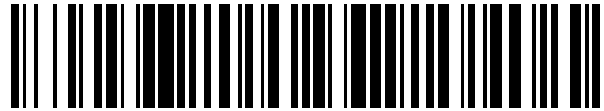


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 518**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 36/24** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11843119 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2642859**

54 Título: **Extracto de la especie Nerium o de la especie Thevetia para tratamiento de enfermedades neurológicas**

30 Prioridad:

**10.01.2011 US 987693**  
**10.01.2011 WO PCT/US2011/020672**  
**22.11.2010 US 415945 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2015**

73 Titular/es:

**PHOENIX BIOTECHNOLOGY INC. (100.0%)**  
**8626 Tesoro Dr., Suite 801**  
**San Antonio, TX 78217, US**

72 Inventor/es:

**ADDINGTON, OTIS C. y**  
**NEWMAN, ROBERT A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 546 518 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

Extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* para tratamiento de enfermedades neurológicas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende fracciones o subfracciones de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* para su utilización en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad o trastorno neurológico.

La materia del asunto que no está englobada en el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención actualmente reivindicada.

### Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades y trastornos neurológicos afectan a la función cerebral. Se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar terapias curativas o paliativas para estas enfermedades y trastornos; sin embargo, no se ha desarrollado ninguna terapia global o universalmente curativa, aun cuando existen numerosos enfoques farmacoterapéuticos que han demostrado ser eficaces contra diversas enfermedades y trastornos diferentes.

15 La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria del cerebro que afecta al sistema nervioso. Es producida por un gen defectuoso que se transmite de padres a hijos. El gen HD interfiere con la fabricación de una proteína concreta conocida como 'huntington' que parece ser crucial para el desarrollo apropiado del cerebro. Los signos clásicos de EH incluyen, alteraciones emocionales, cognitivas y motoras. La enfermedad de Huntington se caracteriza por movimientos involuntarios espasmódicos (corea), pero a veces provoca rigidez sin movimientos anormales, cambios en el uso de las extremidades (apraxia), pérdida de control de las funciones corporales y demencia, incluido un deterioro progresivo de la memoria, velocidad de pensamiento, de juicio, y la falta de conciencia de los problemas y la planificación. No hay cura conocida para la enfermedad de Huntington. Aunque hay una serie de medicamentos para ayudar a controlar los síntomas asociados con la EH tales como problemas emocionales y de movimiento, no existe un tratamiento para detener o invertir el curso de la enfermedad. La enfermedad de Huntington ha sido reconocida como una enfermedad con una anomalía general de membrana. Se ha observado un nivel significativamente elevado y actividad (10 veces mayor) de Na, K-ATPasa en las membranas de los eritrocitos y en los ganglios basales de los pacientes de Huntington en comparación con los normales (Butterfield D. A., Oeswein J. Q., Prunty M. E., Hisle K. C., Markesbery W. R. ). Increased sodium, potassium adenosine triphosphatase activity in erythrocytes membranes in Huntington's disease. *Ann. Neurology.*, 4: 60-62, 1978) fibroblast membranes obtained from the skin of Huntington's disease patients (Schroeder F., Goetz I. E., Roberts E., Membrane anomalies in Huntington's disease fibroblasts *J. Neurochem.* 43: 526-539, 1984).

20 La enfermedad de Alzheimer es una forma de demencia - una enfermedad neurodegenerativa que daña las funciones intelectuales del cerebro (memoria, orientación, cálculo, etc.), pero por lo general conserva sus funciones motoras. En la enfermedad de Alzheimer, la mente se deteriora gradualmente, provocando la pérdida de memoria, confusión, desorientación, alteración del juicio y otros problemas que pueden afectar a la capacidad de una persona para realizar las actividades diarias normales. El tipo, gravedad, secuencia y evolución de los cambios mentales varían en gran medida. No hay cura conocida para la enfermedad de Alzheimer ni se conoce ninguna manera de frenar su evolución. Para algunas personas en las etapas tempranas o medias de la enfermedad, la medicación tal como tacrina puede aliviar algunos de los síntomas cognitivos. Aricept (donepezil) y Exelon (rivastigmina) son inhibidores de la reversibles de acetilcolinesterasa que están indicados para el tratamiento de la demencia leve a moderada de tipo Alzheimer. Estos fármacos (denominados inhibidores de la colinesterasa) actúan aumentando las concentraciones en el cerebro del neurotransmisor acetilcolina, ayudando a restablecer la comunicación entre las células cerebrales. Algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas del comportamiento tales como el insomnio, la agitación, la desorientación, la ansiedad y la depresión. Estos tratamientos están dirigidos a hacer que el paciente se sienta mejor. Aunque no se conoce ninguna medicación para curar la enfermedad de Alzheimer, los inhibidores de la colinesterasa pueden mejorar el desempeño de las actividades diarias o disminuir los problemas de comportamiento. Los medicamentos que se están probando actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen estrógenos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, vitamina E, selegilina (Carbex, Eldepryl) y el producto botánico ginkgo biloba.

25 *Nerium oleander* es una planta ornamental ampliamente distribuida en Asia subtropical, el suroeste de Estados Unidos y en el Mediterráneo. Sus propiedades médicas y toxicológicas se han reconocido desde hace tiempo. Se ha utilizado, por ejemplo, en el tratamiento de las hemorroides, úlceras, la lepra, las mordeduras de serpientes e incluso en la provocación del aborto. Oleandrina, un componente importante pero no el único componente del extracto de la adelfa, es un glucósido cardíaco.

30 La extracción de glucósidos procedentes de plantas de la especie *Nerium* ha proporcionado ingredientes farmacológicamente/terapéuticamente activos de *Nerium oleander*. Entre estos están oleandrina, neriifolina (neriifolina) y otros compuestos glucósidos cardíacos. Los extractos de oleandrina obtenidos por extracción en agua caliente de *Nerium oleander*, comercializados bajo la marca ANVIRZEL™, contienen la forma concentrada o en polvo de un extracto en agua caliente de *Nerium oleander*. Un ensayo en fase I de un extracto de adelfa en agua

caliente (es decir Anvirzel™) se ha finalizado (Mekhail *et al.*, *Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, pág. 82b, 2001). Se concluyó que los extractos de adelfa, que proporcionarían aproximadamente 57 oleandrina µg/día, pueden administrarse de forma segura en dosis de hasta 1,2 ml/m<sup>2</sup>/día. No se encontraron toxicidades limitativas de la dosis.

El documento WO 2009/064657 describe un extracto de una masa vegetal de adelfa que comprende la especie  
5 *Nerium*, tal como *Nerium oleander*, o de la especie *Thevetia*, tal como *Thevetia nerifolia*.

El documento US 2006/135443 describe inhibidores de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPasa tales como los glucósidos cardíacos hallados en *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana* para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El documento US 2006/234955 describe glucósidos cardíacos tales como oleandrina, digitoxina, digoxina, oubaiína, digoxigenina, digitoxigenina, acetilestropantidina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y la apoplejía.

10 James K. T. Wang *et al.*: "Discovery by a Brain Slice-Based Compound Screening Platform", *Proceedings of The National Academy of Sciences, National Academy of Sciences*, EE.UU., vol. 103, nº 27, 5 de julio de 2006, páginas 10.461-10.466, describe la neriifolina de *Thevetia peruviana* para el tratamiento de la apoplejía. ("Resumen").

Yu Man-Shan *et al.*: "New polysaccharide de *Nerium indicum* protects neurons via stress kinase signaling pathway", *Brain Research*, vol. 1153, junio de 2007, páginas 221-230, describe polisacáridos de *Nerium indicum* que tienen  
15 una acción protectora contra la apoptosis provocada por Aβ ("Resumen").

Wang X. *et al.* "LC/MS/MS Analyses of an Oleander Extract for Cancer Treatment", *Analytical Chemistry Society*, EE.UU., vol. 42, nº 15, 1 de agosto de 2000, páginas 3547-3552 describe que los extractos de *Nerium oleander* se utilizan como remedios populares para el tratamiento de la epilepsia (página 3547, columna izquierda).

El documento US 2008/200401 describe extractos de *Nerium oleander* y *Thevetia nerifolia*, que comprenden  
20 glucósidos cardíacos, triterpenos, oliandrigenina, ácido ursólico, ácido betulínico, odorósido, neritalósido, ácido oleánico, betulina, 28-norurs-12-en-3β-ol, urs-12-en-3β-ol, ácido 3β,3β-hidroxi-12-oleanen-28-oico, ácido 3β,20α-dihidroxiurs-21-en-38-oico, ácido 3β,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico, ácido 3β,13β-dihidroxiurs-11-en-28-oico, 3β,12α-dihidroxiolean-28,13β-olida, ácido 3β,27-dihidroxi-12-olean-28-oico, aglucones, menos de 0,01% en peso de polisacáridos, etc.

## 25 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a:

1. una composición farmacéutica que comprende una fracción o subfracción de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, en donde una de sus fracciones o una de sus subfracciones excluye glucósido cardíaco y comprende al menos un esteroide, al menos un triterpeno y menos del 1% en peso de polisacáridos, en donde el  
30 extracto se obtiene por extracción de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* en agua caliente, por extracción en agua fría, por extracción en líquido supercrítico, por extracción en disolvente orgánico o una de sus combinaciones, seguido de su fraccionamiento, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad neurológica;

2. la composición farmacéutica para la utilización del apartado 1, en donde el extracto comprende uno o más agentes terapéuticamente eficaces extraídos de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*;

35 3. la composición farmacéutica para la utilización de cualquiera de los apartados anteriores, en donde la especie *Nerium* es *Nerium oleander* y la especie *Thevetia* es *Thevetia nerifolia* o *Thevetia peruviana*;

4. la composición farmacéutica para la utilización del apartado 1, en donde la subfracción se ha preparado por fraccionamiento cromatográfico de líquidos de una fracción del extracto;

5. la composición farmacéutica para la utilización de cualquiera de los apartados anteriores, en donde:

40 a) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende al menos un esteroide y, al menos dos triterpenos;

b) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende al menos dos esteroides y, al menos dos triterpenos; o

c) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende betulina (urs-12-en-3β,28-diol); 28-norurs-12-en-3β-ol; urs-12-en-3β-ol; ácido 3β,3β-hidroxi-12-oleanen-28-oico; ácido 3β,20α-dihidroxiurs-21-en-38-oico; ácido 3β,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico; ácido 3β,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico; ácido 3β,13β-dihidroxiurs-11-en-28-oico; 3β,12α-dihidroxioleanan-28-13β-olida; ácido 3β,27-dihidroxi-12-oleanan-28-oico;

50 6. la composición farmacéutica para la utilización de cualquiera de los apartados anteriores para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la encefalopatía espongiiforme bovina, la esclerosis múltiple, la neuropatía diabética, el autismo, la lipofuscinosis cerioidea neuronal juvenil, la apoplejía, una taupatía o una enfermedad que presenta una etiología relacionada con excesiva proteólisis de proteína precursora de beta amilácea, con acumulación de proteína beta

amilácea en las sinapsis de las neuronas de un paciente, con formación de fibrillas amiláceas en las sinapsis de las neuronas de un individuo, o con formación de placas amiláceas en las sinapsis de las neuronas de un individuo;

7. la composición farmacéutica para la utilización del apartado 1 para su utilización en el método retardado en el tiempo de tratamiento de la apoplejía.

5 La descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad neurológica que comprende administrar a un individuo que lo necesita una composición que contiene un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad neurológica. La invención proporciona realizaciones en donde una fracción del extracto o una subfracción de una fracción del extracto se utiliza en lugar del extracto sin fraccionar, y en donde la fracción o subfracción del extracto excluye oleandrina y neriifolina.

10 La composición farmacéutica para su utilización según la invención proporciona un método de tratamiento, en un individuo que lo necesita, una enfermedad o trastorno neurológico con una composición que comprende un extracto de la especie *Nerium* o la especie *Thevetia*, método que comprende:

determinar que el individuo tiene una enfermedad o trastorno neurológico; e

indicar la administración al individuo una composición que comprende un extracto de la especie *Nerium* o de la

15 especie *Thevetia*.

La composición farmacéutica para su utilización según la invención incluye realizaciones en donde: 1) al individuo se prescribe y administra la composición según una dosis terapéuticamente aplicable de la composición; 2) al individuo se administra la composición según una pauta posológica de administración prescrita; 3) el extracto comprende uno o más agentes terapéuticamente eficaces extraídos de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*; 4) la

20 composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticamente eficaces; 5) el extracto se obtiene por extracción de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* con agua caliente, agua fría, fluido supercrítico, disolvente orgánico o una de sus combinaciones; 6) el extracto excluye glucósido cardíaco; 7) el extracto excluye una cantidad terapéuticamente eficaz de glucósido cardíaco; 8) el extracto excluye oleandrina; 9) la composición comprende una fracción de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*; 10) la composición

25 comprende una fracción de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, en donde la fracción se ha preparado por fraccionamiento cromatográfico del extracto líquido; 11) la especie de *Nerium* es *Nerium oleander* y la especie de *Thevetia* es *Thevetia neriifolia*; 12) el extracto excluye una neriifolina; 13) la composición comprende una subfracción de una fracción de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, en donde la subfracción se ha preparado por fraccionamiento cromatográfico de líquidos de una fracción del extracto, y el subfracción

30 excluye oleandrina y neriifolina; 14) el extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* proporciona una respuesta clínica o un efecto clínico mejores cuando se administra en una forma farmacéutica a un individuo que padece la enfermedad o trastorno neurológico en comparación con glucósido cardíaco puro administrado al individuo en una forma farmacéutica por lo demás similar a la misma dosis de glucósido cardíaco; o 15) una de sus combinaciones.

35 El tratamiento de una enfermedad neurológica en un individuo que lo necesita comprende:

determinar si la enfermedad neurológica en el individuo es o no la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la embolia pulmonar u otra enfermedad neurológica;

indicar la administración de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*;

administrar una dosis inicial del extracto al individuo según una pauta posológica de administración inicial prescrita

40 durante un período;

determinar periódicamente la adecuación de la respuesta clínica del individuo y/o de la respuesta terapéutica al tratamiento con el extracto; y

si la respuesta clínica del individuo y/o la respuesta terapéutica es adecuada, entonces, continuar el tratamiento con el extracto según sea necesario hasta que se alcance el criterio de valoración clínico deseado; o si la respuesta

45 clínica y/o respuesta terapéutica del individuo son inadecuadas a la dosis inicial y a la pauta posológica de administración inicial, entonces aumentar o disminuir gradualmente la dosis hasta que se consiga la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica deseada en el individuo.

La prevención o la reducción de la frecuencia de aparición de una enfermedad neurológica en una población de individuos en situación de riesgo de la misma, comprende:

50 la administración de una dosis eficaz de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* de forma recurrente durante un período prolongado para uno o más individuos en una población de individuos en situación de riesgo de padecer una enfermedad neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la apoplejía u otra enfermedad neurológica, con lo que se evita o reduce la frecuencia de la enfermedad neurológica en la población.

La composición farmacéutica para la utilización según la invención incluye realizaciones en donde: a) el método comprende además indicar la administración del extracto a uno o más individuos; b) el método comprende además la administración de una dosis eficaz del extracto al individuo según una pauta posológica de administración prescrita durante un período; c) el método comprende además determinar periódicamente la adecuación de uno o  
 5 más respuestas clínicas y/o respuestas terapéuticas del individuo al tratamiento con el extracto; d) si la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica del individuo es adecuada, entonces el método comprende además continuar el tratamiento con el extracto según sea necesario hasta que se consiga el criterio de valoración clínico deseado; e) si la respuesta clínica y/o respuesta terapéutica del individuo son inadecuadas a la dosis inicial y a la pauta posológica de administración inicial, entonces el método comprende además aumentar o disminuir gradualmente la dosis hasta  
 10 que se consiga la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica deseada en el individuo; f) el extracto se administra a individuos plurales en una población; g) la forma recurrente es a diario, en días alternos, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanalmente, en semanas alternas, cada dos semanas, cada tres semanas, mensual, bimensual, quincenal, en meses alternos, cada dos meses, trimestral, en trimestres alternativos, trimestralmente, en cada estación, semestral y/o anualmente; h) el período de prórroga es una o más  
 15 semanas, uno o más meses, uno o más trimestres y/o uno o más años; i) la dosis eficaz se administra una o más veces al día; j) el método comprende además la identificación de una población de individuos en situación de riesgo de padecer una enfermedad neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la apoplejía u otra enfermedad neurológica; k) la población de individuos en situación de riesgo está caracterizada por la progresión de la edad del individuo, los antecedentes familiares de la enfermedad neurológica, la predisposición  
 20 genética a la aparición de la enfermedad neurológica, la presencia y la expresión del gen ApoE4 en el individuo, el sexo femenino (el doble de mujeres que de hombres contraen la enfermedad de Alzheimer), las enfermedades cardiovasculares (p. ej., presión arterial alta y niveles altos de colesterol), la diabetes (especialmente de tipo 2 o formas de aparición en adultos de esta enfermedad), el síndrome de Down, el traumatismo craneal, bajos niveles de enseñanza organizada, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol el consumo y/o la drogadicción; l) el extracto  
 25 excluye un glucósido cardíaco; o m) una de sus combinaciones.

La composición para su uso según la invención también proporciona un método retardado en el tiempo de tratamiento de la apoplejía en un individuo que comprende:

dentro de un período de retardo una vez que un individuo ha padecido apoplejía, la administración de una dosis inicial de extracto de de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* según una pauta posológica de administración  
 30 inicial;

determinar la adecuación de la respuesta clínica del individuo y/o de la respuesta terapéutica al tratamiento con el extracto; y

si la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica del individuo es adecuada, entonces continuar el tratamiento con el extracto según sea necesario hasta que se consiga el criterio de valoración clínico deseado; o

35 si la respuesta clínica y/o respuesta terapéutica del individuo son inadecuadas a la dosis inicial y a la pauta posológica de administración inicial, entonces aumentar o reducir la dosis hasta que se consiga la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica deseadas en el individuo.

Algunas realizaciones incluyen aquellas en las que: 1) el periodo de retraso es de 10 horas o menos, 8 horas o menos, 6 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, 45 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, o 10 min o menos; 2) determinar la adecuación de la respuesta  
 40 clínica y/o terapéutico de un individuo se hace mediante evaluaciones de cualquier debilidad en la cara, brazos y/o piernas de un lado del cuerpo, entumecimiento en la cara, brazos y/o piernas en un lado del cuerpo, incapacidad para comprender el lenguaje hablado, incapacidad para hablar o hablar con claridad, incapacidad para escribir, vértigo y/o desequilibrio al andar, visión doble y un raramente jaqueca grave; o 3) una de sus combinaciones.

45 La fabricación de un medicamento puede llevarse a cabo como se describe en la Solicitud Internacional PCT nº PCT/US06/29061 presentada el 26 de julio de 2006, el documento US 7.402.325 presentado el 28 de julio de 2005, o el documento U.S.S.N. 12/019.435 presentado el 24 de enero de 2008 (publicado como US 2008-0200401).

La fabricación también puede incluir una o más etapas adicionales, tales como: la entrega de la forma farmacéutica envasada a un vendedor (minorista, mayorista y/o distribuidor); la venta o proporcionar de otro modo la forma  
 50 farmacéutica envasada a un individuo que tiene una enfermedad neurológica; incluida con el medicamento una etiqueta y un prospecto, que proporciona instrucciones sobre el uso, pauta posológica de administración, administración, contenido y las características toxicológicas de la forma farmacéutica. En algunas realizaciones, el tratamiento de una enfermedad neurológica comprende: determinar que un individuo tiene una enfermedad o trastorno neurológico; indicar la administración del extracto, o una fracción del mismo, al individuo según una pauta  
 55 posológica de administración; administrar al individuo una o más formas farmacéuticas que contienen el extracto, en donde una o más formulaciones farmacéuticas se administran según la pauta posológica de administración.

La descripción también proporciona un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, o una composición, es decir, una forma de formulación farmacéutica o forma farmacéutica, que comprende un extracto de la especie

*Nerium* o de la especie *Thevetia* para el tratamiento de una enfermedad neurológica. En algunas realizaciones, el extracto se puede obtener a partir de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* como se describe en la presente memoria o en la patente de EE:UU. n° 7.402.325, la Solicitud Internacional PCT n° PCT/US06/29061, la Solicitud de Estados Unidos n° 12/019435.

- 5 La descripción proporciona un método para preparar una fracción de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* que comprende: la extracción de una masa vegetal que comprende la especie *Nerium* o la especie *Thevetia* para formar uno de sus extractos sin fraccionar, comprendiendo el extracto uno o más componentes farmacológicamente activos para el tratamiento de una enfermedad neurológica; y fraccionamiento del extracto no fraccionado para formar dos o más fracciones de los mismos, en donde al menos una fracción comprende uno o
- 10 más componentes de glucósidos no cardíacos farmacológicamente activos. En algunas realizaciones, a) la extracción se lleva a cabo con fluido supercrítico, agua, disolvente orgánico o una de sus combinaciones; b) el fraccionamiento se lleva a cabo por cromatografía líquida o extracción con disolventes; c) al menos una fracción excluye oleandrina y neriifolina; o d) una de sus combinaciones.

- 15 La descripción también proporciona un método de fraccionamiento de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* a fin de proporcionar una o más de sus fracciones terapéuticamente eficaces. El método comprende: a) proporcionar un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*; b) fraccionar el extracto para proporcionar dos o más fracciones diferentes de extracto, una primera fracción del extracto que comprende uno o más agentes farmacológicamente activos, que no es/son un glucósido cardíaco, y excluyendo el glucósido cardíaco (oleandrina y neriifolina), y una segunda fracción de extracto que comprende uno o más glucósidos cardíacos y uno
- 20 o más agentes farmacológicamente activos, que no es/son un glucósido cardíaco. El fraccionamiento también se puede realizar como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la primera o la segunda fracción de extracto se somete a fraccionamiento adicional para proporcionar dos o más subfracciones diferentes, en donde una primera subfracción comprende uno o más esteroides y una segunda subfracción comprende uno o más triterpenos. En algunas realizaciones, el fraccionamiento se realiza por cromatografía líquida con una fase
- 25 estacionaria y una fase móvil.

Las composiciones que comprenden fracciones o subfracciones que contienen un glucósido cardíaco o no contienen al menos un esteroide, al menos un triterpeno y menos del 1% en peso de polisacárido no son según la invención.

