3H4 sobre la fagocitosis con ingestión del RPE.

Basándose en las Figs. 2 - 7, parece ser que los DCMPbL6,7D2H2H3, DCMPbL6,7D2H2H3H2, DCMPbL6,7D2H2H3H3 y DCMPbL6,7D2H2H3H4 podrían ser unos 6,8-di-C-glicósidos de apigenina o unos
 35 derivados de los mismos.

Por lo demás, basándose en las Figs. 8 - 15, se sabe que los DCMPbL6,7D2H2H3, DCMPbL6,7D2H2H3H2, DCMPbL6,7D2H2H3H3 y DCMPbL6,7D2H2H3H4 podrían acelerar la fagocitosis del RPE. Como se ha mencionado más arriba, se comprueba que la sustancia con la mencionada estructura podría acelerar la fagocitosis del RPE.

Por lo demás, basándose en las referencias anteriores, se comprueba que una composición que incluye una
 40 sustancia capaz de acelerar la fagocitosis del RPE podría tener unos efectos sobre al menos un trastorno seleccionado entre los conjuntos que se componen de una degeneración del RPE, una degeneración macular relacionada con la edad, una degeneración de fotorreceptores, una diabetes, una arterioesclerosis, un daño vascular, una neuropatía de la retina, una disfunción de células amacrinas, una degeneración de células ganglionares de la retina, una disfunción de células de Müller, una uveítis, una neovascularización coroidal, una
 45 retinopatía proliferativa, una retinitis, un trastorno de la membrana de Bruch y una complicación de éstos. Los trastornos mencionados podrían denominarse de manera generalizada como trastornos relacionados con las células del RPE.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sustancia destinada a su uso como un medicamento para tratar y/ prevenir un trastorno relacionado con el epitelio pigmentario de la retina (RPE), estando seleccionada la sustancia entre el conjunto que se compone del 6,8-di-C- α -L-arabinopiranosido de apigenina y del 6-C- β -D-xilopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosido de apigenina.
2. La sustancia para el uso de la reivindicación 1, que es aislada a partir de Herba Dendrobii.
- 10 3. La sustancia para el uso de la reivindicación 1, en la que el trastorno relacionado con el RPE es uno que se selecciona entre un conjunto que se compone de una degeneración del RPE, una degeneración macular relacionada con la edad, una degeneración de fotorreceptores, una diabetes, una arteriosclerosis, un daño vascular, una neuropatía de la retina, una disfunción de células amacrinadas, una degeneración de células ganglionares de la retina, una disfunción de células de Müller, una uveítis, una neovascularización coroidal, una retinopatía proliferativa, una retinitis, un trastorno de membranas de Bruch y una complicación de éstos.
- 15 4. La sustancia para el uso de la reivindicación 1, que es eficaz para aumentar la capacidad fagocítica del RPE.

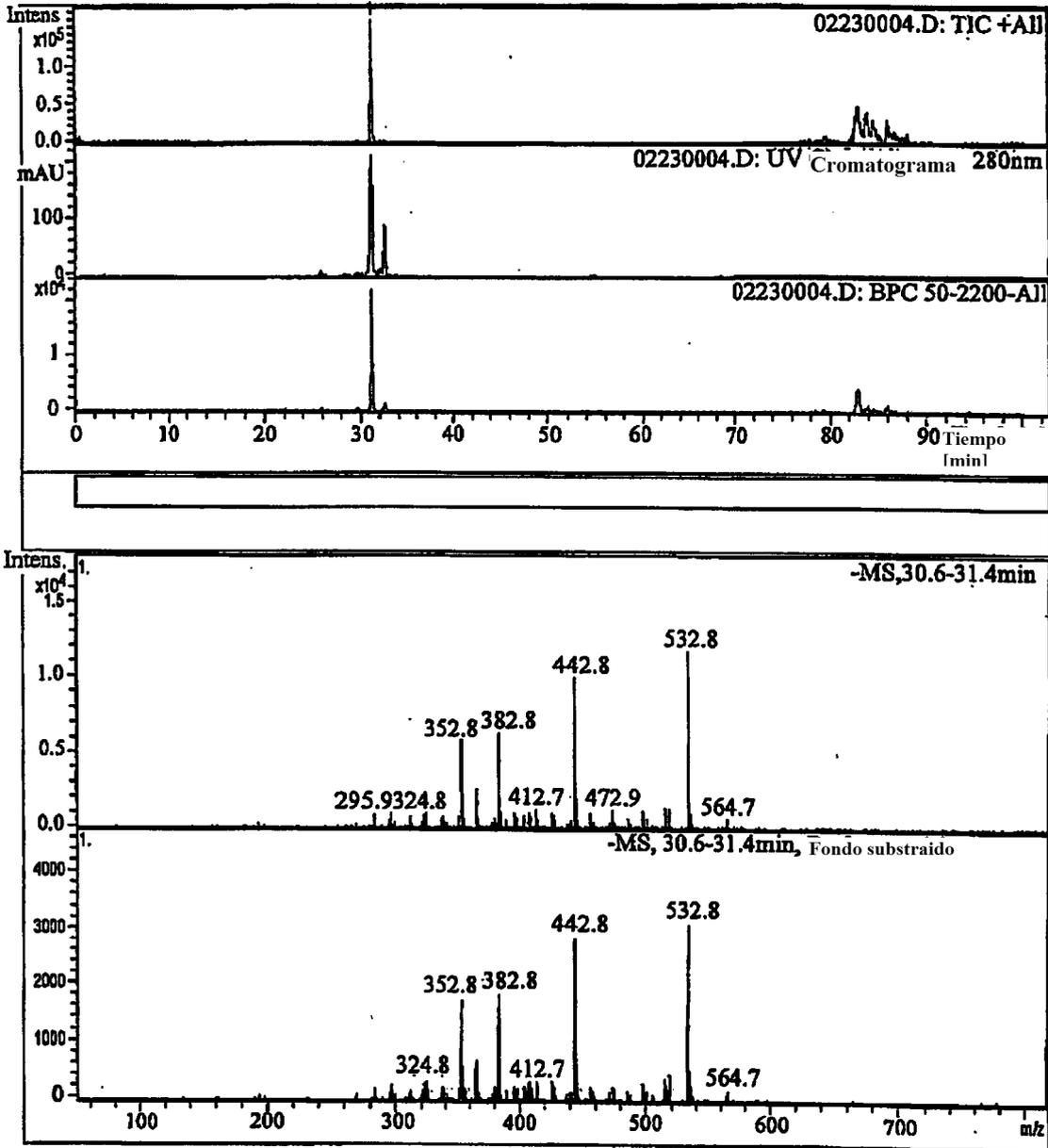


Fig. 2

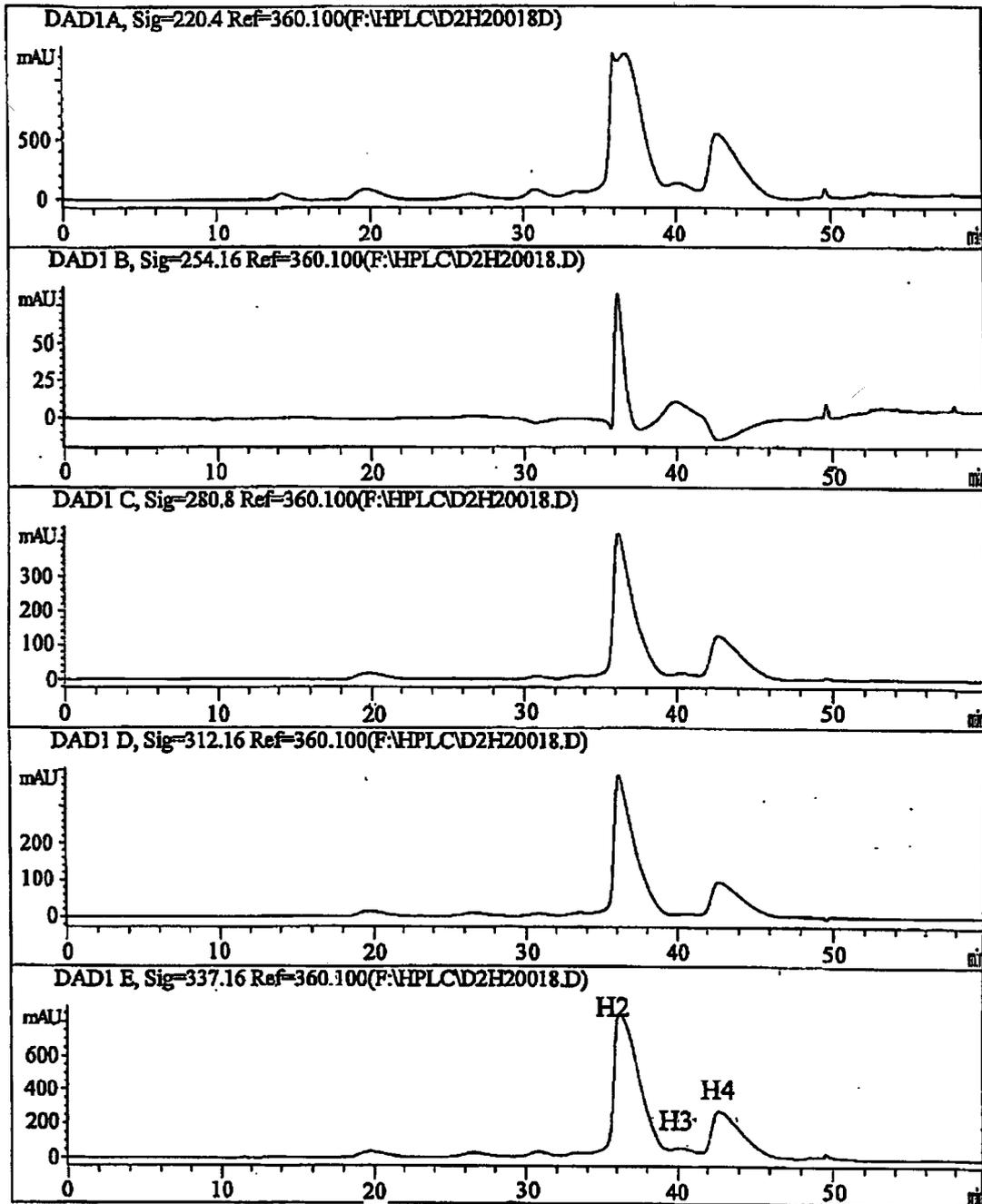