La composición farmacéutica para la utilización según la invención puede comprender una fracción de extracto que comprende uno o más esteroides y uno o más triterpenos y excluye glucósidos cardíacos (oleandrina y neriifolina).

- 30 La composición farmacéutica para la utilización según la invención puede comprender una subfracción de la fracción de un extracto obtenido de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, con lo que la subfracción se ha obtenido por fraccionamiento adicional de una fracción del extracto obtenido de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*. En algunas realizaciones, una subfracción de una fracción de extracto comprende uno o más esteroides y uno o más triterpenos. En algunas realizaciones, una subfracción de una fracción de extracto comprende uno o más triterpenos
- 35 y excluye un esteroide. Cada subfracción independientemente excluye glucósidos cardíacos (oleandrina y neriifolina).

- En algunas realizaciones: a) el extracto comprende además al menos dos agentes farmacológicamente activos obtenidos (extraídos) de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*; b) al menos los dos agentes farmacológicamente activos funcionan de forma aditiva o sinérgica para contribuir a la eficacia terapéutica del
- 40 extracto cuando el extracto se administra a un individuo; c) ninguno de al menos los dos agentes farmacológicamente activos es un glucósido cardíaco; y/o d) al menos dos agentes farmacológicamente activos se seleccionan del grupo de glucósidos cardíacos, los aglucones asociados de glucósidos cardíacos, p. ej., oleandrogenina, cardenolidas o triterpenoides.

- En algunas realizaciones: 1) el extracto está presente en una formulación o composición farmacéutica; 2) el extracto
- 45 está presente en una formulación o composición farmacéutica; 2) el extracto se ha obtenido a partir de una masa vegetal de adelfa o de una masa vegetal de adelfa amarilla; 3) la masa vegetal comprende la especie *Nerium*, como *Nerium oleander*, o la especie *Thevetia*, tal como *Thevetia neriifolia* o *Thevetia peruviana* (conocida también como adelfa amarilla); 4) el extracto se prepara por extracción en fluido supercrítico (SCF), opcionalmente en presencia de un modificador; 5) el extracto se preparó por extracción en agua caliente, extracción en agua fría, extracción en
- 50 disolvente orgánico o extracción en disolvente orgánico acuoso.

- Según la invención, el extracto (o una de sus fracciones o subfracciones) comprende menos del 1% en peso, menos del 0,5% en peso, menos del 0,1% en peso, menos del 0,05% en peso o menos del 0,01% en peso de polisacárido. En algunas realizaciones, el extracto (o una de sus fracciones o subfracciones de la misma) comprende betulina
- 55 3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihidroxi-urs-21-en-38-oico; ácido 3 $\beta$ ,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico; ácido 3 $\beta$ ,13 $\beta$ -dihidroxiurs-11-en-28-oico; 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-oleanan-28,13 $\beta$ -olida y ácido 3 $\beta$ ,27-dihidroxi-12-oleanan-28-oico.

En algunas realizaciones, el individuo que tiene una enfermedad neurológica, es decir, el individuo que lo necesita, es parte de una población de dichos individuos. El método para mejorar el estado clínico de un número

estadísticamente significativo de individuos en una población de individuos que tienen una enfermedad neurológica comprende: administrar a la población de individuos un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* o una composición que comprende un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*; y determinar el estado clínico de los individuos. En algunas realizaciones, el número estadísticamente significativo es de al menos el 5% de la población.

En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la apoplejía, una taupatía u otro trastorno neurológico, tal como se describe en la presente memoria. El medicamento puede fabricarse por inclusión del extracto en una formulación farmacéutica que contiene uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El tratamiento del individuo con el extracto o la composición que contiene el extracto se continúa según sea necesario. La dosis o pauta posológica de administración puede ajustarse según sea necesario hasta que el paciente alcance el/los criterio(s) de valoración clínico(s) deseado(s), tal como una reducción o alivio de los síntomas neurológicos específicos asociados a la enfermedad. La determinación de la adecuación de la respuesta clínica y/o de la respuesta terapéutica puede llevarse a cabo por un médico familiarizado con la enfermedad neurológica que se está tratando.

En algunas realizaciones, la enfermedad neurológica se selecciona del grupo que consiste en enfermedad neurológica, trastorno neurológico, taupatía y apoplejía. En algunas realizaciones, la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, encefalopatía espongiiforme bovina, esclerosis múltiple, neuropatía diabética, autismo y lipofuscinosis cerioidea neuronal juvenil. En algunas realizaciones, la apoplejía es la lesión isquémica mediada por el derrame cerebral. En algunas realizaciones, la enfermedad neurológica es una taupatía, que es una enfermedad neurodegenerativa que tiene una etiología asociada a un desequilibrio en la relación Tau3R/Tau4R en un individuo. Las taupatías son una clase de enfermedades neurodegenerativas resultantes de la acumulación patológica de proteínas tau en el cerebro humano. En algunas realizaciones, la taupatía es el síndrome de Down, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal, algunas variantes de la enfermedad de priones, la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva o la demencia frontotemporal. Cada una de las etapas de los métodos de la invención puede llevarse a cabo en instalaciones independientes o dentro de la misma instalación.

En algunas realizaciones, las neuronas son *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En algunas realizaciones, las neuronas son neuronas CA-1.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica para la utilización según la invención proporciona un extracto o una de sus fracciones o subfracciones, de la especie *Nerium*, que tiene un espectro de RMN <sup>1</sup>H tal como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el extracto o una de sus fracciones o subfracciones, de la especie *Nerium*, presenta actividad terapéutica como se describe en la presente memoria cuando se administra a un individuo. En algunas realizaciones, el extracto o una de sus fracciones o subfracciones, de la especie *Nerium*, tiene un cromatograma de HPLC como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos emplean un extracto, una de sus fracciones o subfracciones, como se describe en la presente memoria.

A menos que se especifique de otra manera en la presente memoria, el término "extracto" puede referirse al extracto no fraccionado o al extracto fraccionado, es decir, a una fracción del extracto, o a un extracto subfraccionado, es decir, a una subfracción de una fracción del extracto.

### Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente descripción y describen realizaciones ejemplares de la invención reivindicada.

La FIG. 1A representa los datos de respuesta a la concentración obtenidos de la evaluación comparativa de la oleandrina frente a sin oxígeno o privación de glucosa (OGD), la referencia, en un ensayo para "apoplejía" con neuroprotección en cortes cerebrales (Ejemplo 8), en donde el número de neuronas corticales sanas se determina tras 5-6 minutos de privación de oxígeno y glucosa (OGD = apoplejía) en presencia o ausencia de oleandrina.

La FIG. 1B representa los resultados de un ensayo de respuesta a la concentración para el extracto en SCF no fraccionado de *Nerium oleander* en un ensayo para "apoplejía" con neuroprotección en cortes cerebrales como se describe en la presente memoria (Ejemplo 8), en donde se utiliza como referencia la privación de oxígeno o de glucosa.

Las FIG. 2A-2C representan resultados de la evaluación comparativa de oleandrina en comparación con el extracto en SCF no fraccionado de *Nerium oleander* en un ensayo para la "enfermedad de Alzheimer" con neuroprotección en cortes cerebrales (Ejemplo 9), en donde el número de neuronas corticales sanas se determina tras la degeneración provocada por APP/A $\beta$  en ausencia o presencia de una cantidad variable de esos agentes.

Las FIG. 3A-3D representan resultados de experimentos por duplicado de la evaluación comparativa de oleandrina (FIG. 3A-3B) (FIG. 3C-3D) en un ensayo para la "enfermedad de Huntington" con neuroprotección en neuronas en cocultivo córtico-estriatal (Ejemplo 10), en donde el porcentaje de rescate, con relación a la referencia, de las neuronas corticales frente a las neuronas estriadas transfectadas con una forma mutante de la proteína de

5 Huntington (htt) se determina en ausencia o presencia de cantidades variables de oleandrina.

Las FIG. 4A-4E representan los resultados de un ensayo para "apoplejía" con neuroprotección en cortes cerebrales como se describe en la presente memoria, en donde el extracto en SCF que contiene oleandrina se ha fraccionado por cromatografía líquida (Ejemplo 13) y las cinco fracciones diferentes (descritas a continuación) se han sometido a este ensayo (Ejemplo 15): Fracción O-H (FIG. 4A), Fracción O-2 (FIG. 4B), Fracción O-3 (FIG. 4C), Fracción O-4

10 (FIG. 4D) y Fracción O-5 (FIG. 4E).

La FIG. 5 representa los resultados de un ensayo para "apoplejía" de respuesta a la concentración en cortes cerebrales (Ejemplo 15) para las fracciones O-4 del extracto en SCF de *Nerium oleander* frente al extracto en SCF original de *Nerium oleander* no fraccionado (PBI o PBI-05204).

La FIG. 6 representa los resultados de la evaluación comparativa de una fracción (O-4 o O-4A) de extracto en SCF de *Nerium oleander* frente a no tratados (células no se transfectaron con APP/A $\beta$ ) en un ensayo "de Alzheimer" basado en APP (Ejemplo 11), en donde el número de neuronas corticales sanas se determina tras la degeneración provocada por APP/A $\beta$  en ausencia o en presencia de una cantidad variable de esos agentes.

La FIG. 7 representa los resultados de la evaluación comparativa de una fracción (O-4) de extracto en SCF de *Nerium oleander* frente a no tratados (la células no se transfectaron con APP/A $\beta$ ) en un ensayo "de Alzheimer" basado en Tau4R (Ejemplo 12), en donde el número de neuronas corticales sanas y dañadas se determina después de Tau4R en ausencia o presencia de cantidades variables de esos agentes.

Las FIG. 8A-8D representan los cromatogramas obtenidos por análisis de HPLC de las fracciones preparadas según el Ejemplo 13.

Las FIG. 9A-9I representan los espectros de RMN  $^1\text{H}$  para varios componentes presentes en el extracto en SCF de *Nerium oleander*, fracción (O-4). La FIG. 9A representa el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción (O-4) antes del subfraccionamiento según el Ejemplo 17. Las FIG. 9B-9I representan los espectros de RMN  $^1\text{H}$  para diversas subfracciones obtenidas por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice, según el ejemplo 17, realiza en la fracción (O-4).

### Descripción detallada de la invención

30 La invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurológica mediante la administración de una dosis eficaz de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* a un individuo que lo necesita. El extracto se administra según una pauta posológica de administración más idónea para el individuo, la idoneidad de la dosis y la pauta posológica de administración debe determinarse clínicamente según las prácticas clínicas convencionales de tratamiento y los criterios de valoración clínicos para la enfermedad neurológica que se está tratando.

35 En algunas realizaciones, el trastorno neurodegenerativo o enfermedad neurológica que se está tratando tiene una etiología asociada a una sobreexpresión de las proteínas tau y/o un desequilibrio en la relación Tau3R/Tau4R en un individuo. Dicha enfermedad se denomina taupatía. Las taupatías ejemplares incluyen el síndrome de Down, la enfermedad de Pick, algunas variantes de la enfermedad de priones, la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva o la demencia frontotemporal, la degeneración corticobasal, el complejo parkinsonismo-demencia del Guam, la demencia con granos argirófilos, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C y la demencia pugilística.

40 En algunas realizaciones, el trastorno neurodegenerativo o enfermedad neurológica que se está tratando tiene una etiología asociada a la proteólisis anormal o atípica de la proteína precursora beta amilácea, a la acumulación de la proteína beta amilácea en las sinapsis de las neuronas, a la formación de fibrillas amiláceas en las sinapsis de las neuronas o a la formación de placas amiláceas en las sinapsis de las neuronas. Ejemplo de dichos trastornos o afecciones es la enfermedad de Alzheimer. Un individuo tratado según la invención presentará una respuesta terapéutica. Por "respuesta terapéutica" se entiende que un individuo que padece la enfermedad o trastorno disfrutará de al menos uno de las siguientes ventajas clínicas como resultado del tratamiento con el extracto: mejora de la enfermedad o trastorno, reducción en la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno,

45 50 remisión parcial de la enfermedad o trastorno, remisión total de la enfermedad o trastorno o aumento del tiempo hasta la evolución. En otras palabras, la respuesta terapéutica puede ser una respuesta terapéutica total o parcial.

Una respuesta terapéutica también puede describirse como aquella en la que mejora la calidad de vida del paciente afectado por la enfermedad neurodegenerativa. La mejora en la calidad de vida puede ocurrir, por ejemplo, por una reducción de la aparición, la frecuencia o la gravedad de los síntomas asociados a la enfermedad (p. ej., temblores, movimientos musculares involuntarios, pérdida o pérdida parcial de la coordinación neuromuscular, retención de la memoria, etc.).



"La prevención de la aparición de una enfermedad neurológica en una población de individuos en situación de riesgo" significa que no se produzca la enfermedad neurológica durante un período predeterminado en una población demográficamente predeterminada de individuos que están en situación de riesgo de padecer la enfermedad neurológica. La prevención durante el periodo de tiempo predeterminado se produce como resultado de los individuos en esa población que se les ha administrado un extracto según la invención. Como ejemplo, cuando se administra a los individuos un extracto o una composición que contiene el extracto durante un período predeterminado en una población de individuos en situación de riesgo de padecer una apoplejía, la apoplejía no se producirá en estos individuos durante el periodo de tiempo predeterminado. En particular, una composición que contiene el extracto se administra de manera prolongada durante un período de un año a una población de individuos en situación de riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer o alguna de las enfermedades relacionadas con la taupatología, y los individuos en esta población no presentan síntomas asociados a la enfermedad de Alzheimer durante ese período de un año.

"La reducción de la incidencia de aparición de una enfermedad neurológica en una población de individuos en situación de riesgo" está relacionada en su significado con "prevenir la incidencia", salvo que "la reducción de la incidencia de aparición" permite la aparición de la enfermedad neurológica en una población de individuos demográficamente predeterminada pero a una tasa de aparición o a un nivel de gravedad que se reduce en comparación con una población de individuos predeterminada de otro modo demográficamente similar en situación de riesgo a los que no se ha administrado la composición que contiene extracto según la invención.

Tal como se emplea en la presente memoria, "tiempo de evolución" es el período, la longitud o duración una vez se diagnostica (o se trata) una enfermedad hasta que la enfermedad comienza a empeorar. Es el período durante el cual el nivel de una enfermedad se mantiene sin más evolución de la enfermedad, y el período finaliza cuando la enfermedad comienza a avanzar de nuevo. La evolución de una enfermedad se determina al "escenificar" un individuo que padece una enfermedad neurológica antes o al inicio del tratamiento. Por ejemplo, la salud neurológica del individuo se determina antes o al inicio del tratamiento. El individuo se trata a continuación con el extracto, y la salud neurológica se controla periódicamente. En algún momento posterior, los síntomas de la enfermedad neurológica pueden empeorar, marcando así la evolución de la enfermedad y el final de la "tiempo hasta la evolución". El período durante el cual la enfermedad no evolucionó o durante el cual el nivel o gravedad de la enfermedad no empeoró es el "tiempo hasta la evolución".

Una pauta posológica de administración incluye una dosis terapéuticamente aplicable (o dosis eficaz) de extracto administrado según un programa de dosificación. Una dosis terapéuticamente aplicable, por lo tanto, es una dosis terapéutica a la que se observa una respuesta terapéutica de la enfermedad o trastorno al tratamiento con extracto y a la que a un individuo se puede administrar el extracto sin una cantidad excesiva de efectos secundarios no deseados o nocivos. Una dosis terapéuticamente aplicable no es letal para un individuo, aun cuando puede causar algunos efectos secundarios en el paciente. Es una dosis a la que el nivel de beneficio clínico a un individuo al que se está administrando el extracto supera el nivel de los efectos secundarios nocivos experimentados por el individuo debido a la administración del extracto. Una dosis terapéuticamente aplicable variará de un individuo a otro según una variedad de principios farmacológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos establecidos. Sin embargo, una dosis terapéuticamente aplicable estará comprendida normalmente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos de extracto/día, estando el extracto en forma sólida, líquida o semisólida. Se sabe en la técnica que la cantidad real de un agente farmacológicamente activo requerido para proporcionar un resultado terapéutico objetivo en un individuo pueden variar de un individuo a otro según los principios básicos de farmacia.

Una dosis terapéuticamente aplicable puede administrarse según cualquier pauta posológica de administración utilizada normalmente en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos o neurodegenerativos. Una dosis terapéuticamente aplicable se puede administrar una vez, dos veces, tres veces o más al día en la pauta posológica de administración. Puede administrarse cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, dos veces a la semana, semanalmente, quincenal, cada tres semanas, cada cuatro semanas, mensualmente, bimestralmente, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, dos veces al año, anualmente, o según una combinación de cualquiera de los anteriores para llegar a una pauta posológica de administración adecuada. Por ejemplo, una dosis terapéuticamente aplicable puede administrarse una vez al día durante una o más semanas.

Los ejemplos siguientes incluyen pruebas de la eficacia del extracto en afecciones neurológicas tales como enfermedades neurológicas, trastornos neurológicos y apoplejía. El ejemplo 3 detalla un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con un extracto de la especie *Nerium*, o una de sus composiciones, un extracto de la especie *Thevetia*, o una de sus composiciones, o una de sus combinaciones con uno o más de otros agentes terapéuticos. El ejemplo 4 detalla un método de tratamiento de la enfermedad de Huntington con el extracto o una combinación del extracto con uno o más de otros agentes terapéuticos. El ejemplo 5 detalla un método de tratamiento de traumatismo cerebral isquémico mediado por apoplejía y no mediado por apoplejía con el extracto o una combinación del extracto con uno o más de otros agentes terapéuticos.

En general, un individuo que padece una enfermedad neurológica se trata de la manera siguiente. Un individuo que presenta una enfermedad neurológica se evalúa para determinar si la enfermedad neurológica es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la apoplejía u otra enfermedad neurológica o no. Si el individuo tiene un diagnóstico positivo, está indicada la administración del extracto o la composición que contiene extracto. Las dosis

iniciales del extracto o la composición se administran al individuo según una pauta posológica de administración prescrita durante un período. La respuesta clínica y nivel de respuesta terapéutica del individuo se determinan periódicamente. Si el nivel de la respuesta terapéutica es demasiado bajo a una dosis, entonces la dosis se aumenta según un programa de aumento de la dosis predeterminado hasta que se consigue el nivel deseado de respuesta terapéutica en el individuo. Si el individuo presenta efectos secundarios indeseables o un nivel inaceptable de efectos secundarios, entonces la dosis se reduce hasta que se consigue el equilibrio deseado de nivel de respuesta terapéutica frente al perfil de efectos secundarios en el individuo. El tratamiento del individuo con el extracto o la composición se continúa según sea necesario. La dosis o pauta posológica de administración puede ajustarse según sea necesario hasta que el paciente alcanza el/los criterio(s) de valoración clínico(s) deseado(s), tales como el cese de la propia enfermedad, la reducción de síntomas asociados a la enfermedad, y/o una reducción en la evolución del proceso de la enfermedad.

El extracto, en particular extracto no fraccionado, comprende uno o más compuestos farmacológicamente activos. Algunos de estos compuestos están aún sin identificar y algunos pueden ser oleandrina u otro glucósidos cardíacos, oleásido, oleandrigenina, neritalósido, odorósido (Wang X., Plomley J. B., Newman R. A. y Cisneros A. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment, *Analytical Chem.* 72: 3547-3552, 2000), y otros materiales vegetales. El extracto en SCF no fraccionado procedente de un proceso en fluido supercrítico contiene normalmente un intervalo teórico de 0,9% a 2,5% en peso de oleandrina. Se han obtenido extractos en SCF que comprenden cantidades variables de oleandrina. En una realización, el extracto en SCF comprende aproximadamente 2% en peso. de oleandrina.

Los componentes extraíbles no identificados del extracto de la especie *Nerium* o la especie *Thevetia* pueden comprender al menos un componente farmacológicamente activo (glucósido no cardíaco) que contribuye a la eficacia del extracto en SCF o una de sus fracciones. Dos o más componentes extraíbles farmacológicamente activos pueden funcionar de forma aditiva o sinérgica para proporcionar la eficacia observada. En otras palabras, el extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* de la invención comprende uno o más componentes farmacológicamente activos que no son un glucósido cardíaco. El extracto puede fraccionarse en varias fracciones diferentes algunas de las cuales contienen uno o más componentes farmacológicamente activos de glucósido no cardíaco. Además, cada fracción de extracto puede fraccionarse más en dos o más subfracciones diferentes.

Se obtuvieron pruebas de la existencia de uno o más componentes activos farmacológicamente, excepto oleandrina, en el extracto en SCF comparando las curvas de concentración-respuesta para una solución que contiene oleandrina pura frente a la que contiene el extracto en SCF. La FIG. 1A representa los resultados de un ensayo de respuesta a la concentración para una solución que contiene oleandrina pura en un ensayo para "apoplejía" con neuroprotección en cortes cerebrales como se describe en el Ejemplo 8. La concentración de oleandrina en la solución se varió desde 0,0069 hasta 230  $\mu\text{g/ml}$ . La FIG. 1B representa los resultados de un ensayo de respuesta a la concentración para un extracto de la especie de *Nerium* en SCF que contiene oleandrina en un ensayo para "apoplejía" con neuroprotección en cortes cerebrales como se describe en la presente memoria (Ejemplo 8). Los datos demuestran que el extracto es más eficaz que la oleandrina puro lo que significa que el extracto contiene uno o más agentes farmacológicamente activos que proporcionan neuroprotección.

El ejemplo 8 proporciona una descripción detallada de un ensayo *in vitro* utilizado para evaluar la eficacia del extracto, o de una de sus composiciones, para el tratamiento de la lesión neuronal isquémica mediada por la apoplejía. El ensayo es un ensayo en cortes cerebrales durante la privación de oxígeno y glucosa (OGD) utilizado para provocar  $\geq 50\%$  de pérdida de neuronas corticales sanas en 24 horas. El extracto original no fraccionado en SCF de la especie *Nerium*, p. ej., *Nerium oleander*, se utiliza como referencia positiva. El extracto original se fracciona a continuación según el ejemplo 13 para proporcionar una fracción de extracto de la especie *Nerium*. Las fracciones se analizan según los ejemplos 6, 14 y 17.