Fig 3

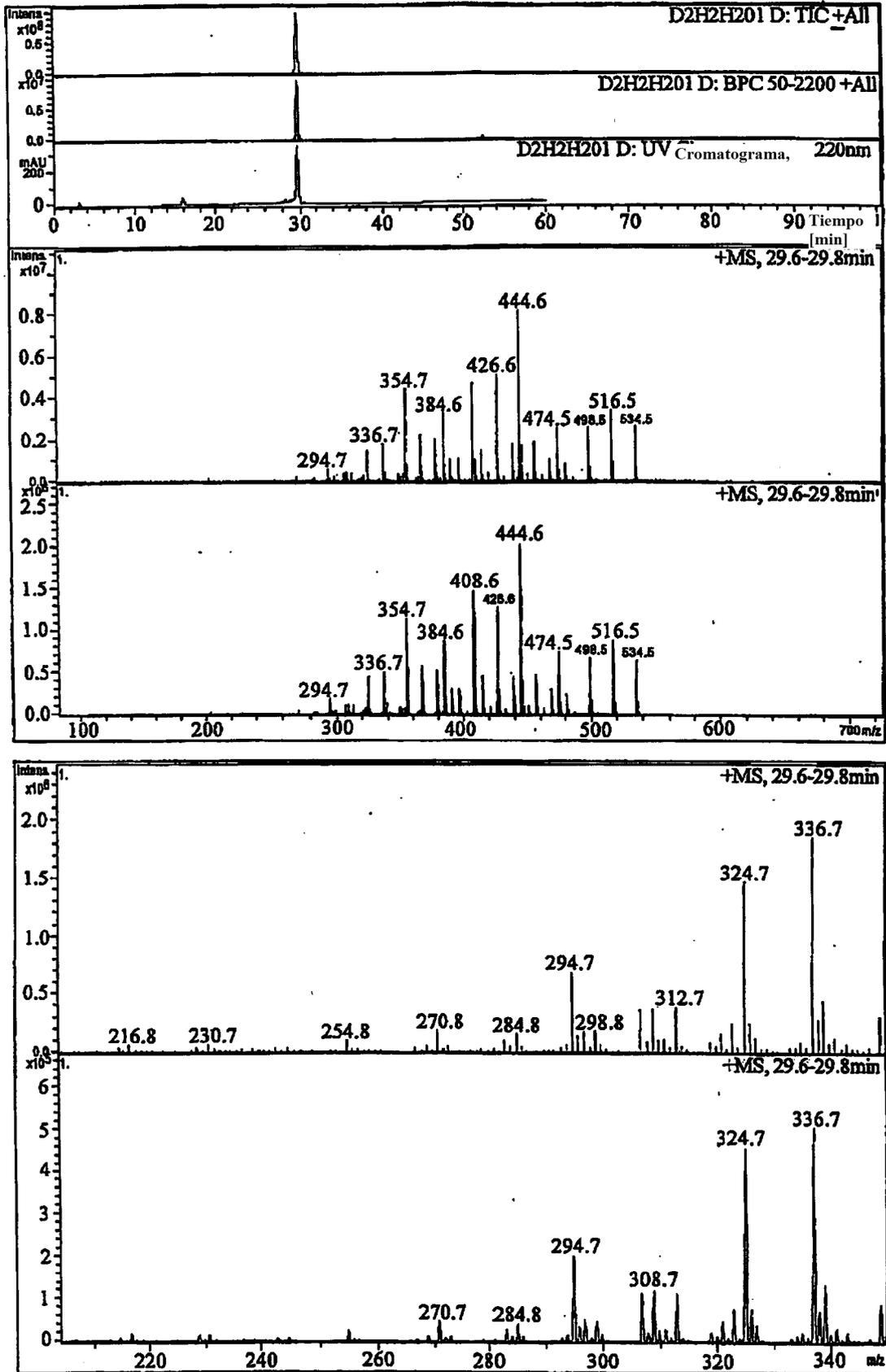


Fig. 4

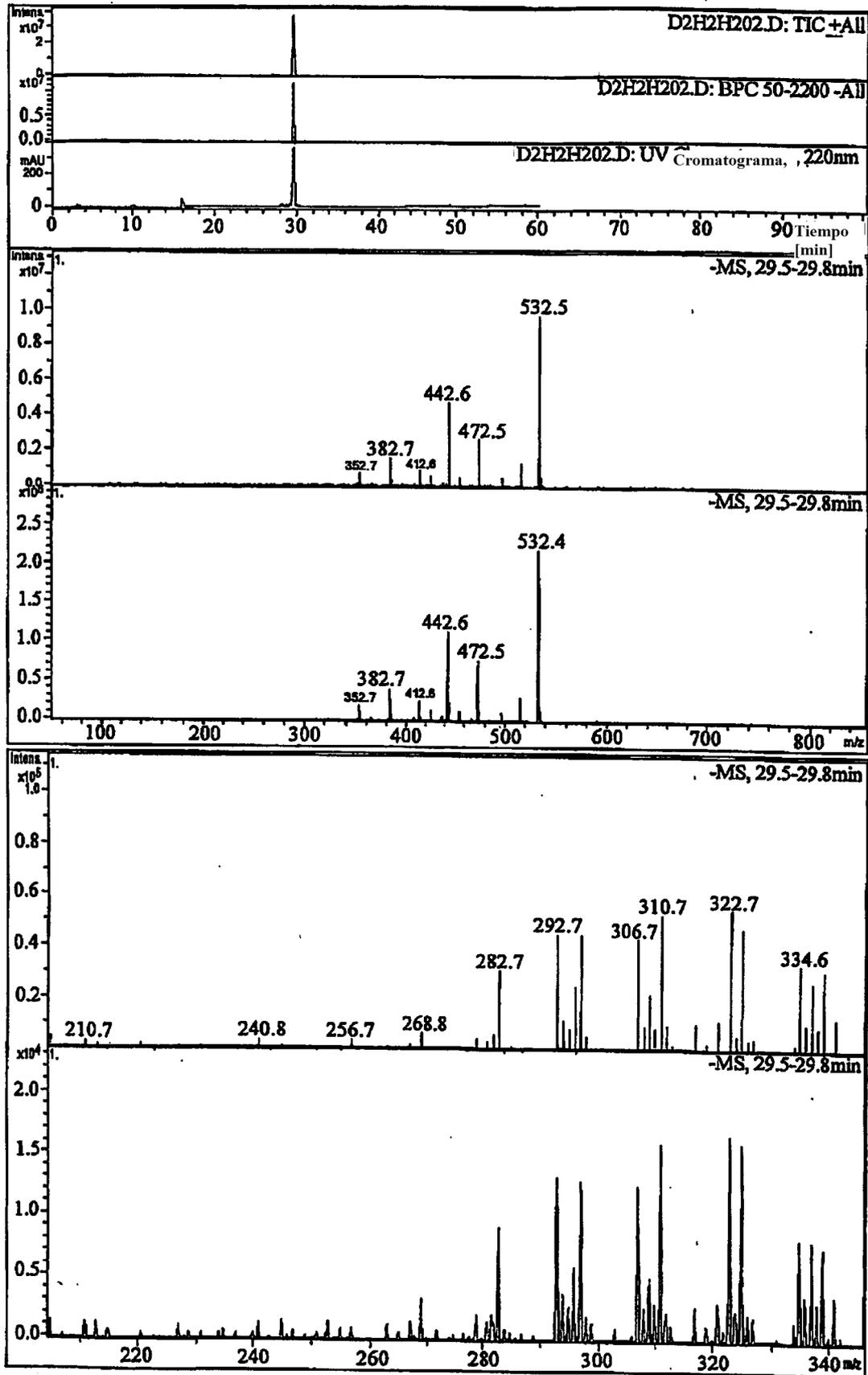