La RMN  $^1\text{H}$  de triterpeno se caracteriza por 7 señales de metilo fuera del campo, un protón olefínico en aprox. 5,3 ppm, y una señal de metino oxigenado a aprox. 3,4 ppm junto con muchas señales de protones de metileno y metino fuera del campo (aprox. 1,0 ~ 2,5 ppm). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (FIG. 9B-9I) indicaron los componentes principales como esteroides y triterpenos. No se observaron señales para cantidades significativas de glucósidos. No se observaron señales para lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ -insaturadas, que son característicos de los glucósidos cardíacos, lo que sugiere que no hay glucósidos cardíacos ni que su aglucón existe en la fracción Fr-O-4. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  en la FIG. 9C corresponde a una subfracción que comprende al menos un esteroide y al menos uno o al menos dos triterpenos diferente. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  en la FIG. 9B corresponde a una subfracción que comprende al menos dos triterpenos diferentes, tales como una mezcla de dos ursanos, y excluyendo un esteroide.

Por consiguiente, la fracción O-4 comprende al menos un triterpeno y al menos un esteroide. En algunas realizaciones, la fracción O-4 comprende al menos dos triterpenos diferentes y al menos dos esteroides diferentes, o la fracción comprende varios triterpenos diferentes y varios esteroides diferentes. La fracción O-4 evaluada en este ejemplo excluye una cantidad terapéuticamente eficaz de glucósido cardíaco. En algunas realizaciones, la fracción O-4 excluye un glucósido cardíaco. En algunas realizaciones, una primera subfracción de la fracción O-4 comprende al menos un esteroide y al menos un triterpeno o al menos dos triterpenos diferentes, una segunda subfracción comprende al menos dos triterpenos diferentes y excluye un esteroide. En algunas realizaciones, cada uno de las subfracciones primera y segunda excluye glucósidos cardíacos.

La fracción O-4 se probó en cortes cerebrales tratados de OGD (modelo de apoplejía) y en cortes cerebrales no tratados de OGD (es decir, referencia) (modelo no de apoplejía). Los datos indican que la fracción O-4 de extracto proporciona sustancial neuroprotección cuando se utilizan soluciones de fracción O-4 de extracto que varían en concentración de 100 ng/ml a 1 µg/ml y proporciona aún mayor neuroprotección cuando se utilizan soluciones de fracción O-4 de extracto que varían en la concentración de 1 µg/ml a 1 mg/ml. Por consiguiente, una forma farmacéutica líquida que contiene 100 ng/ml a 1 mg/ml de una fracción de extracto por ml de forma farmacéutica líquida debe proporcionar neuroprotección en un individuo al que se le administra.

Aunque no se han hecho mediciones directas se han hecho en el cerebro humano después de una dosis general del extracto, se supone que uno o más componentes farmacológicamente activos en la fracción de extracto atravesarán la barrera hematoencefálica cuando se administran a un individuo. La oleandrina como compuesto puro o contenido dentro del extracto en SCF conocido como PBI-05204 se ha demostrado en un modelo de roedores (ratones) que atraviesa eficazmente la barrera hematoencefálica y entra en el cerebro. Es razonable esperar que oleandrina haría lo mismo con respecto a una barrera hematoencefálica.

Por consiguiente, la composición farmacéutica para su utilización según la invención protege las neuronas contra la pérdida de actividad causada por el agotamiento de oxígeno o por el agotamiento de oxígeno-glucosa al exponer las neuronas con oxígeno agotado y/o glucosa agotada a una cantidad eficaz de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* para minimizar la pérdida de actividad, reducir la tasa de pérdida de actividad, detener la pérdida de actividad, ralentizar la aparición de la pérdida de actividad, y/o proteger la función de las neuronas causada por la exposición a las condiciones de agotamiento de oxígeno y/o agotamiento de glucosa. En algunas realizaciones, el método emplea una cantidad eficaz de una fracción o subfracción de extracto de la especie *Nerium* o de extracto de la especie *Thevetia*. En algunas realizaciones, la fracción o subfracción se ha preparado por fraccionamiento de la cromatografía líquida del extracto. En algunas realizaciones, la fracción excluye un glucósido cardíaco, y en otras realizaciones, la fracción o subfracción incluye uno o más glucósidos cardíacos, en particular, de los descritos en la presente memoria.

El ejemplo 9 proporciona una descripción detallada de un ensayo *in vitro* utilizado para evaluar la eficacia del extracto para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El ensayo es un ensayo en cortes cerebrales para la degeneración provocada por APP/Aβ (APP: proteína precursora amilácea) de neuronas piramidales corticales. Tras la escisión por una enzima secretasa, la APP se reduce a péptidos Aβ que se cree que son un factor etiológico en la formación de placas beta-amiláceas. Las proteínas Aβ están asociadas a la formación de placas beta-amiláceas y se cree que son un sello distintivo si no factor etiológico en la enfermedad de Alzheimer. La transfección biolística se utiliza para introducir marcadores vitales tales como YFP (proteína fluorescente amarilla marcadora) y para introducir montajes de genes de enfermedades en las mismas poblaciones neuronales en los cortes cerebrales. YFP se transfecta junto con isoformas de APP lo que conduce a la degeneración progresiva de neuronas piramidales corticales en el transcurso de tres a cuatro días después de la preparación y transfección de cortes cerebrales. Los datos (FIG. 2A-2C) indican que el extracto en SCF de la especie *Nerium* proporcionó una neuroprotección dependiente de la concentración a cortes cerebrales transfectados con APP rescatando de este modo los niveles casi a los mismos niveles que los proporcionados por fármacos inhibidores de BACE, es decir, fármacos inhibidores de beta secretasa. La enzima beta secretasa escinde la proteína precursora APP en proteínas Aβ tóxicas. El extracto en SCF que contiene oleandrina parecía proporcionar mayor neuroprotección que la oleandrina sola. Los datos en las FIG. 2A-2C son de importancia por que pocos compuestos o estrategias terapéuticas en la bibliografía han demostrado alguna protección significativa de neuronas en este ensayo *in vitro* representativo de la enfermedad de Alzheimer.

Se repitió el ensayo para Alzheimer en cortes cerebrales APP-WT (Ejemplo 11) utilizando fracciones del extracto en SCF de *Nerium oleander*. El número de neuronas corticales sanos se determinó tras la degeneración provocada por APP/Aβ en presencia de cantidades variables de fracción O-4A del extracto en SCF (0,01 a 100 µg/ml). La exposición a privación de oxígeno y glucosa sirvió como referencia positiva interna produciendo la lesión a las neuronas mediada por semejante a la apoplejía. La referencia negativa fue simplemente la salud relativa de las neuronas de cortes cerebrales sin tratamiento con OGD o la exposición a los tratamientos. Los datos se representan en la FIG. 6, en donde las barras de colores más claros indican una diferencia significativa con respecto a la condición de APP-WT por ANOVA seguido de la prueba de comparación de Dunnett después de esta en el nivel de confianza 0,05. Los datos indican que la fracción O-4A proporciona neuroprotección en este ensayo, aún cuando no contiene glucósidos cardíacos.

La fracción O-4 (O-4A) del extracto en SCF de *Thevetia adelfa* se evaluó con el ensayo para Alzheimer en cortes cerebrales tau4R (Ejemplo 12). Se determina el número de neuronas corticales sanas. La eficacia en este ensayo se define como o se basa en el número total relativo de neuronas sanas frente al número de neuronas enfermas y porcentaje de neuronas degradadas en presencia de cantidades variables de fracción O-4A del extracto en SCF (0,3 a 100 µg/ml, habiéndose determinado la concentración en peso del extracto). La referencia negativa en estos experimentos consistía en cortes cerebrales que no se expusieron a OGD mientras que los cortes cerebrales expuestos a OGD, pero no tratados con fracciones procedentes de extracto de *Nerium oleander* no fraccionado sirvió como referencia positiva interna. Los datos se representan en la FIG. 7, en donde las barras de colores más claros indican una diferencia significativa con respecto a las neuronas dañadas por ANOVA seguido de la prueba de

comparación de Dunnett después de este ensayo al nivel de confianza de 0,05. Los datos indican que la fracción O-4A proporciona neuroprotección en este ensayo, aún cuando no contiene glucósido cardíaco.

Por consiguiente, la composición farmacéutica para su utilización según la invención protege las neuronas contra la pérdida de actividad causada por la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método: la exposición de las neuronas que presentan características de la enfermedad de Alzheimer a una cantidad eficaz de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* para minimizar la pérdida de la actividad, reducir la tasa de pérdida de actividad, detener la pérdida de actividad, ralentizar la aparición de la pérdida de actividad, y/o el funcionamiento crítico de las neuronas originadas por la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el método emplea una cantidad eficaz de una fracción de extracto de la especie *Nerium* o de extracto de la especie *Thevetia*. En algunas realizaciones, la fracción se ha preparado por fraccionamiento por cromatografía de líquidos del extracto. En algunas realizaciones, la fracción excluye un glucósido cardíaco, y en otras realizaciones, la fracción incluye uno o más glucósidos cardíacos, en particular, de los descritos en la presente memoria.

El ejemplo 10 proporciona una descripción detallada de un ensayo utilizado para evaluar la eficacia del extracto para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. La proteína *htt* mutante se introduce por electroporación en alta densidad, se mezcla con cocultivos de neuronas corticales, neuronas del cuerpo estriado y glía. Las neuronas del cuerpo estriado y las corticales se transfectan con diferente proteínas fluorescentes de color facilitando de este modo la identificación separada de los diferentes tipos de neuronas en el cocultivo. Las proteínas fluorescentes de color son fluorescentes y 'emiten' color tras la activación con una fuente de luz de longitud de onda apropiada. Los datos (FIG. 3A-3D) indican que oleandrina y el extracto de *Nerium oleander* en SCF son más eficaces que KW6002 (un antagonista del receptor de adenosina 2a) por lo que respecta a proporcionar un mayor número de neuronas supervivientes. Los datos también indican que el extracto en SCF es más eficaz que oleandrina sola, lo que sugiere que el extracto comprende además uno o más agentes terapéuticamente eficaces, aparte de oleandrina, que pueden utilizarse para tratar la enfermedad de Huntington. Dichos otros agentes pueden usarse junto con o en ausencia de oleandrina u otro glucósido cardíaco. Por consiguiente, las neuronas se protegen contra la pérdida de actividad causada por la enfermedad de Huntington, comprendiendo el método: la exposición de las neuronas que presentan características de la enfermedad de Huntington a una cantidad eficaz de oleandrina o extracto que contiene oleandrina para minimizar la pérdida de actividad, reducir el ritmo de pérdida de actividad, detener la pérdida de actividad, ralentizar el comienzo de la pérdida de actividad y/o la función normal de las neuronas causada por la enfermedad de Huntington.

El ejemplo 16 detalla un ensayo de cortes cerebrales ejemplar que puede utilizarse para evaluar la eficacia del extracto en el tratamiento de la apoplejía en un individuo después de la finalización de un período de retardo después de la apoplejía. El ensayo en cortes cerebrales con la privación de glucosa y oxígeno se lleva a cabo como se describe en la presente memoria; sin embargo, en lugar de tratar los cortes cerebrales profilácticamente con el extracto, se trataron con el extracto después de periodos de retardo de 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Los datos deben demostrar que el extracto que contiene es eficaz para proporcionar neuroprotección significativa para periodos de retardo de hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta aproximadamente 6 horas después de la apoplejía.

Por consiguiente, la composición farmacéutica para su utilización según la invención proporciona un método retardado en el tiempo de tratamiento de apoplejía en un individuo mediante la administración de una dosis de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* a un individuo después de que el individuo ha sufrido una apoplejía. Dentro de un período de retardo aceptable después de que un individuo ha sufrido la apoplejía, se administra una dosis inicial del extracto según una pauta posológica de administración inicial. A continuación, se determina la idoneidad de la respuesta clínica del individuo y/o de la respuesta terapéutica al tratamiento con el extracto. Si la respuesta clínica del individuo y/o la respuesta terapéutica es adecuada, entonces el tratamiento con el extracto se continúa según sea necesario hasta que se alcanza el criterio de valoración clínico deseado. Alternativamente, si la respuesta clínica del individuo y/o respuesta terapéutica son inadecuados a la dosis inicial y la pauta posológica de administración inicial, se aumenta o disminuye la dosis hasta que se consiga la respuesta clínica y/o la respuesta terapéutica deseadas en el individuo. El aumento o disminución de la dosis pueden realizarse en conjunción con un cambio en la pauta posológica de administración, tal como un cambio en la frecuencia de dosificación o el período global de administración de la dosis.

Algunos de los ensayos de cortes cerebrales en la presente memoria se llevan a cabo en condiciones en donde el tejido cerebral se tratado con el extracto antes de la OGD. En esas condiciones, los datos demuestran la utilidad del extracto de proporcionar neuroprotección profiláctica contra el daño causado por la apoplejía.

Si un médico tiene la intención de tratar a un individuo que tiene una enfermedad neurológica con una combinación de extracto, o una de sus composiciones, y uno u otros agentes terapéuticos más, y se sabe que la enfermedad neurológica concreta, que el individuo tiene, es al menos en parte terapéuticamente sensible al tratamiento con dichos uno u otros agentes terapéuticos más, entonces el presente método comprende: administrar al individuo que lo necesita una dosis terapéuticamente aplicable de extracto (o una de sus fracciones o subfracciones) y una dosis terapéuticamente aplicable de dicho uno o de otros agentes terapéuticos más, en donde el extracto (o una de sus fracciones o subfracciones) se administra según una primera pauta posológica de administración y uno u otros agentes terapéuticos más se administra según una segunda pauta posológica de administración. En algunas

realizaciones, la primera y segunda pautas posológicas de administración son las mismas. En algunas realizaciones, la primera y segunda pautas posológicas de administración son diferentes.

Si la enfermedad neurológica que se está tratando es la enfermedad de Alzheimer, uno u otros agentes terapéuticos más se pueden seleccionar del grupo que consiste en inhibidores de BACE o inhibidores de acetilcolinesterasa. En algunas realizaciones, uno u otros agentes terapéuticos más se pueden seleccionar del grupo que consiste en Namenda™ (HCl de memantina), Aricept™ (donepezil), Razadyne™ (galantamina), Exelon™ (rivastigmina), y Cognex™ (tacrina).

Si la enfermedad neurológica que se está tratando es la enfermedad de Huntington, uno u otros agentes terapéuticos más pueden seleccionarse del grupo que consiste en productos naturales, anticonvulsivos, antagonistas del receptor de NMDA (d-aspartato de n-metilo), y bloqueadores de los canales de sodio. Ejemplos de agentes incluyen la vitamina E, Baclofen (un derivado del CoQ10), Lamotrigina (anticonvulsivo), remacemida (un anestésico que es un antagonista de NMDA de baja afinidad) y riluzol (bloqueador de canales de Na). La eficacia de cada uno de estos agentes se considera que es baja (Mestre T. *et al.*, *Chochrane Database Systematic Reviews* 08 de julio 2009; 8(3): CD006455) por sí mismo; sin embargo, cabe esperar que la administración de una forma farmacéutica que contiene extracto de los individuos que reciben uno o más de estos otros agentes proporcionará a un individuo, que tiene un trastorno neurológico, un efecto clínico mejorado en comparación con la administración de estos agentes ausentes en el extracto.

Si la enfermedad neurológica que se está tratando es la lesión cerebral isquémica mediada por la apoplejía (apoplejía isquémica), entonces los tratamientos terapéuticos descritos en la bibliografía (Gutiérrez M. *et al.* "Cerebral protection, brain repair, plasticity and cell therapy in ischemic stroke" *Cerebrovasc. Dis.* 2009; 27 Supl. 1: 177-186), p. ej., la trombólisis intravenosa, se puede emplear además del extracto. En algunas realizaciones, uno u otros agentes terapéuticos más se pueden seleccionar del grupo que consiste en fármacos tal como Alteplasa (agente trombolítico).

Uno u otros agentes terapéuticos más se pueden administrar en dosis y según pautas posológicas de administración que son reconocidas por los médicos como terapéuticamente eficaces o en dosis que son reconocidas por los médicos como subterapéuticamente eficaces. La utilidad clínica y/o el efecto terapéutico proporcionado por la administración de una combinación del extracto y uno u otros agentes terapéuticos más pueden ser aditivos o sinérgicos, determinándose dicho nivel de utilidad o efecto por comparación de la administración de la combinación con la administración del cada extracto y uno u otros agentes terapéuticos más. Uno u otros agentes terapéuticos más se pueden administrar en dosis y según pautas posológicas de administración como sugiere o describe la U.S. Food and Drug Administration (U.S.F.D.A.), la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), la Agencia Europea de Medicamentos (E.M.E.A.), la Therapeutic Goods Administration (T.G.A., Australia), la Pan American Health Organization (P.A.H.O.), Medicines and Medical Devices Safety Authority (Medsafe, Nueva Zelanda) o los diversos ministerios de salud en todo el mundo.

El extracto puede prepararse por extracción en fluido supercrítico (SCF) de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o una forma modificada químicamente de dicho extracto (p. ej., un extracto que incluye etanol o se preparó utilizando CO<sub>2</sub> en SCF y etanol; Ejemplo 1). El extracto puede obtenerse por extracción de material vegetal con un disolvente orgánico, p. ej. etanol, metanol, propanol u otros disolventes de este tipo. El extracto puede obtenerse a partir de material vegetal. El material vegetal puede ser masa vegetal tales como las obtenidas a partir de la especie *Nerium*, tales como *Nerium oleander*, o de la especie *Thevetia*, tal como *Thevetia neriifolia* o *Thevetia peruviana* (conocido de otra manera como adelfa amarilla). El proceso de extracción puede llevarse a cabo en un polvo seco de hojas de *Nerium oleander* preparado según un procedimiento descrito en una solicitud provisional de EE.UU. actualmente en trámite nº de serie 11/340.016 presentada el 26 de enero de 2006 en el nombre de Addington (publicada como US 2006-0188536), la solicitud de EE.UU. número de serie 11/191.650 presentada el 28 de julio 2006 (actualmente Patente de EE.UU. nº 7.402.325 expedida el 22 de julio de 2008) en el nombre de Addington, o solicitud de patente internacional PCT nº PCT/US06/29061 presentada el 26 de julio de 2006, o Newman *et al.* (*Mol. Interven.* (2008), 8, 36-49), o por un procedimiento descrito en la presente memoria. Estos métodos también se pueden utilizar para preparar el extracto no fraccionado de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*. A menos que se especifique de otra manera, el término "extracto" como se emplea en la presente memoria puede aceptarse que significa el "extracto no fraccionado" o una fracción del extracto o una subfracción de una fracción del extracto. La expresión "extracto no fraccionado" se acepta generalmente que significa un extracto obtenido por extracción de material vegetal, en donde el extracto no se ha sometido a fraccionamiento, tales como fraccionamiento o separación en componentes individuales o grupos de componentes por cromatografía o extracción con disolvente, después de la preparación inicial del extracto.

Como se emplea en la presente memoria, el término "oleandrina" se acepta que significa todas las formas conocidas de oleandrina a menos que se especifique lo contrario. La oleandrina puede estar presente en forma racémica, ópticamente pura u ópticamente enriquecida. El material vegetal de *Nerium oleander* se puede adquirir, por ejemplo, en proveedores comerciales de plantas tales como Aldridge Nursery, Atascosa, Tejas.

El extracto no fraccionado se puede obtener por extracción en fluido supercrítico modificado (por ejemplo, etanol) o sin modificar de una masa vegetal que contiene glucósido cardíaco, p. ej., de una masa vegetal que contiene la

especie *Nerium* o la especie *Thevetia*. El extracto en fluido supercrítico puede comprender uno o más agentes farmacológicamente activos, extraídos de la masa vegetal, lo que contribuye a la eficacia terapéutica del extracto cuando se administra a un individuo. Cuando están presentes dos o más de dichos agentes, pueden contribuir de forma aditiva o sinérgica a la eficacia terapéutica del extracto.

- 5 El extracto no fraccionado se puede preparar por diversos procedimientos diferentes. El extracto se puede preparar como anteriormente o según el procedimiento desarrollado por el Dr. Huseyin Ziya Ozl (Patente de EE.UU. nº 5.135.745) describe un procedimiento de extracción en agua caliente para la preparación del extracto de la planta en agua. El extracto acuoso supuestamente, contiene varios polisacáridos con pesos moleculares que oscilan entre 2KD y 30 kD, oleandrina y oleandrogenina, odorósido y neritalósido. Los polisacáridos supuestamente incluyen
- 10 homopoligalacturonanos o arabinogalaturonanos ácidos. La patente de EE.UU. nº 5.869.060 de Selvaraj *et al.* describe extractos en agua caliente de la especie *Nerium* y métodos de producción de los mismos, p. ej., el ejemplo 2. El extracto resultante puede liofilizarse a continuación para producir un polvo. La patente de Estados Unidos nº 6.565.897 (Publicación previa a la concesión de EE.UU. nº 20020114852 y la publicación internacional PCT nº WO 2000/016793 de Selvaraj *et al.*) Describe un proceso de extracción en agua caliente para la preparación de un
- 15 extracto sustancialmente estéril. Erdemoglu *et al.* (*J. Ethnopharmacol.* (2003) Nov. 89(1), 123-129) describe los resultados para la comparación de los extractos acuosos y etanólicos de plantas, incluida *Nerium oleander*, en base a sus actividades antinocirreceptoras y antiinflamatorias. Extractos en disolventes orgánicos de *Nerium oleander* se describen en Adome *et al.* (*Afr. Health Sci.* (2003) 3 de agosto (2), 77-86; extracto etanólico), el-Shazly *et al.* (*J. Egipt Soc. Parasitol.* (1996), agosto 26(2), 461-473; extracto etanólico), Begum *et al.* (*Phytochemistry* (1999) febrero 50(3), 435-438; extracto metanólico), Zia *et al.* (*J. Ethnopharmacol.* (1995) Nov. 49(1), 33-39; extracto metanólico) y Vlasenko *et al.* (*Farmatsiia* (1972) sept.-oct. 21(5), 46-47; extracto alcohólico). La publicación de la solicitud de
- 20 patente previa a la concesión de EE.UU. nº 20040247660 de Singh *et al.* describe la preparación de una formulación liposómica de oleandrina estabilizada con proteínas para su uso en el tratamiento del cáncer. La publicación de la solicitud de patente previa a la concesión de EE.UU. nº 20050026849 de Singh *et al.* describe una formulación
- 25 soluble en agua de oleandrina que contiene una ciclodextrina. La publicación de la solicitud de patente previa a la concesión de EE.UU. nº 20040082521 de Singh *et al.* describe la preparación de formulaciones de oleandrina en nanopartículas estabilizadas con proteínas a partir del extracto de agua caliente.

- La extracción SCF puede llevarse a cabo en presencia de un modificador en el fluido supercrítico, tal como alcohol, p. ej. etanol, para mejorar la extracción del compuesto(s) deseado(s) a partir de la masa vegetal (documento
- 30 PCT/US06/29061 presentado el 26 de julio, 2005, documento US 7.402.325, y documento USSN 12/019435 presentado el 24 de enero, 2008(publicado como documento US 2008-0200401), o Newman *et al.* (*Mol. Interven.* (2008), 8, 36- 49). Los modificadores generalmente poseen volatilidad entre la del fluido supercrítico y del compuesto que se extrae, y deben ser miscibles con el fluido supercrítico. En algunas realizaciones, el modificador es un líquido en condiciones ambientales. A modo de ejemplo y sin limitación, un modificador se puede seleccionar
- 35 del grupo que consiste en etanol, metanol, propanol, acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno, etc.

Es posible que los extractos también difieren en su rendimiento relativo como se determina por la eficacia en los ensayos incluidos en la presente memoria. Aún así, si uno o más agentes farmacológicamente activos está presente en una cantidad o concentración suficientemente alta en el extracto para poder preparar una dosis terapéuticamente aplicable, entonces el extracto se considera parte de la invención.

- 40 El ejemplo 13 describe un método cromatográfico para el fraccionamiento de un extracto en SCF en cinco fracciones diferentes: O-H, O-2, O-3, O-4 y O-5. Las fracciones se prepararon cargando el extracto no fraccionado en una columna de gel de sílice-ODS equilibrada con agua y posteriormente eluyendo diferentes fracciones del extracto pasando sucesivamente varias porciones de fase móvil acuosa que varían en contenido de metanol (30%, 55%, 80% y 100%) a través de la columna, recogiendo los efluentes (fracciones) respectivos y concentrando los efluentes
- 45 por evaporación del disolvente a presión reducida para eliminar el disolvente, proporcionando de este modo las fracciones O-1 (u O-H), O-2, O-3, O-4 y O-5. Las fracciones se analizaron según el Ejemplo 14 y su composición por lo que respecta al glucósido cardíaco y otros componentes se determinó por cromatografía en capa fina utilizando un indicador colorante sensible que se adhiere a (y por lo tanto es útil para detectar) los glucósidos cardíacos. Además, se analizó la presencia o ausencia de glucósidos cardíacos en estas fracciones utilizando cromatografía
- 50 líquida/espectrometría de masas en tándem o detección por DAD-UV.

Una fracción o subfracción del extracto puede analizarse por cromatografía líquida empleando una fase estacionaria diferente del gel ODS-sílice y/o empleando una fase móvil diferente del agua. Ejemplos de fases estacionarias adecuadas se describen además en la presente memoria.

- Las FIG. 8A-8D representan los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de las fracciones Fr-O-1, Fr-O-2, Fr-O3 y FR-O-4 del ejemplo 13. Basándose en una comparación de los tiempos de retención obtenidos utilizando
- 55 muestras correspondientes de referencia externa, se determinó las fracciones (Fr-O-2 y Fr-O-3) que contienen derivados de oleandrina (glucósidos cardíacos), oleandrina (t.r. = 8,3 min) y otros componentes no identificados. La mayor parte de la oleandrina encontrada en el extracto en SCF no fraccionada original fue principalmente en la fracción Fr-O-3. La Fr-O-4 contenía cantidades no cuantificables de cualquier glucósido cardíaco. Por consiguiente,
- 60 la composición de las fracciones difería según el contenido de oleandrina, glucósido cardíaco y otros componentes no identificados.

Fracción	Oleandrina (S/N)	Otro glucósido cardíaco (S/N)	Neuroprotección (S/N)
O-H	N	N	Y
O-2	N	Y	N
O-3	Y	Y	Y
O-4 (O-4A)	N	N	Y
O-5	N	N	N

Estas fracciones se sometieron a continuación al ensayo en cortes cerebrales con neuroprotección detallado en el ejemplo 15 para determinar el nivel de neuroprotección proporcionada por cada uno. Los datos se representan en las figuras.4A-4E, en donde la actividad neuroprotectora de una solución acuosa que contiene extracto en SCF (23  $\mu\text{g/ml}$ ) se comparó con la de otras soluciones que contenían 0,03, 0,3 o 3  $\mu\text{g/ml}$  de otro(s) componente(s). Todas las fracciones se pesaron y compararon referidas a peso de masas iguales. Se determinó que las fracciones (descritas en la presente memoria) que contienen oleandrina, o glucósido cardíaco, así como algunas fracciones que no contienen oleandrina, o glucósido cardíaco, podrían proporcionar neuroprotección.

El rendimiento de la fracción O-4 del extracto en SCF en el ensayo para apoplejía en cortes cerebrales (Ejemplo 15) se comparó con la del extracto en SCF no fraccionado (PBI-05204). El rendimiento de cantidades variables (0,03 a 300  $\mu\text{g/ml}$ ) de la fracción O-4 se comparó con una cantidad fija (23  $\mu\text{g/ml}$  de oleandrina) de extracto. Los datos (FIG. 5) indican claramente que la fracción O-4 del extracto en SCF de *Nerium oleander* conserva su eficacia aún cuando no contiene oleandrina o cantidad detectable de cualquier otro glucósido cardíaco. Las barras de color más claro en la FIG. 5 indican diferencias significativas con respecto a la enfermedad de apoplejía (fijada en 0) por ANOVA seguido de la prueba de comparación de Dunnett a posteriori en el nivel de confianza de 0,05.

Por consiguiente, la invención proporciona varias fracciones terapéuticas de extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, fracciones que se seleccionan del grupo que consiste en: a) una fracción que comprende uno o más agentes farmacológicamente activos y que excluye oleandrina y otros glucósidos cardíacos, en donde la fracción proporciona neuroprotección; b) una fracción que comprende uno o más agentes farmacológicamente activos, oleandrina y uno o más otros glucósidos cardíacos, en donde la fracción proporciona neuroprotección; y c) una fracción diferente que comprende uno o más de otros agentes farmacológicamente activos (diferentes a los de a) anterior) y excluyendo oleandrina y otros glucósidos cardíacos, en donde la fracción proporciona neuroprotección.

La invención también proporciona un método de fraccionamiento de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* con el fin de proporcionar una o más de sus fracciones terapéuticamente eficaces. El método comprende: a) proporcionar un extracto de la especie *Nerium* o la especie *Thevetia*; b) fraccionar el extracto para proporcionar dos o más fracciones diferentes del extracto, un primer extracto que comprende uno o más agentes farmacológicamente activos, que no es un glucósido cardíaco, y excluyendo glucósido cardíaco, y un segundo extracto que comprende uno o más agentes farmacológicamente activos, que no es un glucósido cardíaco, y uno o más glucósidos cardíacos. En algunas realizaciones, el fraccionamiento se realiza por cromatografía líquida con una fase estacionaria y una fase móvil. En algunas realizaciones, la fase estacionaria comprende un medio seleccionado del grupo que consiste en resina de "fase inversa", una sustancia apolar inerte que consigue suficiente relleno para su uso en cromatografía, p. ej. compuesto de cadenas de carbono cortas (C8 a C18) unidas a sílice, sílice unida a ciano o sílice unida a fenilo, resinas de intercambio iónico (catiónicas o aniónicas), resina de "fase normal", p. ej. sílice o restos orgánicos con grupos funcionales ciano y amino. En algunas realizaciones, la fase móvil comprende un disolvente seleccionado del grupo que consiste en agua, metanol, etanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, soluciones acuosas tamponadas o una de sus mezclas. En algunas realizaciones, la fase móvil comprende metanol acuoso, en donde el contenido de metanol se incrementa sucesivamente desde aproximadamente 30% hasta 100% y la fase estacionaria es ODS-gel de sílice. La cromatografía puede llevarse a cabo utilizando fase móvil de elución en gradiente, fase móvil de elución paso a paso o fase móvil de composición fija.

Una fracción de extracto puede subfraccionarse para proporcionar dos o más subfracciones diferentes de una fracción de extracto. El subfraccionamiento puede llevarse a cabo por cromatografía líquida de la fracción. Una fase estacionaria adecuada para cromatografía líquida puede comprender gel de sílice u otras resinas tales como medios de intercambio iónico, alúmina o material C18 no unido y una fase móvil adecuada para cromatografía líquida puede comprender una combinación de dos o más disolventes orgánicos que difieren en la polaridad: un disolvente orgánico menos polar y un disolvente orgánico más polar. Un disolvente orgánico polar adecuado puede ser

tetrahidrofurano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, n-butanol, isopropanol, n-propanol, etanol, metanol, ácido acético y agua. Un disolvente orgánico apolar adecuado puede ser acetato de etilo, pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, 1,4-dioxano, cloroformo o éter dietílico.

- Los agentes de tamponamiento para su uso en soluciones tamponadas incluyen cualquiera de los ya conocidos en la técnica de la cromatografía líquida. Ejemplos de agentes tamponantes incluyen los que contienen fosfato, acetato, citrato, formiato, fosfato, ácido trifluoroacético, cloroacetato, sulfonato, alquilamina, TAE, TBE, amoníaco, BuffAR, carbonato, HEPES, MES, tiocianato, CAPS, CHES, guanidina, MOPS, PIPES, TRIS, sulfato, hidróxido, haluro de metal alcalino, tricina, o iones de aminoácidos o una de sus combinaciones. Uno o más agentes de emparejamiento iónico y/o uno o más modificadores orgánicos también pueden incluirse en la fase móvil.
- 10 Otros tipos de cromatografía que se pueden usar para fraccionar el extracto incluyen cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de fase normal, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba o una de sus combinaciones. También es posible utilizar formas combinadas de diferentes tipos de cromatografía. Una fase estacionaria puede incluir un medio que es una combinación de dos o más medios diferentes utilizados para cromatografía de fase inversa, de exclusión por tamaño, de intercambio iónico o de interacción hidrófoba, p. ej. una combinación de fase inversa, fase estacionaria y fase estacionaria de exclusión por tamaño, combinación de fase inversa fase estacionaria y la fase estacionaria de intercambio iónico, u otras de dichas combinaciones o dos, tres o cuatro medios diferentes de fase estacionaria. El medio de fase estacionaria puede ser poroso, no poroso, superficie porosa, poroso difusivo o totalmente poroso.

- La invención proporciona un método de fraccionamiento de un extracto que comprende: a) proporcionar un extracto del extracto obtenido a partir de la especie Nerium o de la especie Thevetia; b) fraccionar el extracto por cromatografía en columna, con ODS-gel de sílice como fase estacionaria y metanol acuoso como fase móvil, para proporcionar al menos dos fracciones diferentes: una primera fracción que comprende al menos un glucósido cardíaco y al menos un agente farmacológicamente activo de glucósido no cardíaco, y otra fracción excluyendo glucósido cardíaco y que comprende al menos un agente farmacológicamente activo de glucósido no cardíaco; c1) subfraccionar la otra fracción de b) por cromatografía en columna, con gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de al menos dos disolventes orgánicos que difieren en polaridad como fase móvil, para proporcionar al menos dos subfracciones diferentes: una subfracción que comprende uno o más esteroides y uno o más triterpenos, y otro subfracción que comprende dos o más triterpenos diferentes y que excluye un esteroide, en donde los subfracciones excluyen glucósido cardíaco.
- 30 En algunas realizaciones, el método comprende además: c2) subfraccionar la primera fracción de b) por cromatografía en columna, con gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de al menos dos disolventes orgánicos que difieren en polaridad como fase móvil, para proporcionar al menos dos subfracciones diferentes: una subfracción que comprende uno o más esteroides y uno o más triterpenos, y otro subfracción que comprende dos o más diferentes triterpenos y que excluye un esteroide, en donde una o ambas de las subfracciones comprende además glucósido cardíaco.

- El extracto o una de sus fracciones o subfracciones, puede formularse en cualquier forma farmacéutica adecuada farmacéuticamente aceptable. Son particularmente útiles las formas farmacéuticas parenteral, ótica, oftálmica, nasal, inhalable, bucal, sublingual, entérica, tópica, bucal, oral e inyectable. Formas farmacéuticas concretas incluyen formas farmacéuticas sólidas o líquidas. Ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, comprimidos oblongos, grageas, sobres, solución, suspensión, dispersión, vial, bolsa, botella, líquido inyectable, líquido administrable por vía i.v. (intravenosa), im (intramuscular) o ip (intraperitoneal) y otras de dichas formas farmacéuticas conocidas por los expertos con conocimientos ordinarios en las ciencias farmacéuticas.

- La cantidad de extracto o una de sus fracciones o subfracciones, incorporada en una dosis de la invención será al menos una o más formas farmacéuticas y puede seleccionarse según principios conocidos de farmacia. Una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente aplicable de compuesto terapéutico se contempla específicamente. Por la expresión "cantidad eficaz", se entiende que, con respecto a, por ejemplo, productos farmacéuticos, se contempla una cantidad farmacéuticamente eficaz. Una cantidad farmacéuticamente eficaz es la cantidad de ingrediente activo que es suficiente para que la respuesta terapéutica requerida o deseada, o en otras palabras, la cantidad, que es suficiente para provocar una respuesta biológica apreciable cuando, se administra a un paciente.
- 50 La respuesta biológica apreciable puede ocurrir como resultado de la administración de dosis únicas o múltiples de una sustancia activa. Una dosis puede comprender una o más formas farmacéuticas. Debe entenderse que el nivel de dosis específico para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores, incluidos la indicación que se está tratando, la gravedad de la indicación, la salud del paciente, la edad, el sexo, el peso, la alimentación, la respuesta farmacológica, la forma farmacéutica específica empleada y otros factores.

- 55 La dosis deseada para administración oral es de hasta 5 formas farmacéuticas aunque como poco una y como mucho diez formas farmacéuticas se pueden administrar como una sola dosis. Los ejemplos de formas farmacéuticas contienen de 0,1 a 5 mg del extracto en SCF por forma farmacéutica, para un total de 0,1 a 500 mg (1 a 10 niveles de dosis) por dosis. Las dosis se administrarán según pautas posológicas de administración que pueden estar predeterminadas y/o adaptadas para conseguir la respuesta terapéutica específica o la utilidad clínica en un individuo.



Para su uso en el tratamiento de mamíferos, el extracto, o una de sus fracciones o subfracciones, puede incluirse en una forma farmacéutica. Algunas realizaciones de la forma farmacéutica no tienen recubrimiento entérico y liberan su carga de extracto den un periodo de 0,5 a 1 hora o menos. Algunas realizaciones de la forma farmacéutica tienen recubrimiento entérico y liberan su carga de glucósido cardíaco aguas abajo del estómago, tal como en el yeyuno, 5 íleon, intestino delgado, y/o el intestino grueso (colon). Las formas farmacéuticas entéricamente recubiertas liberarán el extracto en la circulación general en 1-10 horas después de la administración oral.

Hay que señalar que un compuesto en la presente memoria podría poseer una o más funciones en la formulación de la invención. Por ejemplo, un compuesto podría servir tanto como tensioactivo como disolvente miscible en agua o tanto como tensioactivo como disolvente inmiscible en agua.

10 Una composición líquida puede comprender uno o más excipientes líquidos farmacéuticamente aceptables. El excipiente líquido puede ser un excipiente acuoso, no acuoso, polar, apolar y/u orgánico. Los excipientes líquidos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, un disolvente miscible en agua, disolvente inmiscible en agua, agua, tampón y una de sus mezclas.

Tal como se emplea en la presente memoria, las expresiones "disolvente soluble en agua" o "disolvente miscible en 15 agua", expresiones que se utilizan indistintamente, se refieren a un líquido orgánico que no forma una mezcla bifásica con agua o es suficientemente soluble en agua para proporcionar una mezcla de disolvente acuoso que contiene al menos cinco por ciento de disolvente sin separación de fases líquidas. El disolvente es adecuado para la administración a seres humanos o animales. Los ejemplos de disolventes solubles en agua incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, PEG (poli(etilenglicol)), PEG 400 (poli(etilenglicol que tiene un peso molecular aproximado 20 de alrededor de 400), etanol, acetona, alcanol, alcohol, éter, propilenglicol, glicerina, triacetina, poli(propilenglicol), PVP (poli(pirrolidona de vinilo)), sulfóxido de dimetilo, N,N-dimetilformamida, formamida, N,N-dimetilacetamida, piridina, propanol, N- metil-acetamida, butanol, Soluphor (2-pirrolidona), Pharmsolve (N-metil-2- pirrolidona).

Como se emplea en la presente memoria, las expresiones "disolvente insoluble en agua" o "disolvente inmiscible en 25 agua", términos que se utilizan indistintamente, se refieren a un líquido orgánico que forma una mezcla bifásica con agua o proporciona una separación de fases cuando la concentración del disolvente en agua supera el cinco por ciento. El disolvente es adecuado para la administración a seres humanos o animales. Ejemplos de disolventes insolubles en agua incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, triglicéridos de cadena media/larga, aceite, aceite de ricino, aceite de maíz, vitamina E, derivados de vitamina E, ácido oleico, ácidos grasos, aceite de oliva, Softisan 645 (caprilato/caprato/estearato/hidroxi adipato estearato de diglicerilo), Migliol, Captex (Captex 350: triglicérido de 30 gliceril tricaprilato/caprato/laurato; Captex 355: triglicérido de gliceril tricaprilato/caprato; Captex 355 EP/NF: triglicérido de cadena media de gliceril tricaprilato/caprato).

Los disolventes adecuados se enumeran en la "International Conference on Harmonisation of Technical 35 Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidance for industry Q3C *Impurities: Residual Solvents*" (1997), que hace recomendaciones sobre qué cantidades de disolventes residuales se consideran seguras en productos farmacéuticos. Ejemplos de disolventes se catalogan como disolventes de clase 2 o clase 3. Los disolventes de clase 3 incluyen, por ejemplo, ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de butilo, éter metil-terc-butílico, cumeno, etanol, éter etílico, acetato de etilo, formiato de etilo, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, metil-1-butanol, metiletil-cetona, metilisobutil-cetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol o acetato de propilo.

40 Otros materiales que pueden utilizarse como disolventes inmiscibles en agua en la invención incluyen: Captex 100: dicaprato de propilenglicol; Captex 200: dicaprilato/dicaprato de propilenglicol; Captex 200 P: dicaprilato/dicaprato de propilenglicol; dicaprilocaprato de propilenglicol; Captex 300: tricaprilato/caprato de glicerilo; Captex 300 EP/NF: triglicéridos de cadena media de tricaprilato/caprato de glicerilo; Captex 350: tricaprilato/caprato/laurato de glicerilo; Captex 355: tricaprilato/caprato de glicerilo; Captex 355 EP/NF: triglicéridos de cadena media de tricaprilato/caprato 45 de glicerilo; Captex 500: Triacetina; Captex 500 P: triacetina (calidad farmacéutica); Captex 800: di(2-etilhexanoato) de propilenglicol; Captex 810 D: tricaprilato/caprato/linoleato de glicerilo; Captex 1000: tricaprato de glicerilo; Captex CA: triglicéridos de cadena media; Captex MCT-170: triglicéridos de cadena media; Capmul GMO: monooleato de glicerilo; Capmul GMO-50 EP/NF: monooleato de glicerilo; Capmul MCM: mono- y diglicéridos de cadena media; Capmul MCM C8: monocaprilato de glicerilo; Capmul MCM C10: monocaprato de glicerilo; Capmul PG-8: 50 monocaprilato de propilenglicol; Capmul PG-12: monolaurato de propilenglicol; Caprol 10G100: decaoleato de decaglicerol; Caprol 3GO: monooleato de triglicerol; Caprol ET: poliglicerol éster de ácidos grasos mezclados; Caprol MPGO: dioleato de hexaglicerol; Caprol PGE 860: mono-, dioleato de decaglicerol.

Como se emplea en la presente memoria, un "tensioactivo" se refiere a un compuesto que comprende restos polares o hidrófilos cargados, así como restos hidrófobos (lipófilos) apolares; es decir, un agente tensioactivo es anfífilo. El 55 término tensioactivo puede referirse a uno o una mezcla de compuestos. Un agente tensioactivo puede ser un agente disolvente, un agente emulsionante o un agente dispersante. Un agente tensioactivo puede ser hidrófilo o hidrófobo.

El tensioactivo hidrófilo puede ser cualquier tensioactivo hidrófilo adecuado para uso en composiciones farmacéuticas. Dichos tensioactivos pueden ser aniónicos, catiónicos, iónicos bipolares o no iónicos, aunque

actualmente se prefieren los tensioactivos hidrófilos no iónicos. Como se discutió anteriormente, estos tensioactivos hidrófilos no iónicos tendrán generalmente valores de HLB mayores que aproximadamente 10. Las mezclas de tensioactivos hidrófilos también están dentro del alcance de la invención.

- 5 Asimismo, el tensioactivo hidrófobo puede ser cualquier tensioactivo hidrófobo adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas. En general, los tensioactivos hidrófobos adecuados tendrán un valor de HLB menor de aproximadamente 10. Las mezclas de tensioactivos hidrófobos también están dentro del alcance de la invención.

- 10 Los ejemplos de disolventes adecuados adicionales incluyen: alcoholes y polioles, tales como etanol, isopropanol, butanol, alcohol bencílico, etilenglicol, propilenglicol, butanodiolos y sus isómeros, glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcutool, dimetil-isosorbida, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, hidroxipropil-metilcelulosa y otros derivados de celulosa, ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina; éteres de polietilenglicoles o que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 200 a aproximadamente 6000, tales como éter de alcohol tetrahidrofurfurílico y PEG (glicofurool, disponible en el mercado en BASF con la denominación comercial Tetraglicol) o metoxi PEG (Union Carbide); amidas, tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona, caprolactama, N-alquilpirrolidona, N-hidroalquilpirrolidona, N-alquimpiperidona, N-alquicaprolactama, dimetilacetamida, y polividona; ésteres, tales como propionato de etilo, citrato de tributilo, trietilcitrato de acetilo, citrato de acetiltributilo, citrato de trietilo, oleato de etilo, caprilato de etilo, butirato de etilo, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol, caprolactona y sus isómeros, valerolactona y sus isómeros, butirolactona y sus isómeros; y otros disolventes conocidos en la técnica, tales como dimetilacetamida, dimetilisorbida (Arlasolve DMI (ICI)), N-metil-pirrolidonas (Pharmasolve (ISP)), monoctanoína, éter nonoetílico de dietilenglicol (disponible en Gattefosse con la denominación comercial 20 Transcutol) y agua. Las mezclas de disolventes están también dentro del alcance de la invención.