Fig. 5

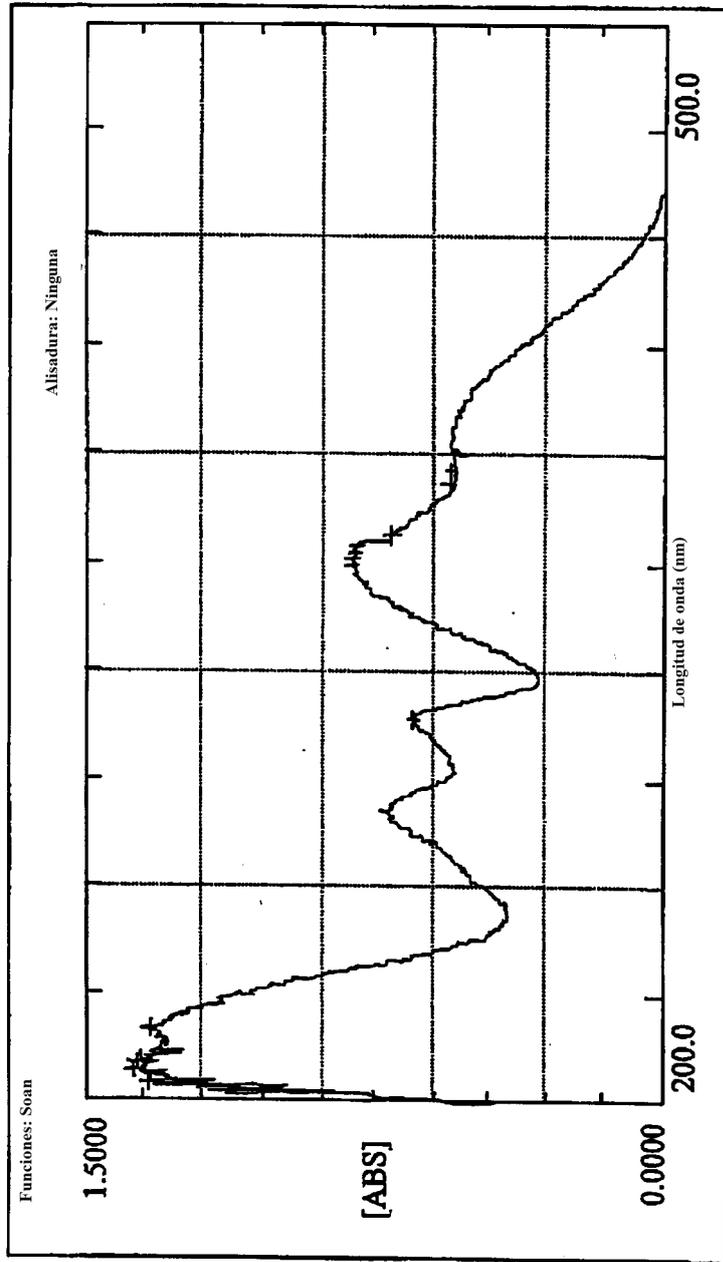


Fig. 7

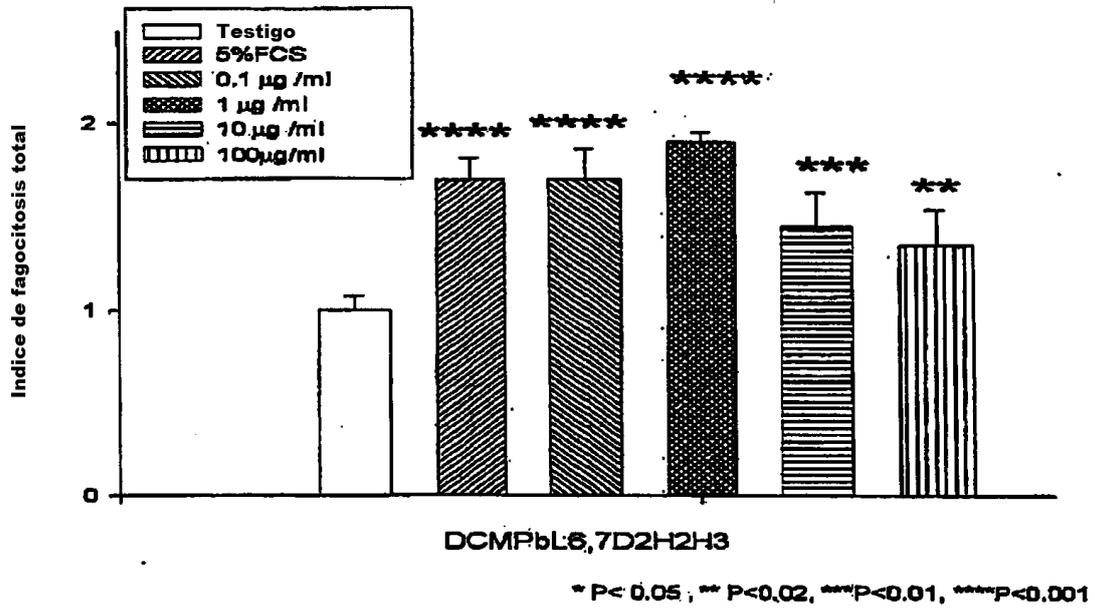