A excepción de lo indicado, los compuestos mencionados en la presente memoria están fácilmente disponibles en los proveedores comerciales habituales.

La composición líquida transparente es clara a simple vista, ya que contiene menos de 5%, menos de 3% o menos de 1% en peso de sólidos en suspensión referidos al peso total de la composición.

- 25 Aunque no es necesario, una composición o kit de la presente invención pueden incluir un agente quelante, conservante, antioxidante, adsorbentes, agente acidificante, agente alcalinizante, agente antiespumante, agente tamponante, colorante, electrolito, sal, estabilizador, modificador de tonicidad, diluyente, otro excipiente farmacéutico, o una de sus combinaciones.

- 30 Como se emplea en la presente memoria, el término "antioxidante" quiere decir un agente que inhibe la oxidación y por lo tanto se utiliza para prevenir el deterioro de preparaciones por el proceso oxidativo. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ácido ascórbico, palmitato ascórbico, vitamina E, derivado de vitamina E, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monoglicérol, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metalbisulfito de sodio y otros materiales conocidos por los cualquier experto en la técnica.

- 35 Como se emplea en la presente memoria, el término agente quelante quiere decir un compuesto que quela iones metálicos en solución. Ejemplos de agentes quelantes incluyen EDTA (etilendiamintetraacetato tetrasódico), DTPA (dietilentriaminpentaacetato pentasódico), HEDTA (sal trisódica del ácido N-(hidroxietil)-etilendiamintriácico), NTA (nitrilotriacetato trisódico), etanoldiglicina disódica (Na<sub>2</sub>EDG), dietanoglicina de sodio (DEGNa), ácido cítrico y otros compuestos conocidos por cualquier experto en la técnica.

- 40 Como se emplea en la presente memoria, el término "adsorbente" quiere decir un agente capaz de mantener otras moléculas en su superficie por medios físicos o químicos (quimisorción). Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, carbón vegetal en polvo y activado y otros materiales conocidos para cualquier experto en la técnica.

- 45 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente alcalinizante" quiere decir un compuesto utilizado para proporcionar un medio alcalino. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, solución de amoníaco, carbonato de amonio, dietanolamina, monoetanolamina, hidróxido de potasio, borato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, trietanolamina y trolamina y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

- 50 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente acidificante" quiere decir un compuesto utilizado para proporcionar un medio ácido. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ácido acético, aminoácido, ácido cítrico, ácido fumárico y otros alfa-hidroxiácidos, ácido clorhídrico, ácido ascórbico y ácido nítrico y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

- 55 Como se emplea en la presente memoria, el término "agente antiespumante" quiere decir un compuesto o compuestos que evita o reduce la cantidad de formación de espuma que se forma en la superficie de la composición de relleno. Agentes antiespumantes adecuados incluyen a modo de ejemplo y sin limitación, dimeticona, SIMETICONA, octoxinol y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "agente tamponante" quiere decir un compuesto utilizado para resistir un cambio de pH después de dilución o adición de ácido o álcali. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, metafosfato de potasio, fosfato de potasio, acetato de sodio monobásico y citrato de sodio anhidro y dehidrato y otros de dichos materiales conocidos por cualquier experto en la técnica.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, el término "diluyente" o "carga" quiere decir sustancias inertes utilizadas como cargas para crear el volumen deseado, propiedades de flujo y características de compresión en la preparación de comprimidos y cápsulas. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, fosfato dibásico de calcio, caolín, lactosa, sacarosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, carbonato de calcio precipitado, sorbitol y almidón y otros materiales conocidos para cualquier experto en la técnica.
- 10 Como se emplea en la presente memoria, el término "conservante" quiere decir un compuesto utilizado para evitar el crecimiento de microorganismos. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico, timerosal, metacresol, cloruro de miristilgamma picolinio, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio, ácido sórbico, timol, y
- 15 metil, etil, propil o butil parabenos y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "colorante" quiere decir un compuesto utilizado para dar color a las preparaciones farmacéuticas. Dichos compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, FD & C Rojo nº 3, FD & C Rojo nº 20, FD & C Amarillo nº 6, FD & C Azul nº 2, FD & C Verde nº 5, FD & C Naranja nº 5, FD & C Rojo nº 8, caramelo y óxido de hierro (negro, rojo, amarillo), otros colorantes FD & C y agentes colorantes naturales como el

20 extracto de pellejo de uva, polvo rojo de remolacha, beta-caroteno, achiote, carmín, cúrcuma, pimentón, sus combinaciones y otros tales materiales conocidos por cualquier experto en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "estabilizador" quiere decir un compuesto utilizado para estabilizar un agente activo contra los procesos físicos, químicos o bioquímicos que de otro modo reducirían la actividad terapéutica del agente. Los estabilizadores adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación,

25 albúmina, ácido siálico, creatinina, glicina y otros aminoácidos, niacinamida, acetiltriptofonato de sodio, óxido de zinc, sacarosa, glucosa, lactosa, sorbitol, manitol, glicerol, polietilenglicoles, caprilato de sodio y sacarina de sodio y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "modificador de tonicidad" quiere decir un compuesto o compuestos que se pueden utilizar para ajustar la tonicidad de la formulación líquida. Los modificadores de tonicidad

30 adecuados incluyen glicerina, lactosa, manitol, dextrosa, cloruro de sodio, sulfato de sodio, sorbitol, trehalosa y otros conocidos por cualquier experto en la técnica.

La composición de la invención también pueden incluir aceites, tales como aceites fijos, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva; ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico; y ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo,

35 glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. La composición también puede incluir alcoholes tal como etanol, isopropanol, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol; cetales de glicerol tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol; éteres tales como poli(etilenglicol) 450; hidrocarburos del petróleo tales como aceite mineral y vaselina; agua; un tensioactivo farmacéuticamente adecuado, agentes de suspensión o agentes emulsionantes; o una de sus mezclas.

40 Debe entenderse que los compuestos utilizados en la técnica de la formulación farmacéutica generalmente sirven para una variedad de funciones o propósitos. Así, si un compuesto nombrado en la presente memoria se menciona solamente una vez o se usa para definir más de un término en la presente memoria, su propósito o función no debe interpretarse como limitada exclusivamente a este fin(es) o función o funciones nombrado(s).

Uno o más de los componentes de la formulación pueden estar presentes en su forma de base libre o sal

45 farmacéutica o analíticamente aceptable. Como se emplea en la presente memoria, "sal farmacéutica o analíticamente aceptable" se refiere a un compuesto que ha sido modificado por reacción del mismo con un ácido, según sea necesario para formar un par iónicamente unido. Los ejemplos de sales aceptables incluyen sales atóxicas convencionales formadas, por ejemplo, por ácidos inorgánicos u orgánicos atóxicos. Las sales atóxicas adecuadas incluyen las procedentes de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfónico,

50 sulfámico, fosfórico, nítrico y otros conocidos por cualquier experto en la técnica. Las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como aminoácidos, acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metansulfónico, etandisulfónico, oxálico, isetiónico, y otros conocidos por cualquier experto en la técnica. Las listas de otras sales adecuadas se encuentran en Remington's

55 Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, pág. 1418.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que están, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su utilización en contacto con tejidos de seres humanos y animales y sin excesiva toxicidad,

irritación, respuesta alérgica, o cualquier otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Una forma farmacéutica se puede preparar por cualquier medio convencional conocido en la industria farmacéutica. Una forma farmacéutica líquida puede prepararse proporcionando al menos un excipiente líquido y oleandrina o extracto que contiene oleandrina en un recipiente. En la forma farmacéutica líquida pueden incluirse uno u otros excipientes más. Una forma farmacéutica sólida puede prepararse al proporcionar al menos un excipiente sólido y oleandrina o extracto que contiene oleandrina. Uno o más otros excipientes pueden estar incluidos en la forma farmacéutica sólida.

Una forma farmacéutica puede envasarse utilizando equipos y materiales de envasado convencionales. Puede estar incluido en un paquete, botella, vía, bolsa, jeringuilla, sobre, paquete, paquete blíster, caja, ampolla u otro de dichos recipientes.

La descripción incluye un método para mejorar el estado clínico de un número estadísticamente significativo de individuos en una población de individuos que tienen una enfermedad neurológica, método que comprende: administrar a la población de individuos un extracto de *la especie Nerium o de la especie Thevetia*, o una de sus composiciones; y determinar el estado clínico de los individuos para establecer el estado clínico mejorado. En algunas realizaciones, el número estadísticamente significativo es de al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de la población. En algunas realizaciones, el extracto comprende uno o más de otros compuestos farmacológicamente activos. En otras realizaciones, el extracto comprende uno o más compuestos farmacológicamente activos que cooperan con oleandrina u otro glucósido cardíaco para mejorar el estado clínico de los individuos.

Oleandrina puede adquirirse en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). En la siguiente experimentación, los ejemplos que se refieren a la composición que contiene glucósido cardíaco no son según la invención.

Ejemplo 1 de referencia

Extracción en fluidos supercríticos de hojas de adelfa en polvo

25 *Método A. Con dióxido de carbono.*

Se prepararon hojas de adelfa en polvo recolectando, lavando y secando material de hojas de adelfa, a continuación, pasando el material de hojas de adelfa a través de un aparato de trituración y deshidratación tal como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.236.132, n° 5.598.979, n° 6.517.015 y n° 6.715.705. El peso del material de partida utilizado fue 3,94 kg.

30 El material de partida se combinó con CO<sub>2</sub> puro a una presión de 300 bar (30 MPa, 4.351 psi) y una temperatura de 50°C (122°F) en un dispositivo extractor. Se utilizó un total de 197 kg de CO<sub>2</sub>, para dar una relación de disolvente a materia prima de 50:1. La mezcla de CO<sub>2</sub> y materia prima se pasó a continuación a través de un dispositivo separador, que cambió la presión y la temperatura de la mezcla y separó el extracto del dióxido de carbono.

35 El extracto (65 g) se obtuvo como un material viscoso, pegajoso, parduzco que tiene una fragancia agradable. El color probablemente era producido por la clorofila. Para una determinación exacta de rendimiento, los tubos y el separador se enjuagaron con acetona y la acetona se evaporó para dar 9 g más de extracto. La cantidad total de extracto fue de 74 g. Referido al peso del material de partida, el rendimiento del extracto fue de 1,88%. Se calculó el contenido de oleandrina en el extracto utilizando cromatografía de líquidos a alta presión y espectrometría de masas para ser 560,1 mg, o un rendimiento de 0,76%.

40 *Método B. Con mezcla de dióxido de carbono y etanol*

Se prepararon hojas de adelfa en polvo recolectando, lavando y secando material de hojas de adelfa, a continuación, pasando el material de hojas de adelfa a través de un aparato de trituración y deshidratación tal como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.236.132, n° 5.598.979, n° 6.517.015 y n° 6.715.705. El peso del material de partida utilizado fue 3,85 kg.

45 El material de partida se combinó con CO<sub>2</sub> puro y 5% de etanol como modificador a una presión de 280 bar (28 MPa, 4.061 psi) y una temperatura de 50°C (122°F) en un dispositivo extractor. Se utilizó un total de 160 kg de CO<sub>2</sub> y 8 kg de etanol, para dar una relación de disolvente a materia prima de 43,6 a 1. La mezcla de CO<sub>2</sub>, etanol y materia prima, se pasó a continuación a través de un dispositivo separador, que cambió la la presión y la temperatura de la mezcla y se separó el extracto del dióxido de carbono.

50 El extracto (207 g) se obtuvo después de la eliminación del etanol como una masa viscosa, pegajosa, de color verde oscuro, que contiene obviamente algo de clorofila. Referido al peso del material de partida, el rendimiento del extracto fue 5,38%. Se calculó el contenido de oleandrina en el extracto utilizando cromatografía de líquidos a alta presión y espectrometría de masas que fue 1,89 g, o un rendimiento de 2,1%.

Ejemplo 2 de referencia

Extracción de agua caliente de hojas de adelfa en polvo.

La extracción en agua caliente se utiliza normalmente para extraer oleandrina y otros componentes activos de las hojas de adelfa. Ejemplos de procedimientos de extracción en agua caliente pueden encontrar se en las patentes de EE.UU. nº 5.135.745 y nº 5.869.060.

Se llevó a cabo una extracción en agua caliente utilizando 5 g de hojas de adelfa en polvo. Diez volúmenes de agua hirviendo (en peso del material de partida de adelfa) se añadieron a las hojas de adelfa en polvo y la mezcla se agitó constantemente durante 6 horas. La mezcla se filtró a continuación y el residuo de hojas se recogió y se extrajo de nuevo en las mismas condiciones. Los filtrados se combinaron y se liofilizaron. El aspecto del extracto era de color marrón. El material de extracto seco pesó alrededor de 1,44 g. Se disolvieron en agua 34,21 mg del material del extracto y se sometieron a análisis de contenido de oleandrina utilizando cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas. La cantidad de oleandrina se determinó que era 3,68 mg. El rendimiento de oleandrina, referido a la cantidad de extracto, se calculó que era 0,26%. La tabla siguiente muestra una comparación entre los rendimientos oleandrina para las dos extracciones en dióxido de carbono supercrítico del Ejemplo 1 y la extracción en agua caliente.

Comparación de rendimientos

Medio de extracción	Rendimiento de oleandrina, referido al peso total de extracto
Dióxido de carbono supercrítico: Ejemplo 1, Método A	0,76%
Dióxido de carbono supercrítico: Ejemplo 1, Método B	2,1%
Extracción en agua caliente: Ejemplo 2	0,26%

Ejemplo 3

Ejemplo 3 de referencia

20 Tratamiento de la enfermedad neurológica incluido pero no limitado a la enfermedad de Alzheimer.

*Método A. Tratamiento con extracto*

A un individuo que presenta la enfermedad de Alzheimer se le prescribe glucósido cardíaco, y se le administran dosis terapéuticamente aplicables según una pauta posológica de administración prescrita durante un período. Se determina periódicamente el nivel de la respuesta terapéutica en el individuo. Si el nivel de la respuesta terapéutica es demasiado bajo a una dosis, entonces se incrementa la dosis según un programa de incremento de dosis predeterminado hasta que se alcanza el nivel deseado de respuesta terapéutica en el individuo. El tratamiento del individuo con el extracto, o una de sus fracciones o subfracciones, se continúa según sea necesario y la dosis o pauta posológica de dosificación se puede ajustar según sea necesario hasta que el paciente alcanza el criterio de valoración clínico deseado.

30 *Método B. Politerapia: extracto y otro agente terapéutico*

Se siguió el método A, anterior, excepto que al individuo se le prescribe y se administra uno o más de otros agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, o síntomas de los mismos. A continuación se pueden administrar uno u otros agentes terapéuticos más antes, después o con el extracto. También se puede realizar el incremento (o disminución) de la dosis de uno u otros agentes terapéuticos más. Uno u otros agentes terapéuticos adecuados más incluyen Namenda™ (HCl de memantina), Aricept™ (donepezil), Razadyne™ (galantamina), Exelon™ (rivastigmina), Cognex™ (tacrina), y amantadina.

Ejemplo 4 de referencia

Tratamiento de la enfermedad neurológica incluido pero no limitado a la enfermedad de Huntington.

*Método A. Tratamiento con extracto*

40 A un individuo que presenta la enfermedad de Huntington se prescribe el extracto, y se le administran dosis terapéuticamente aplicables según una pauta posológica de administración prescrita durante un período. Se determina periódicamente el nivel de respuesta terapéutica del individuo. Si el nivel de la respuesta terapéutica es

demasiado bajo a una dosis, entonces se incrementa la dosis según un programa predeterminado de incremento de la dosis hasta que se alcanza el nivel deseado de respuesta terapéutica en el individuo. El tratamiento del individuo con extracto se continúa según sea necesario y la dosis o la pauta posológica de administración se puede ajustar según sea necesario hasta que el paciente alcanza el criterio de valoración clínico deseado. Las dosis administradas pueden ser similares a las del ejemplo 3 o como se describe de otro modo en la presente memoria.

*Método B. Politerapia: extracto y otro agente terapéutico*

Se sigue el método A, anterior, excepto que al individuo se prescribe y administra uno u otros agentes terapéuticos más para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, o uno de sus síntomas. Uno u otros agentes terapéuticos más se pueden administrar antes, después o con el glucósido cardíaco. También se puede realizar el incremento (o disminución) de la dosis de uno u otros agentes terapéuticos más. Uno u otros agentes terapéuticos adecuados más incluyen la vitamina E, Baclofén (derivado del CoQ10), Lamotrigina (anticonvulsivo), remacemida (anestésico que es un antagonista de NMDA de baja afinidad), y riluzol (bloqueador de canales de Na).

Ejemplo 5 de referencia

Tratamiento de la enfermedad neurológica incluido pero no limitado a una apoplejía isquémica.

15 *Método A. Tratamiento con extracto*

A un individuo que presenta apoplejía isquémica se prescribe el extracto, y se le administran las dosis terapéuticamente aplicables según una pauta posológica de administración prescrita durante un período. Se determina periódicamente el nivel de la respuesta terapéutica del individuo. Si el nivel de la respuesta terapéutica es demasiado bajo a una dosis, entonces la dosis se incrementa según un programa de incremento predeterminado de la dosis hasta que se alcanza el nivel deseado de respuesta terapéutica en el individuo. El tratamiento del individuo con el extracto se continúa según sea necesario y la dosis o pauta posológica de administración se puede ajustar según sea necesario hasta que el paciente alcanza el criterio de valoración clínico deseado. Las dosis administradas pueden ser similares a las del ejemplo 3 o como se describe de otro modo en la presente memoria.

*Método B. Politerapia: extracto y otro agente terapéutico*

25 Se siguió el método A, anterior, excepto que al individuo se le prescribe y administra uno u otros agentes terapéuticos más para el tratamiento de la apoplejía isquémica, o uno de sus síntomas. Uno u otros agentes terapéuticos más se pueden administrar antes, después o con el extracto. También se puede realizar el incremento (o la disminución) de la dosis de uno u otros agentes terapéuticos más.

Ejemplo 6 de referencia

30 Análisis por HPLC de soluciones que contienen oleandrina

Se analizaron muestras (oleandrina patrón, extracto en SCF y el extracto en agua caliente) por HPLC (Waters) utilizando las siguientes condiciones: columna C18 Symmetry (5,0  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm D.I.; Waters); fase móvil de MeOH: agua = 54:46 (v/v) y caudal a 1,0 ml/min. La longitud de onda de detección se fijó en 217 nm. Las muestras se prepararon disolviendo el compuesto o extracto en una cantidad fija de disolvente de HPLC para conseguir una concentración objetivo aproximada de oleandrina.

Ejemplo 7 de referencia

Determinación de la expresión de  $\alpha 3$  y  $\alpha 1$  en tejido neuronal normal

Pueden seguirse los procedimientos establecidos en la solicitud internacional PCT n° PCT/US08/82641, presentada el 6 de noviembre de 2008 en nombre de Phoenix Biotechnology, Inc.

40 Ejemplo 8 de referencia

Evaluación de un glucósido cardíaco y un extracto de la invención en un ensayo *in vitro* para la apoplejía y sin apoplejía

*Método A. Apoplejía: Preparación de cortes cerebrales corticales y OGD.*

Se prepararon cortes cerebrales neocorticales de crías de ratas Sprague-Dawley PND 7. La corteza cerebral se disecó, se cortó en secciones delgadas de 400  $\mu$  de espesor y se transfirió a un recipiente que contenía líquido cefalorraquídeo artificial frío con MK-801 1  $\mu\text{M}$  antes del cultivo en placas; MK-801 no se incluyó en ninguno de los procedimientos posteriores. Para imitar la lesión isquémica utilizando la privación temporal de oxígeno-glucosa (OGD), cortes de un hemisferio de cada cerebro se expusieron a líquido cefalorraquídeo artificial barbotado con  $\text{N}_2$ , sin glucosa durante 7,5 min en un medio bajo en  $\text{O}_2$  (0,5%). Los cortes de OGD se sembraron a continuación en placas, uno al lado del otro con cortes de referencia del hemisferio contralateral en membranas permeables de nitrocelulosa o Millicell (Millipore), que se prepararon de forma idéntica excepto para las sin OGD. Treinta minutos

después de la siembra en placas, los pares de cortes cerebrales se transfectaron, se transfirieron a placas de 24 pocillos, y se incubaron a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub> en cámaras humidificadas. En cada experimento, se utilizó 5-6 minutos de privación de oxígeno-glucosa (OGD) para provocar > 50% de pérdida de neuronas corticales sanas en 24 h. Se utilizó una concentración fijada (3 µM) de neriifolina (glucósido cardíaco) como referencia positiva interna.

5 Para oleandrina (glucósido cardíaco), las tres concentraciones de 0,3 a 3 µM parecieron proporcionar neuroprotección en los dos primeros experimentos, por lo que las concentraciones de oleandrina ensayadas se redujeron en la tercera serie y sugirieron que la concentración umbral para la neuroprotección se encuentra entre 0,1 y 0,3 µM. El extracto no fraccionado, por ejemplo, de la especie *Nerium*, o una de sus fracciones también pueden utilizarse como se describe para la oleandrina.

10 *Método B. Sin derrame cerebral: ensayo de cortes cerebrales.*

Oleandrina y PBI-05204, un extracto en SCF no fraccionado de *Nerium oleander*, se ensayaron en cortes cerebrales "sin derrame cerebral"; es decir, los que se cortaron y transfectaron con YFP pero no se sometieron a traumatismo adicional mediante OGD. Véase el procedimiento experimental descrito anteriormente. Los inventores han observado que un número de compuestos neuroprotectores, incluida neriifolina, puede proporcionar niveles modestos de neuroprotección a dichos cortes cerebrales, supuestamente mediante al proteger contra el traumatismo causado por el propio proceso de corte y cultivo. Los datos demuestran que oleandrina y el extracto parecían ser capaces de proporcionar neuroprotección a dichas cortes cerebrales "sin OGD" a niveles similares a los de neriifolina, lo que significa que los glucósidos cardíacos actúan como mediadores en la neuroprotección, incluso en ausencia de oxígeno o privación de glucosa.

20 Ejemplo 9 de referencia

Evaluación de un glucósido cardíaco y un extracto en un ensayo *in vitro* para la enfermedad de Alzheimer

En el modelo de cortes cerebrales de rata para la degeneración provocada por APP/Abeta de neuronas piramidales corticales se utiliza la transfección biolística no sólo para introducir marcadores vitales tal como YFP, sino también para introducir montajes de genes de enfermedades en las mismas poblaciones neuronales en los cortes cerebrales . Por lo tanto, el modelo de cortes cerebrales de APP/Aβ transfecta YFP junto con isoformas de APP, lo que conduce a la degeneración progresiva de neuronas piramidales corticales en el transcurso de 3-4 días después de la preparación y transfección de cortes cerebrales. Los datos demuestran que tanto oleandrina como PBI-05204, extracto en SCF no fraccionado de *Nerium oleander*, parecían poder proporcionar neuroprotección dependiente de la concentración a cortes cerebrales transfectados con APP, recuperando a los niveles casi a los que pueden proporcionar fármacos inhibidores de BACE.

30 Ejemplo 10 de referencia

Evaluación de un glucósido cardíaco y un extracto en un ensayo de cocultivo corticoestriatal *in vitro* para la enfermedad de Huntington

En este ensayo, en lugar de utilizar cortes cerebrales intactos, *htt* mutante se introduce por electroporación en alta densidad, cocultivos mixtos de neuronas corticales, neuronas del cuerpo estriado y glia dispuestos en placas de 96 pocillos. El objetivo de esta plataforma de ensayo es combinar la relevancia biológica/clínica de un sistema de cultivo primario complejo que recapitula aspectos clave de la interconectividad de poblaciones neuronales aplicables de la enfermedad *in vivo*, con capacidad para llevar a cabo campañas de detección completamente automatizadas a gran escala. En este ensayo, en el transcurso de 1-2 semanas *in vitro*, transfectaron montajes de *htt* mutante provocan la degeneración progresiva tanto de las neuronas estriadas como corticales que posteriormente se cuantifican utilizando algoritmos de adquisición de imágenes y de detección de objetos automatizados en la plataforma Cellomics ArrayScan VTI. Cada punto de datos se ha dibujado a partir de 6 pocillos con 16 imágenes en cada pocillo capturado, procesado y analizado de forma automática en el Cellomics ArrayScan utilizando protocolos desarrollados durante una campaña de detección a gran escala que se realizaron junto con la Cure Huntington's Disease Initiative. En una serie completa, se recogen y analizan unas 25.000 imágenes en cada ciclo, 4 ciclos a la semana.

*Plataforma de ensayo en cocultivo cortico-estriatal.*

Se preparan cultivos gliales puros antes del cultivo en placas neuronal para crear placas de 96 pocillos con perlas gliales confluentes. El tejido cortical y del cuerpo estriado se disocian a continuación por separado y "nucleofectan" con montajes de ADN apropiados y son distinguibles después por la expresión de diferentes proteínas fluorescentes tales como YFP, CFP, y mCherry. Estas neuronas corticales y del cuerpo estriado transfectadas por separado se mezclan entonces a fondo y se colocan en las placas de 96 pocillos que contienen las monocapas gliales previamente colocadas en placas.

Tanto oleandrina como PBI-05204 (extracto en CO<sub>2</sub> supercrítico de *Nerium oleander*) se ensayaron en esta plataforma de cocultivo cortico-estriatal y preliminarmente estos compuestos parecían ser los éxitos más fuertes que los inventores han observado hasta la fecha de > 400 moléculas de fármacos en etapa tardía que se han evaluado en este sistema de ensayo. Para comparación, se incluye un gráfico de dosis-respuesta para KW6002 (antagonista

del receptor de adenosina 2a), se incluye el compuesto que los inventores incluyen de forma rutinaria como referencia positiva para este ensayo de cocultivo. La eficacia de oleandrina está a la par con KW6002, mientras que su potencia parece ser unas 100 veces mayor (FIG. 3A-3D).

Ejemplo 11

- 5 Evaluación de una fracción de un extracto de *Nerium oleander* en SCF en un ensayo *in vitro* de APP para la enfermedad de Alzheimer

La fracción se preparó según el ejemplo 13. Este ensayo se llevó a cabo de manera similar a la del ejemplo 9. Los datos en la FIG. 6 demuestran que hay un efecto dependiente de la concentración de la fracción O-4A en la prevención de la neurodegeneración asociada a la introducción del montaje APP. En particular, los datos demuestran neuroprotección entre el intervalo de concentración de 3 a 30 µg/ml.

Ejemplo 12

Evaluación de una fracción de un extracto en SCF de *Nerium oleander* en un ensayo en tau4R *in vitro* para la enfermedad de Alzheimer

- 15 La fracción se preparó según el Ejemplo 13. Los datos en la FIG. 7 demuestran que hay un efecto dependiente de la concentración de la fracción O-4A en la prevención de la neurodegeneración asociada a la introducción del montaje Tau. En particular, los datos demuestran una neuroprotección entre el intervalo de concentración de 3 a 30 µg/ml. Hay una diferencia significativa entre las células tratadas con el montaje Tau y las expuestas a soluciones de la fracción O-4A.

Ejemplo 13

- 20 Fraccionamiento cromatográfico del extracto en SCF

Un extracto supercrítico (5 g) de hojas de adelfa (obtenido como se describe en la presente memoria extrayendo una masa vegetal con una mezcla de CO<sub>2</sub> supercrítico con EtOH añadido como codisolvente/modificador, lote nº 270111) se puso en suspensión en agua (150 ml) y se repartió tres veces con hexano (150 ml cada vez). La capa de agua se sometió a ODS C-18 (gel de sílice funcionalizado con octadecilo, 20-22% marcado, 200-400 mesh) fraccionamiento en columna abierta (400 mm (L) x 38 mm (D.I.)) cargando la capa de agua directamente a un lecho de resina ODS equilibrada con agua. La columna se trató sucesivamente con mezclas de agua y metanol (1.000 ml de metanol al 30% en agua, 1.000 ml de metanol al 55% en agua, 1.000 ml de metanol al 80% en agua, 1000 ml de metanol al 100%) y con una mezcla de de acetona:metanol (2 volúmenes:1 volumen; 1.000 ml). Se recogió el efluente (1000 ml) de cada mezcla. El disolvente se retiró de cada fracción por evaporación para producir cinco fracciones, a saber, Fr-O-1, Fr-O-2, Fr-O-3, Fr-O-4 y FR-O-5. Las fracciones se analizaron por cromatografía HPLC como en el ejemplo 14.

Ejemplo 14

Análisis de HPLC de fracciones de extracto en SCF

- 35 El propósito de este ensayo fue identificar fracciones del extracto (de las anteriores) que contienen glucósido cardíaco. Una muestra de cada fracción obtenida según el ejemplo 13 se analizó de la forma siguiente. La fracción de 1-3 mg se disolvió en 1-5 ml de metanol acuoso (80% de metanol en agua). La muestra diluida (10-25 µg) se analizó con una columna Agilent Zorbax SB-C18 utilizando metanol al 80% en agua como fase móvil, una caudal de 0,7 ml/min y el efluente de DAD-UV controlando a las siguientes longitudes de onda: 203, 210, 217, 230, 254, 280, 310 y 300 nm.

- 40 Ejemplo 15

Ensayo en cortes cerebrales para la determinación de la neuroprotección proporcionada por fracciones de extracto

- Este ensayo se realizó según el ejemplo 8. Los datos demuestran que en comparación con el daño mediado por la apoplejía sin tratar (OGD) a las neuronas del corte cerebral PBI-05204 proporciona un nivel significativo de protección. Un nivel similar de neuroprotección proporcionó la fracción O-4A (FIG. 4A y 5), así como la fracción O-3 (FIG. 4C) y la fracción O-1 (FIG. 4D). Por el contrario, las fracciones O-2 (FIG. 4B) y O-5 (FIG. 4E) no demostraron efectos neuroprotectores en este modelo OGD de lesión cerebral isquémica mediada por apoplejía.

Ejemplo 16 de referencia

Ensayo en cortes cerebrales de tiempo de retardo para la determinación de neuroprotección

- 50 Este ensayo se realizó según el ejemplo 8, excepto que se hicieron los siguientes cambios. Un período especificado se permitió entre la OGD y la introducción de un agente neuroprotector propuesto. Se determinó la capacidad de PBI-05204 para proporcionar neuroprotección a cortes cerebrales si el tratamiento se retrasaba con respecto al



momento adecuado del tratamiento con OGD. Los datos demostraron que un retraso de 2 horas de extractos de *Nerium oleander* fue bien tolerado, mostrando niveles similares de neuroprotección a los alcanzados con la aplicación de PBI-05204 inmediatamente después del tratamiento con OGD. La ventaja neuroprotectora se redujo con 4 a 6 horas de retraso de la administración de PBI-05204, pero a niveles de neuroprotección que todavía eran significativa y fisiológicamente aplicables.

#### Ejemplo 17

Identificación de compuestos en una fracción de extracto en SCF de *Nerium oleander* obtenido según el ejemplo 13

El agua y metanol presente en la fracción Fr-O-4 se eliminaron por evaporación a presión reducida. El residuo de la fracción Fr-O-4 del ejemplo 13 se sometió a cromatografía en gel de sílice (a continuación) para proporcionar subfracciones que se analizaron a continuación por cromatografía en capa fina (TLC). Se combinaron las fracciones que tienen perfiles similares de TLC y se retiraron sus disolventes por evaporación a presión reducida. Los residuos restantes se analizaron por RMN <sup>1</sup>H.

#### Cromatografía en capa fina

Se realizó la TLC en placas de TLC calidad analítica convencionales utilizando una mezcla de hexano:acetato de etilo (7: 3 v:v). Los compuestos se visualizaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con lo que los esteroides presentan un color azul y los triterpenos presentan un color púrpura.

Antes de fraccionamiento adicional por cromatografía ultrarrápida, el análisis de TLC de la fracción Fr-O-4 indicó la presencia de una mancha principal y más de cinco puntos pequeños. La reacción de color indicó que la mancha principal contenía una mezcla de esteroides y triterpeno y la mayoría de las pequeñas manchas contenía esteroides.

#### 20 Cromatografía ultrarrápida de gel de sílice

Se cargó gel de sílice (Biotage); (10-15 g) en una columna y se equilibró con una mezcla de acetato de etilo (3%) y hexano (97%) El residuo de la fracción Fr-O-4 se absorbió en mezcla de 0,2-0,5 ml] de acetato de etilo (3%) y hexano (97%) y se cargó en la columna. Se llevó a cabo la cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de disolvente de acetato de etilo (3% -30%) en hexano (97% -70%, respectivamente) seguido de 100% de metanol. Los subfracciones recogidas de la columna se analizaron por TLC (arriba) y las fracciones que tienen perfiles similares de visualización de TLC se combinaron y se concentraron para eliminar el disolvente.

#### Espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H

Una muestra de cada una de las subfracciones concentradas obtenidas de la cromatografía ultrarrápida se analizó por RMN <sup>1</sup>H utilizando métodos convencionales a fin de determinar la clase estructural de los componentes principales

#### Ejemplo 18 de referencia

Identificación de compuestos en el extracto de *Nerium oleander* en SCF obtenidos según el ejemplo 1 (Método B) en forma no fraccionada

El extracto en SCF se analizó por análisis de MS-DART TOF de la forma siguiente. Se utilizó un espectrómetro de masas JEOL AccuTOF-DART (Jeol EE.UU., Peabody, MA, EE.UU.).

Se utilizó un espectrómetro de masas JEOL AccuTOF-DART (Jeol EE.UU., Peabody, MA, EE.UU.). Los análisis se llevaron a cabo en modo de ion positivo (DART+) dando masas correspondientes a los iones M+H<sup>+</sup> generados por el DART-MS. Se utilizó una serie de ajustes en el instrumento para determinar las condiciones óptimas para el análisis *N. oleander*. Los ajustes generales de DART+ incluían: voltaje de la aguja 3500 V; orificio 1- 2-20 V; lente del anillo 2-5 V; orificio 2- 2-5 V; y picos de voltaje 1000 V. Las calibraciones se realizaron internamente con cada muestra utilizando una solución de 10% de PEG 600 que proporciona marcadores de masa en todo el intervalo de masa requerida de 100-1000 unidades de masa. Se llevaron a cabo otros análisis en modo DART- y éstos consistieron en: voltaje de la aguja 3500 V; elemento de calentamiento 250°C; 1- electrodo 1- 150 V electrodo; 2- 250 V; caudal de gas He 3,79 l/min . Ajustes del espectrómetro de masas: MCP 2600 V; orificio 1- 15 V; lente del anillo- 5 V, orificio 2- 5 V; y picos de voltaje 1000 V. Las calibraciones se realizaron internamente en cada muestra utilizando una solución de ácido carboxílico perfluorado que proporciona marcadores en todo el intervalo de masa requerido de 100 a 1.000 unidades de masa. Las muestras de *N. oleander* se introdujeron puras en el plasma de helio DART utilizando el extremo cerrado de un tubo de punto de fusión de vidrio de borosilicato. El tubo capilar se mantuvo en el plasma de He durante aproximadamente 3-5 s por análisis. Las fórmulas moleculares se confirmaron por los programas de composición elemental y emparejamiento de isótopos proporcionados con el instrumento JEOL AccuTOF DART-MS. Se utilizó una base de datos que se pueden efectuar búsquedas de constituyentes de *N. oleander*, desarrollada por HerbalScience (Naples, FL, EE.UU.).

## ES 2 546 518 T3

Se encontró que el extracto en SCF contenía al menos los siguientes componentes presentes en las abundancias relativas (%) indicadas.

Componente	Abundancia relativa (%)
Oleandrina	2,99
Oleandrogenina	3,31
Ácido ursólico/ácido betulínico	15,29
Odorósido	0,80
Ácido oleanólico	0,60
Urs-12-eno-3 $\beta$ ,28-diol/betulina	5,44
Ácido 3 $\beta$ ,3 $\beta$ -hidroxi-12-olean-en-28-oico	14,26
28-norurs-12-en-3 $\beta$ -ol	4,94
Urs-12-en-3 $\beta$ -ol	4,76

5 Como se emplea en la presente memoria y a menos que se especifique de otra manera, el término "aproximadamente" se toma en el sentido de  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 2,5\%$  o  $\pm 1\%$  de un valor especificado. Como se emplea en la presente memoria y a menos que se especifique de otra manera, el término "sustancialmente" se toma en el sentido de "en gran medida", "al menos una mayoría de", mayor que 70%, mayor que 85%, mayor que 90%, mayor que 95%, mayor que 98% o mayor que 99%.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una fracción o subfracción de un extracto de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*, en donde una de sus fracciones o una de sus subfracciones excluye glucósido cardíaco y comprende al menos un esteroide, al menos un triterpeno y menos del 1% en peso de polisacáridos, en donde el extracto se obtiene por extracción de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia* en agua caliente, por extracción en agua fría, por extracción en líquido supercrítico, por extracción en disolvente orgánico o una de sus combinaciones, seguido de su fraccionamiento, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad neurológica.
- 5 2., La composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 1, en donde el extracto comprende uno o más agentes terapéuticamente eficaces extraídos de la especie *Nerium* o de la especie *Thevetia*.
- 10 3. La composición farmacéutica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la especie *Nerium* es *Nerium oleander* y la especie *Thevetia* es *Thevetia neriifolia* o *Thevetia peruviana*.
4. La composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 1, en donde la subfracción se ha preparado por fraccionamiento cromatográfico de líquidos de una fracción del extracto.
5. La composición farmacéutica para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- 15 a) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende al menos un esteroide y, al menos dos triterpenos;
- b) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende al menos dos esteroides y, al menos dos triterpenos; o
- c) una de las fracciones o subfracciones del extracto comprende betulina (urs-12-en-3 $\beta$ ,28-diol); 28-norurs-12-en-3 $\beta$ -ol; urs-12-en-3 $\beta$ -ol; ácido 3 $\beta$ ,3 $\beta$ -hidroxi-12-oleanen-28-oico; ácido 3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihidroxiurs-21-en-38-oico; ácido 3 $\beta$ ,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico; ácido 3 $\beta$ ,27-dihidroxi-12-ursen-38-oico; ácido 3 $\beta$ ,13 $\beta$ -dihidroxiurs-11-en-28-oico; 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-oleanan-28,13 $\beta$ -olida; ácido 3 $\beta$ ,27-dihidroxi-12-oleanan-28-oico.
- 20 6. La composición farmacéutica para su utilización según cualquiera de los apartados anteriores, en donde la enfermedad neurológica es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la encefalopatía espongiiforme bovina, la esclerosis múltiple, la neuropatía diabética, el autismo, la lipofuscinosis cerioidea neuronal juvenil, la apoplejía, una taupatía o una enfermedad que presenta una etiología relacionada con excesiva proteólisis de proteína precursora beta amilácea, con acumulación de proteína beta amilácea en las sinapsis de las neuronas de un individuo, con formación de fibrillas amiláceas en las sinapsis de las neuronas de un individuo, o con formación de placas amiláceas en las sinapsis de las neuronas de un individuo.
- 25 7. La composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 1 para su utilización en el método retardado en el tiempo de tratamiento de la apoplejía.
- 30

FIG. 1A

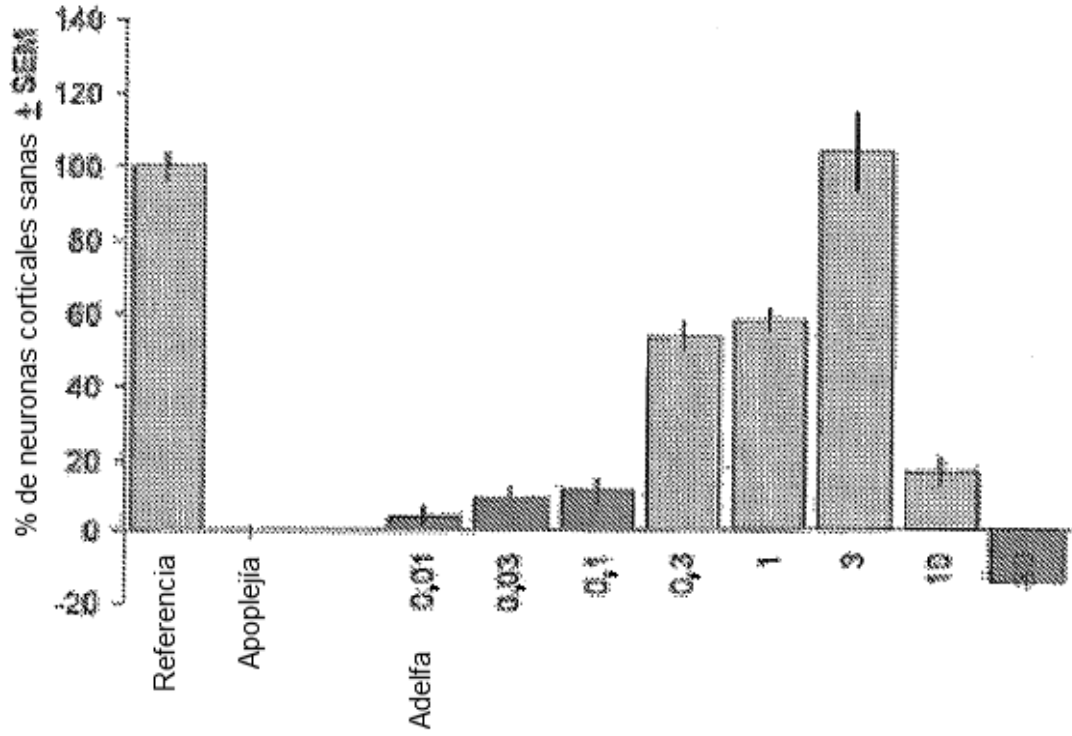
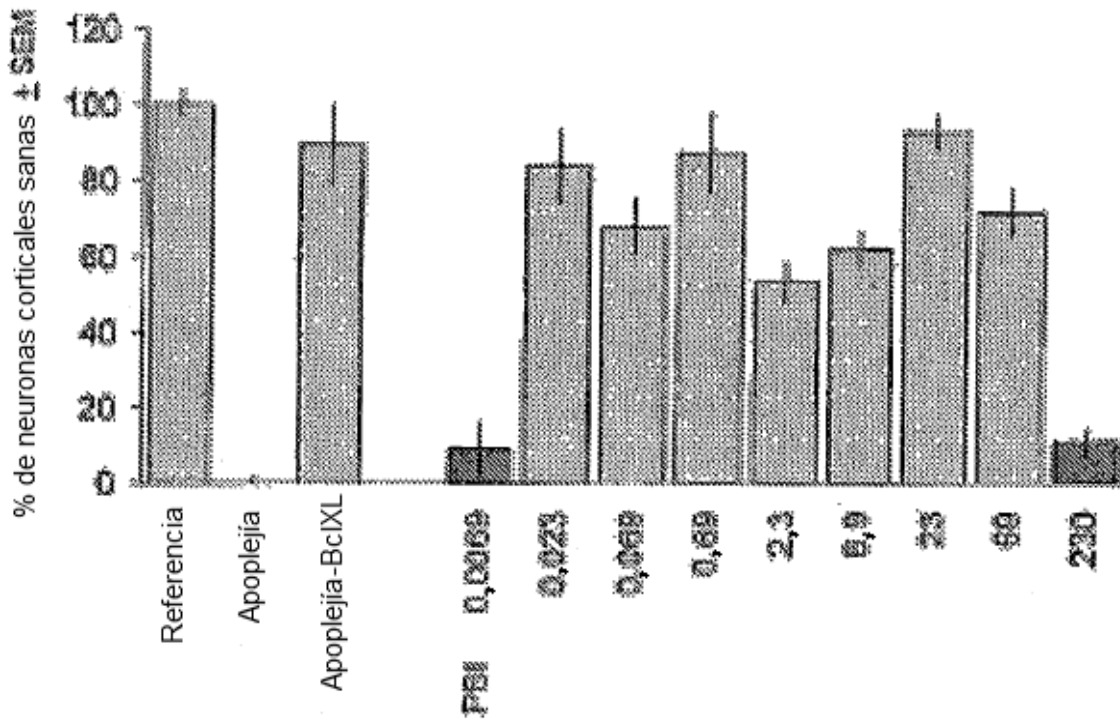
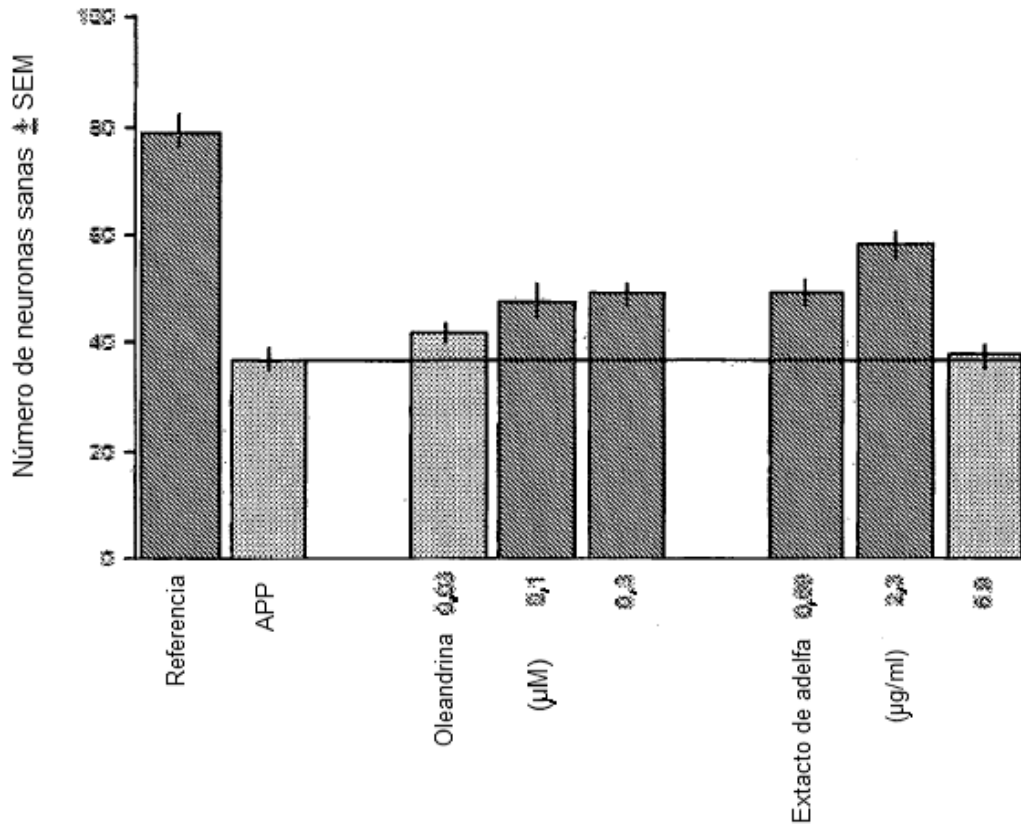