Fig. 8

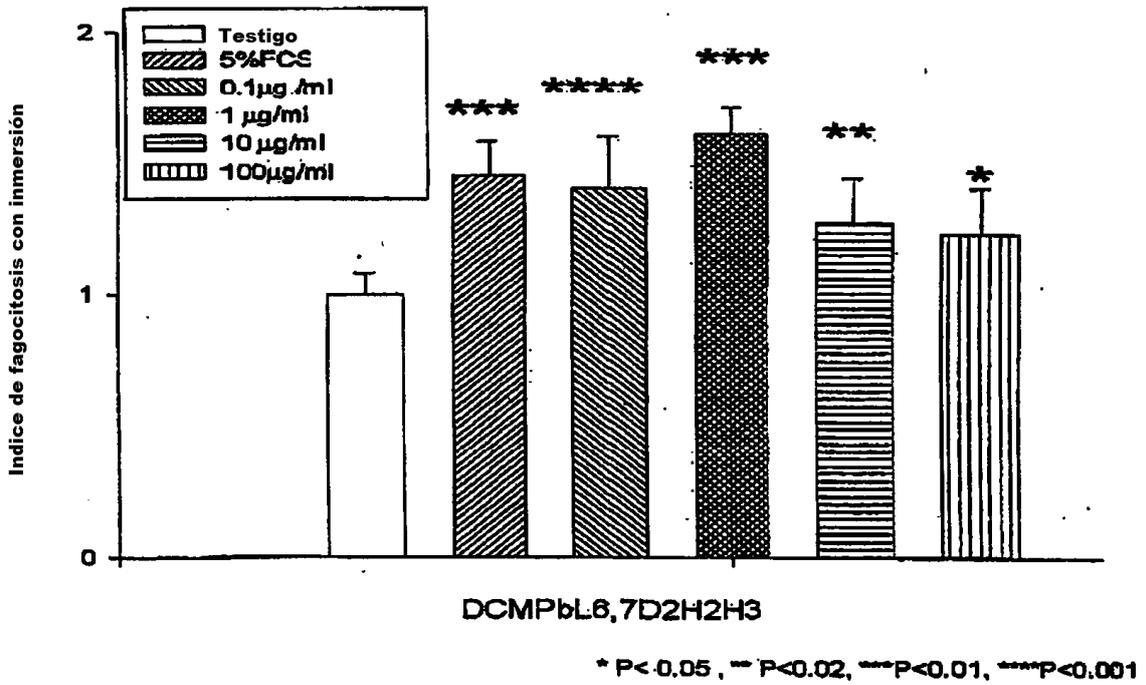


Fig. 9

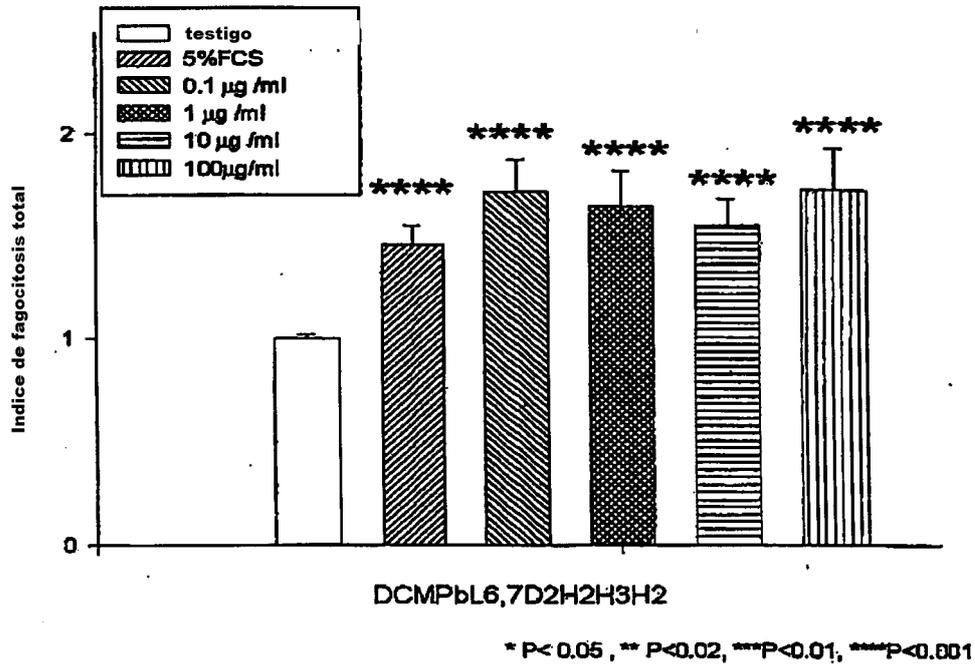