FIG. 1B



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

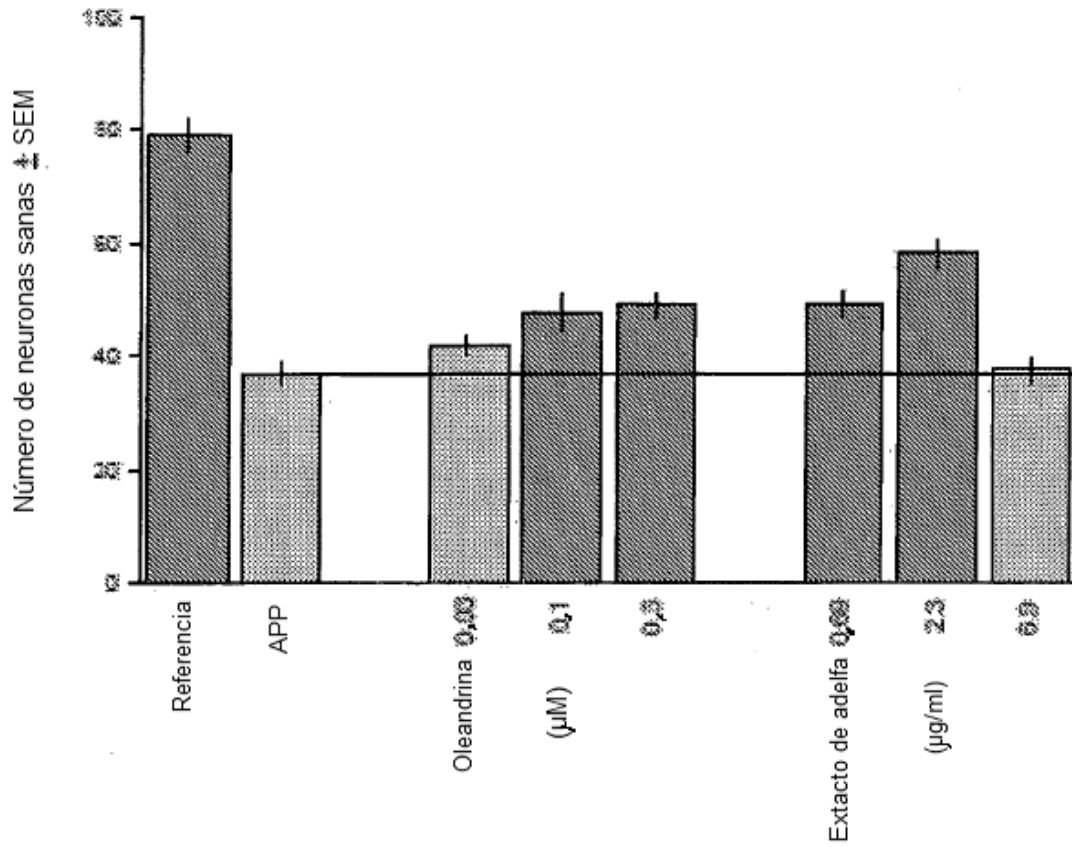
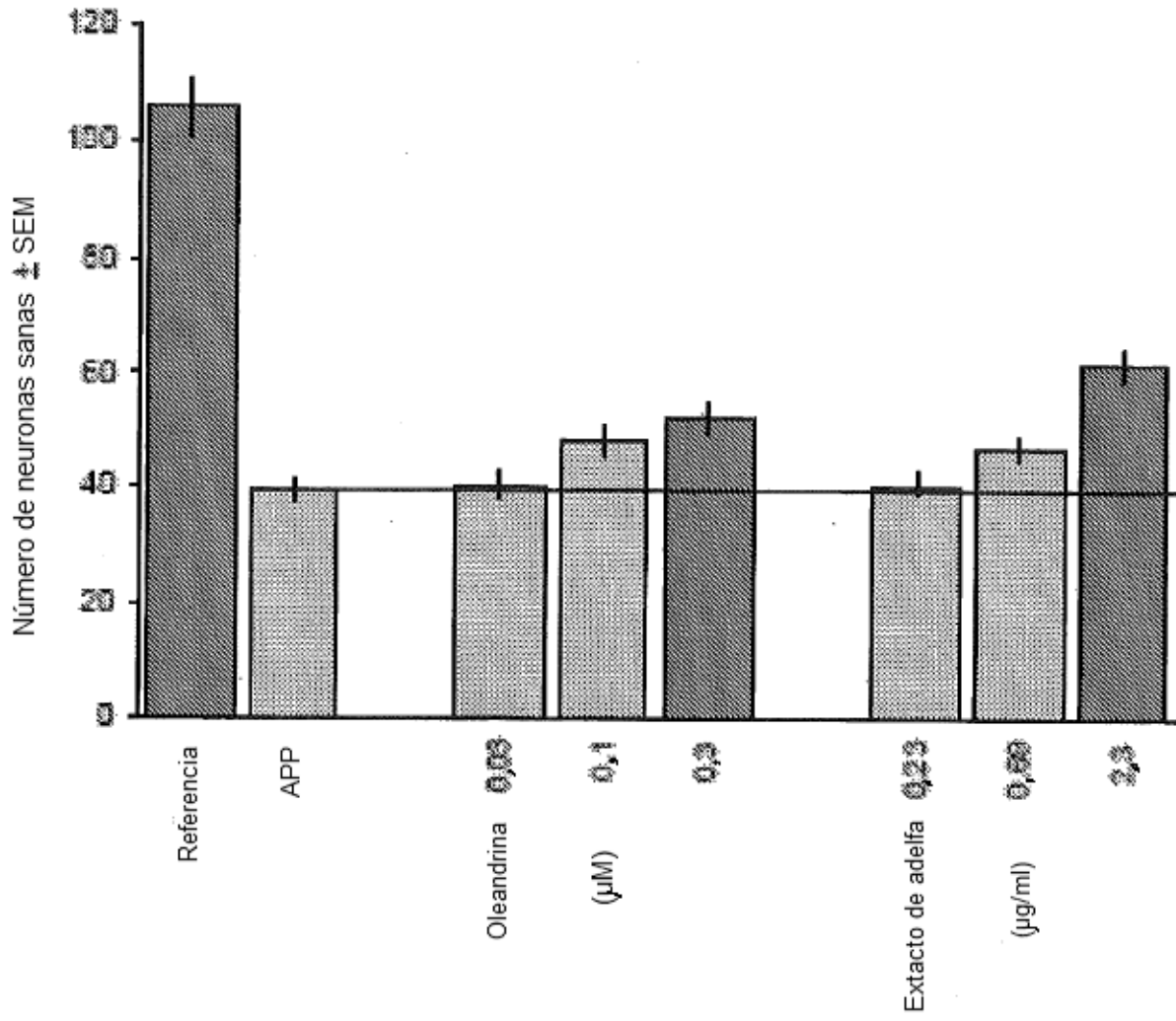


FIG. 2C



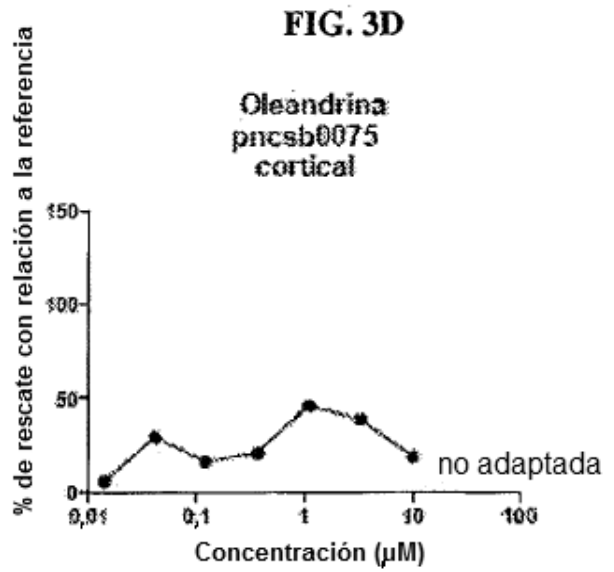
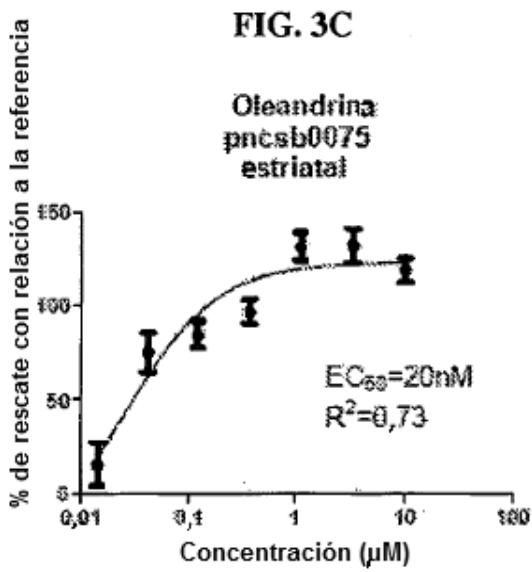
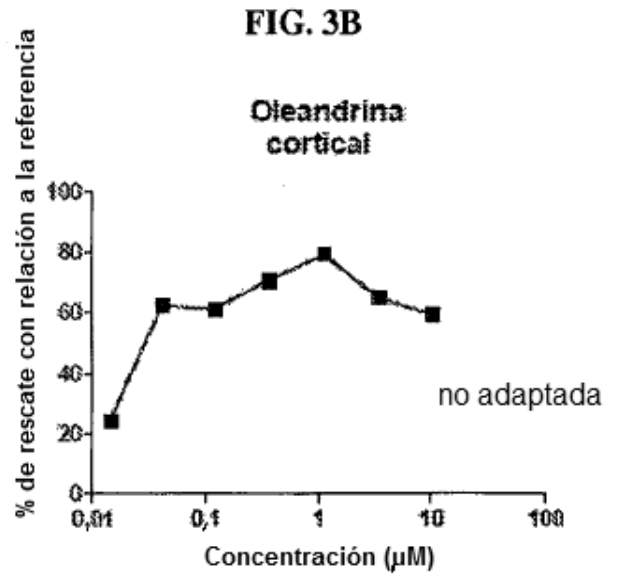
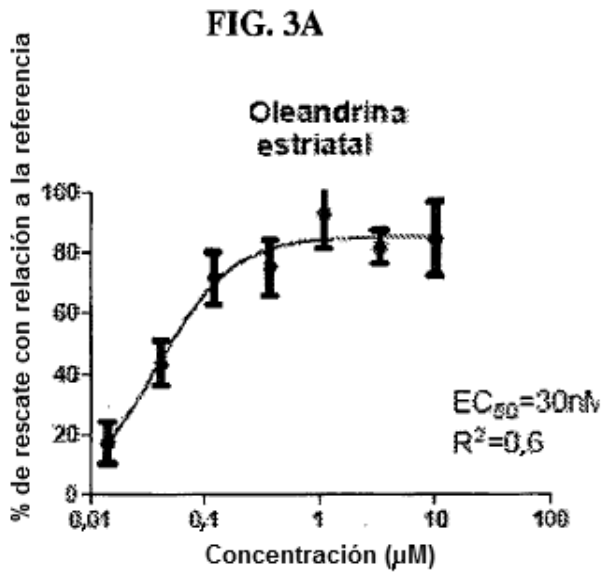