Fig. 10

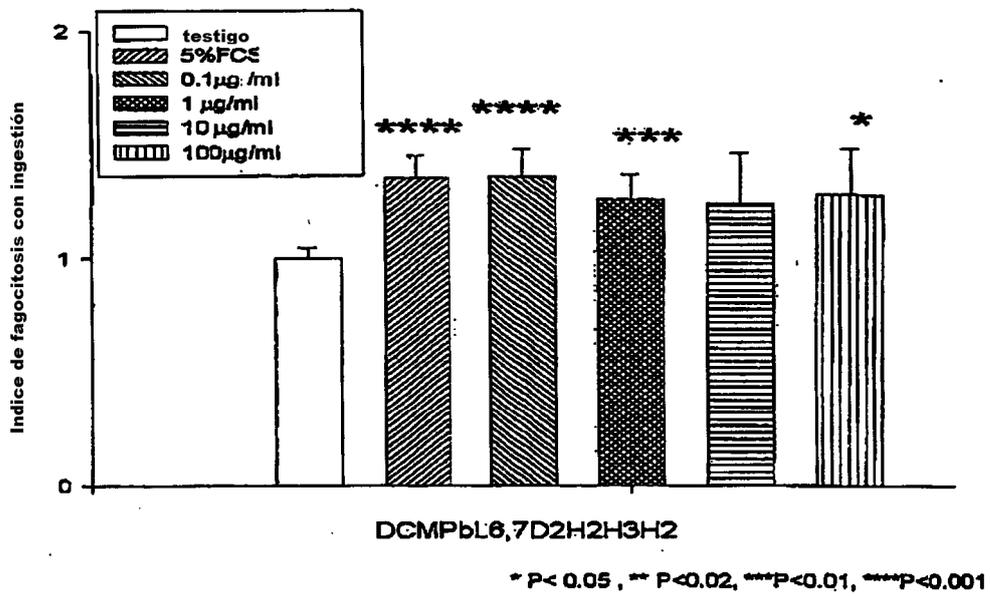


Fig. 11

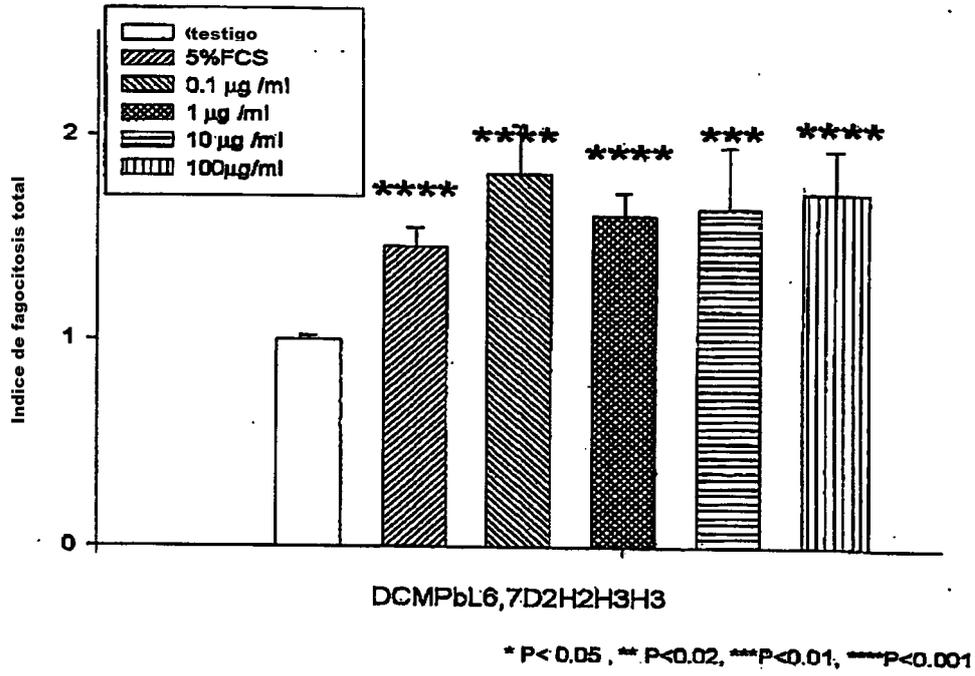


Fig. 12

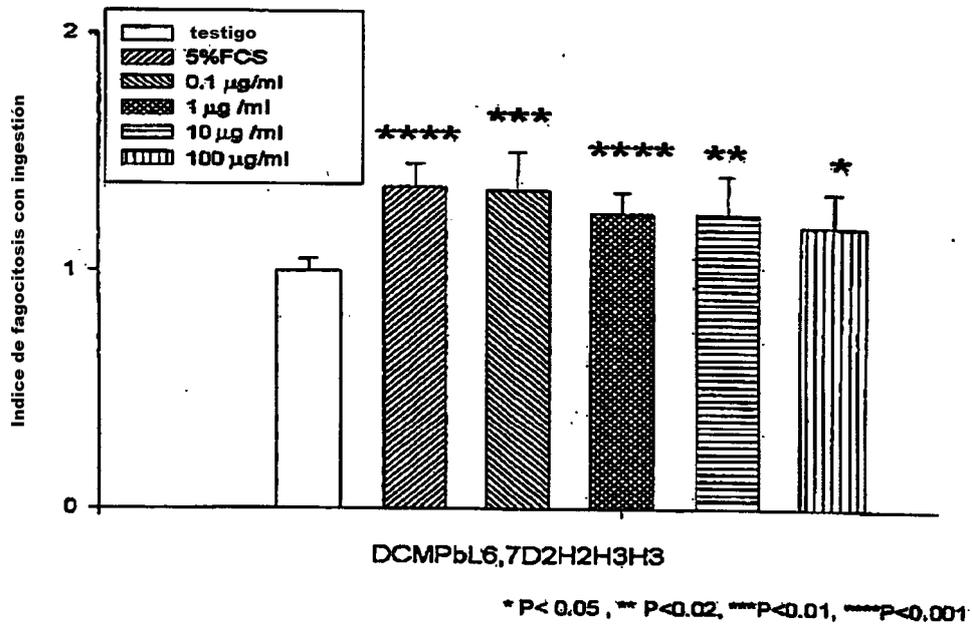


Fig. 13

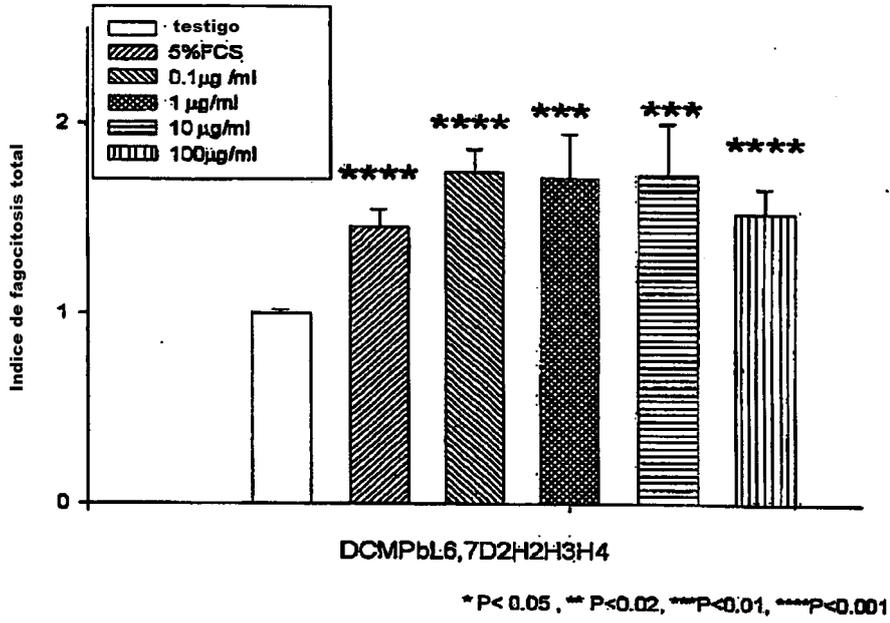


Fig. 14

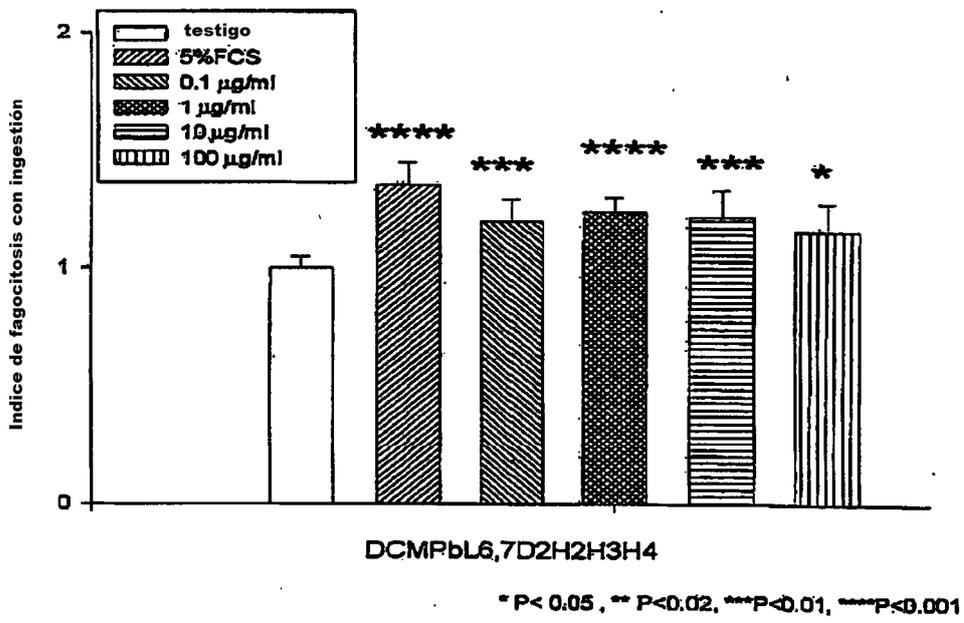


Fig. 15