FIG. 4A

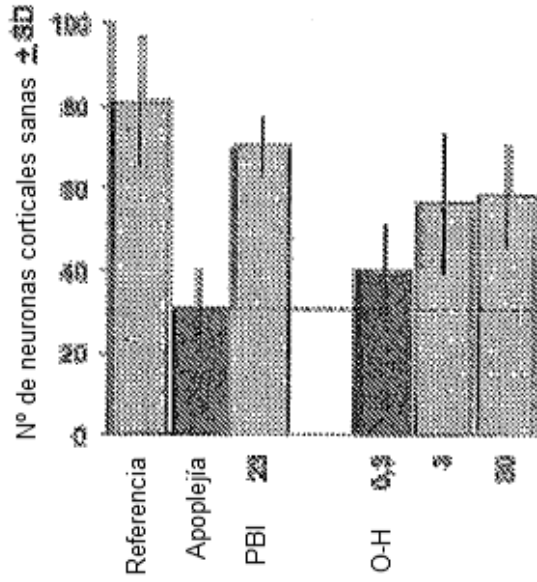


FIG. 4B

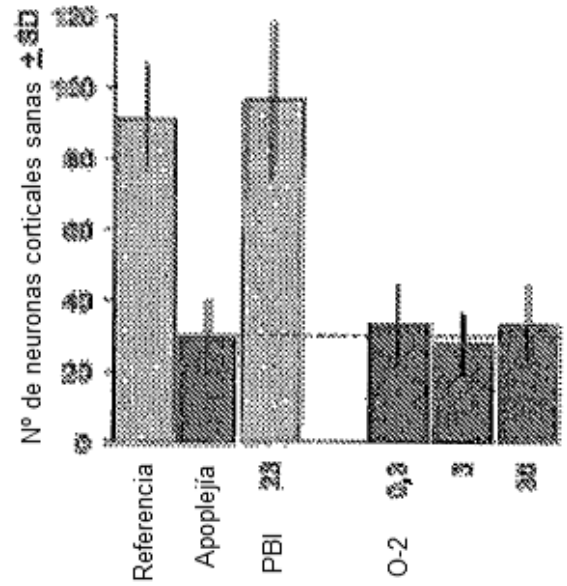


FIG. 4C

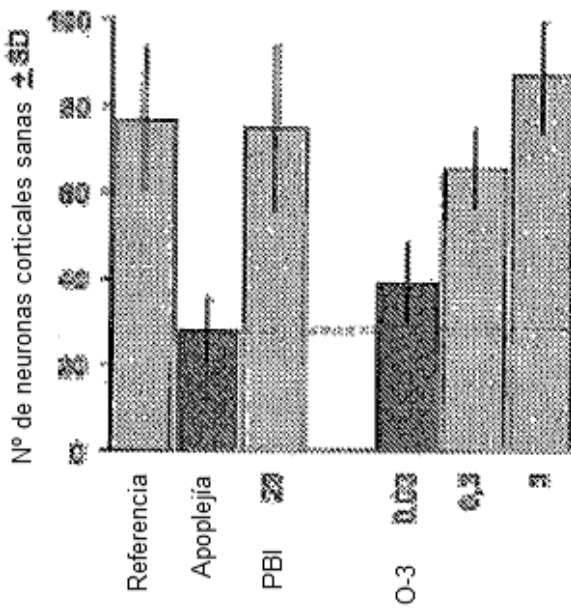


FIG. 4D

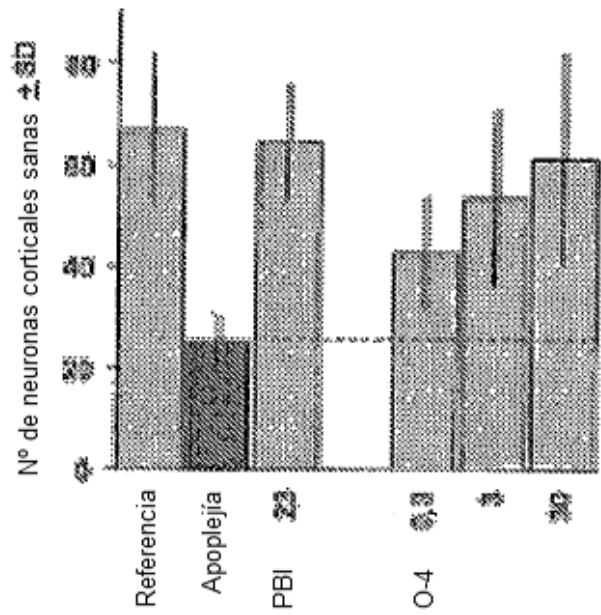




FIG. 4E

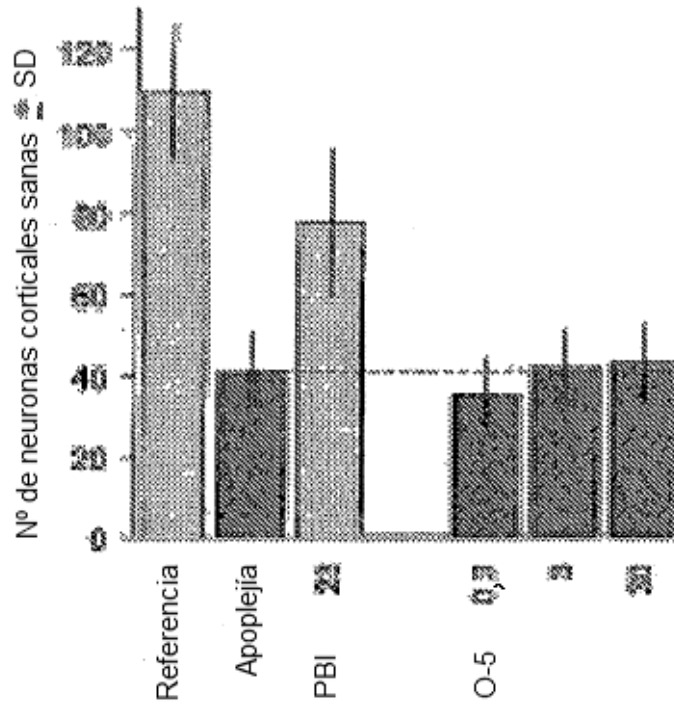


FIG. 5

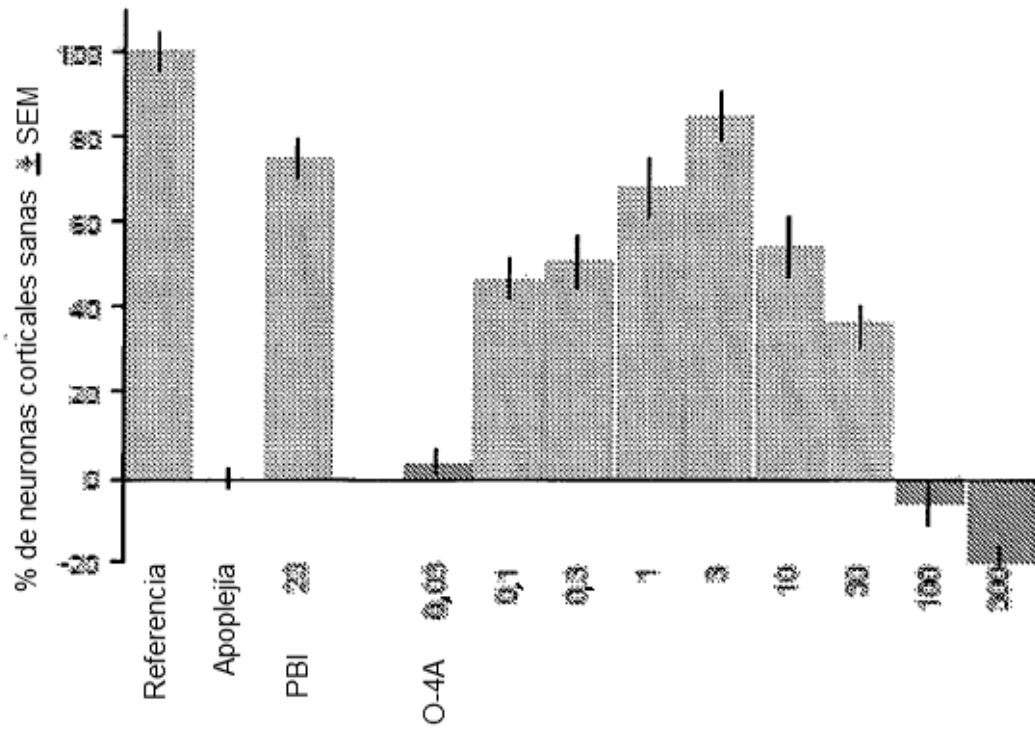


FIG. 6

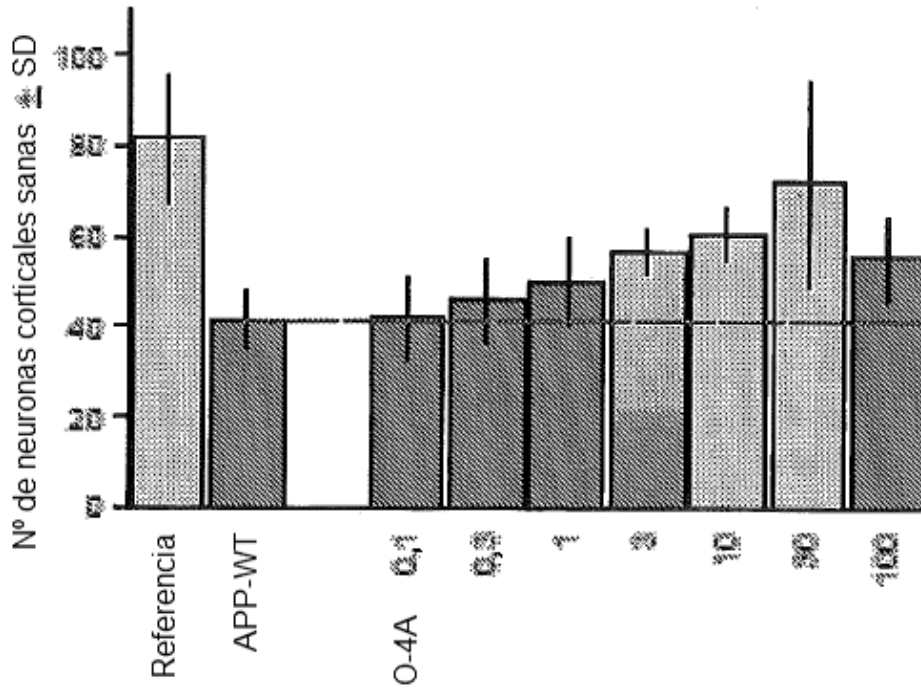


FIG. 7

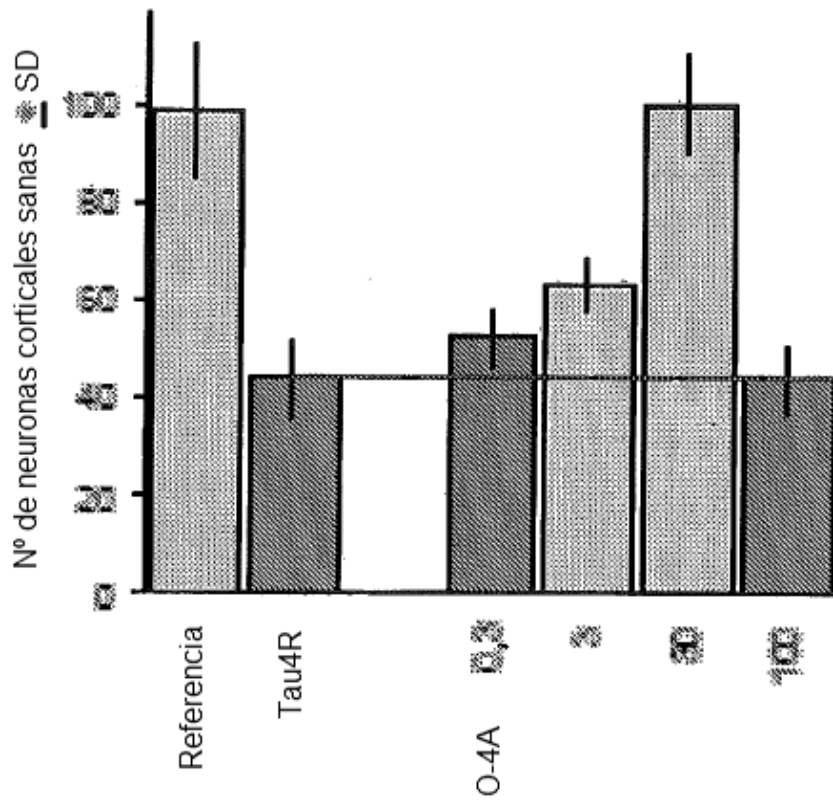


FIG. 8A

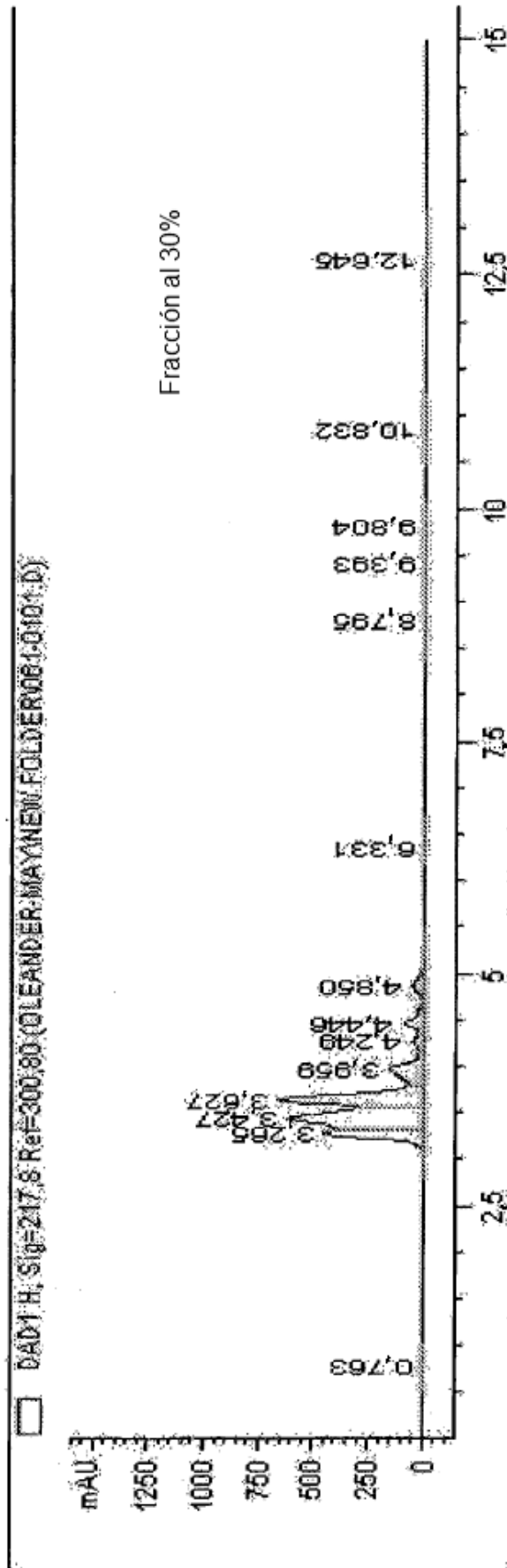


FIG. 8B

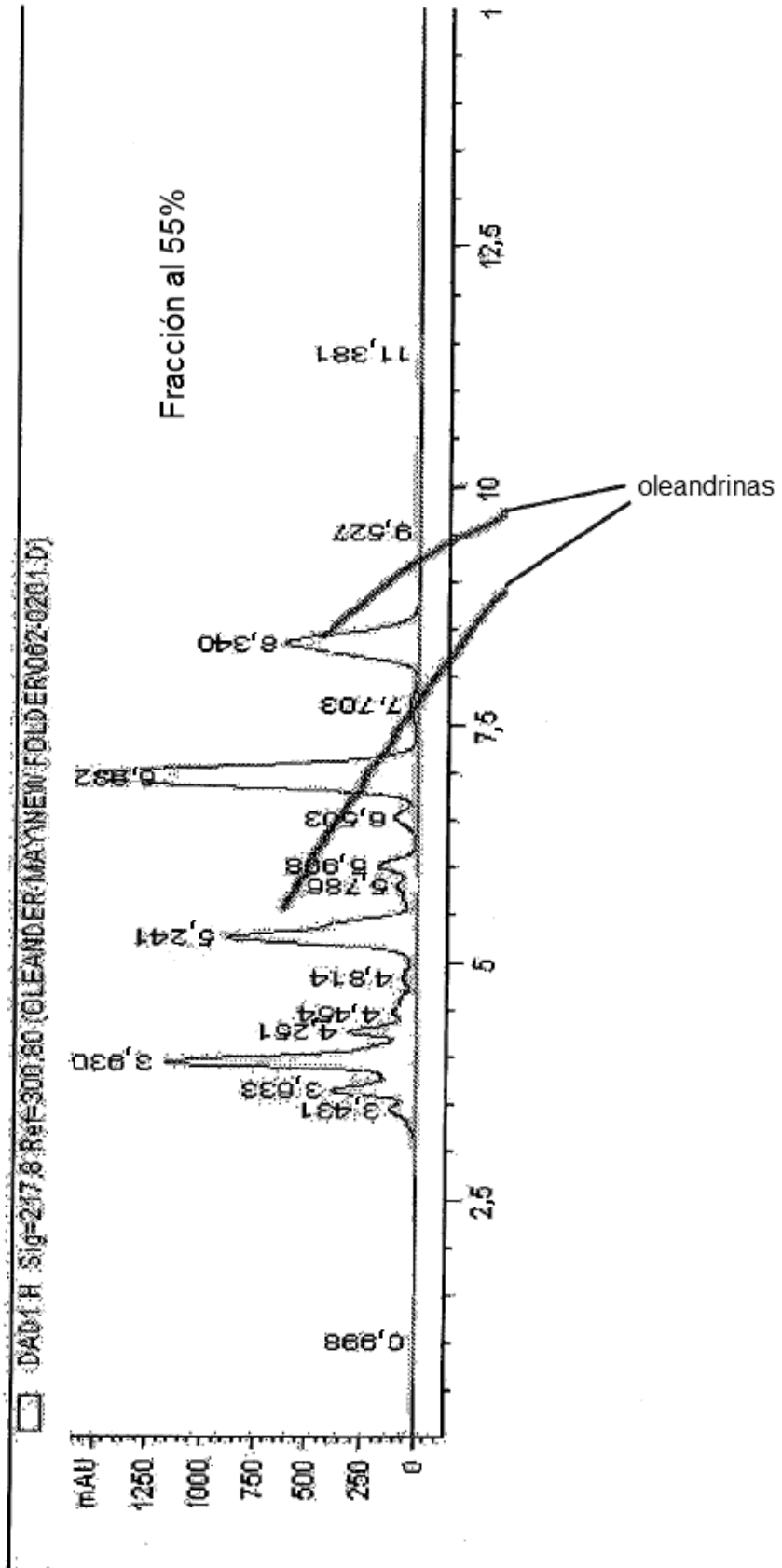


FIG. 8C

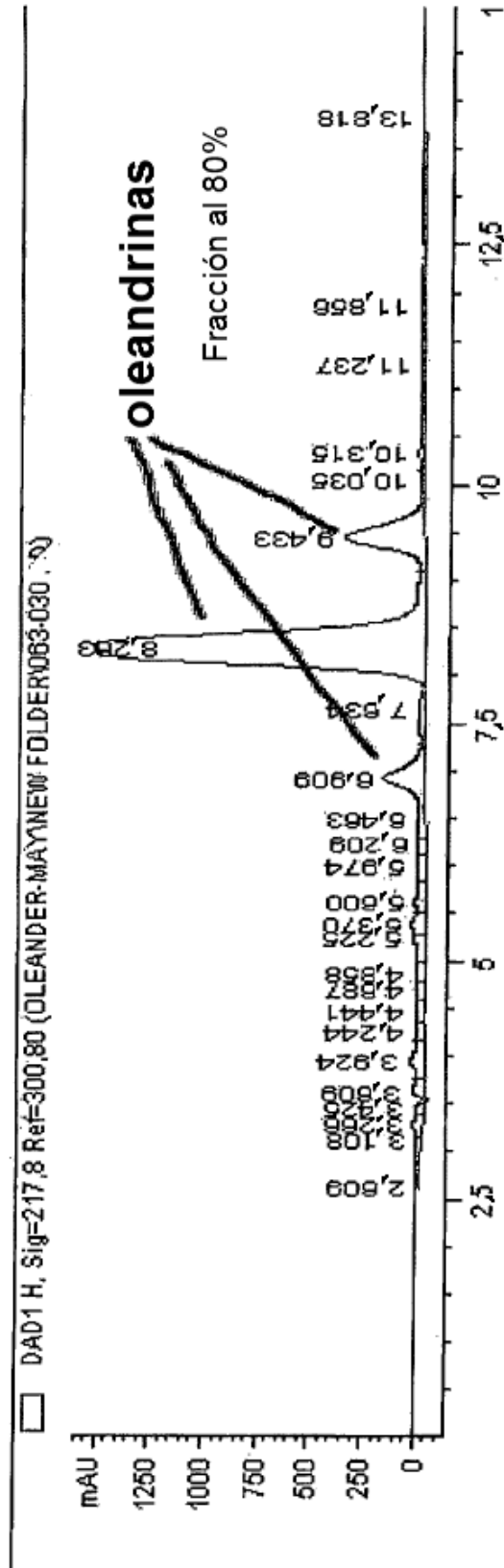


FIG. 8D

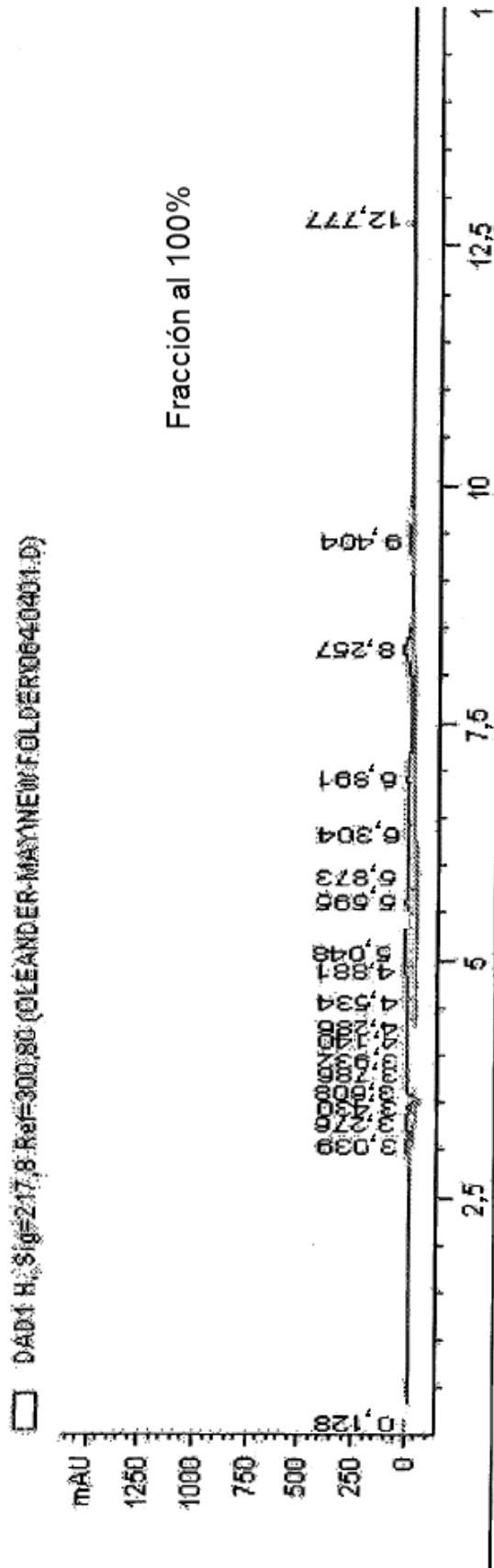


FIG. 9A

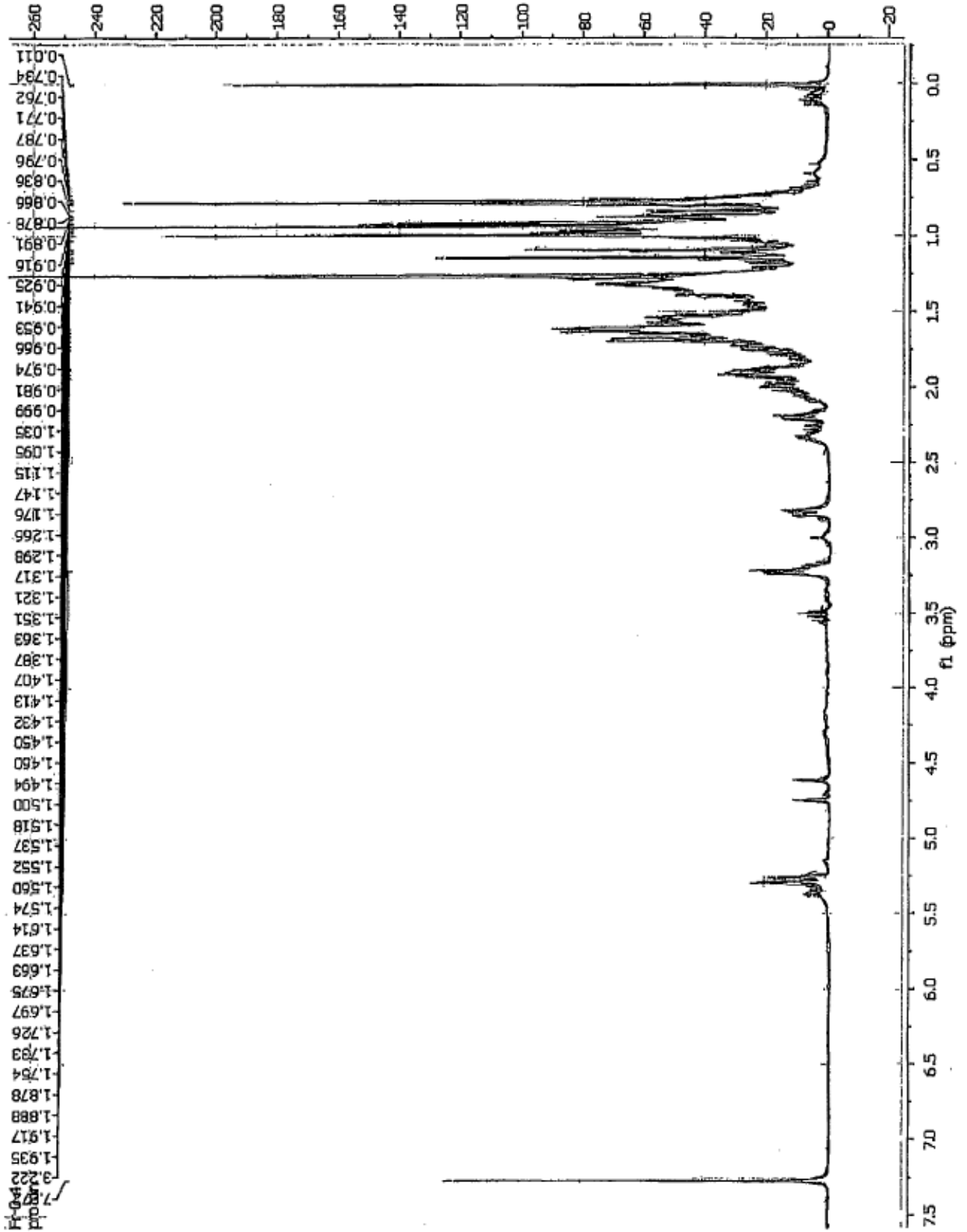


FIG. 9B

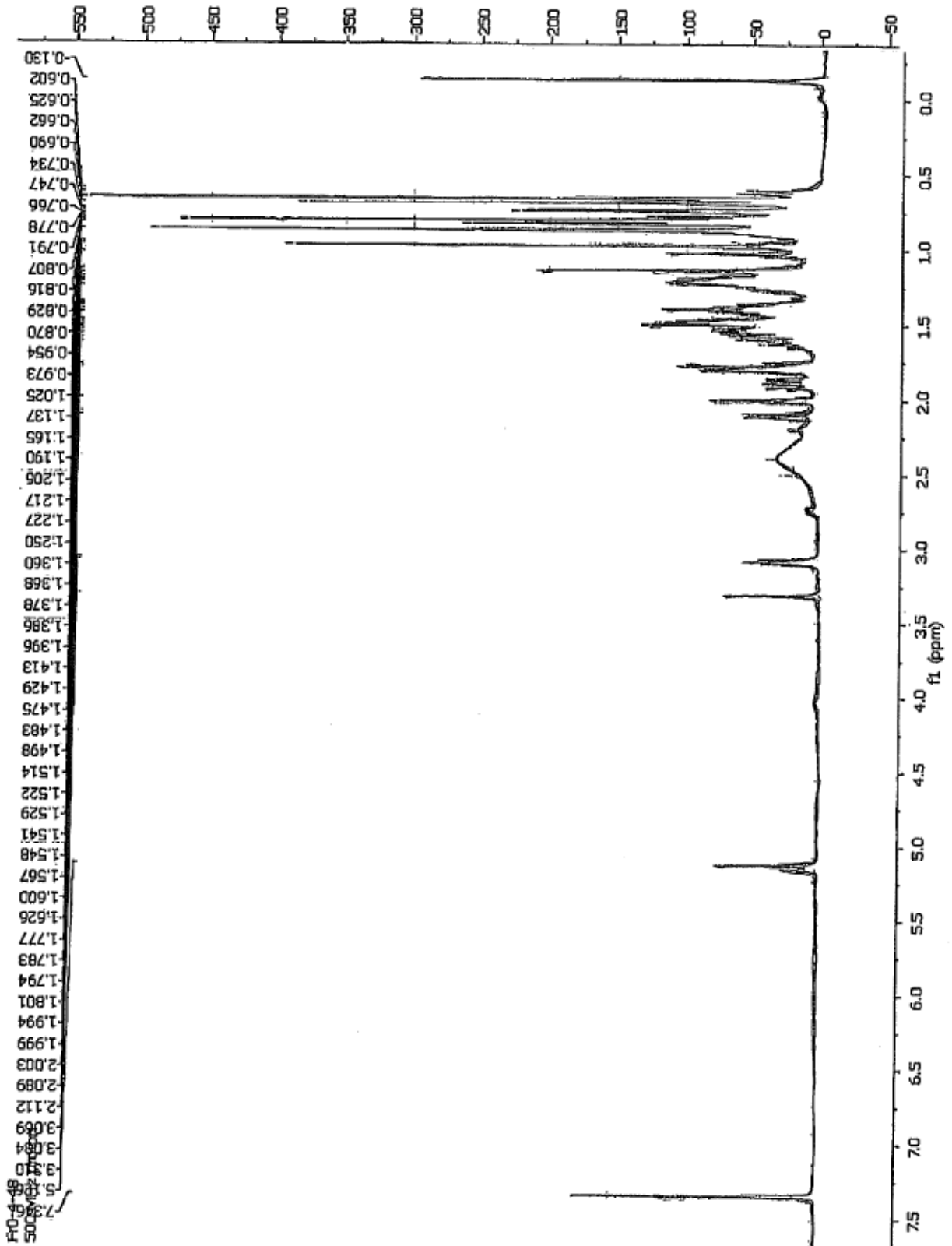




FIG. 9C

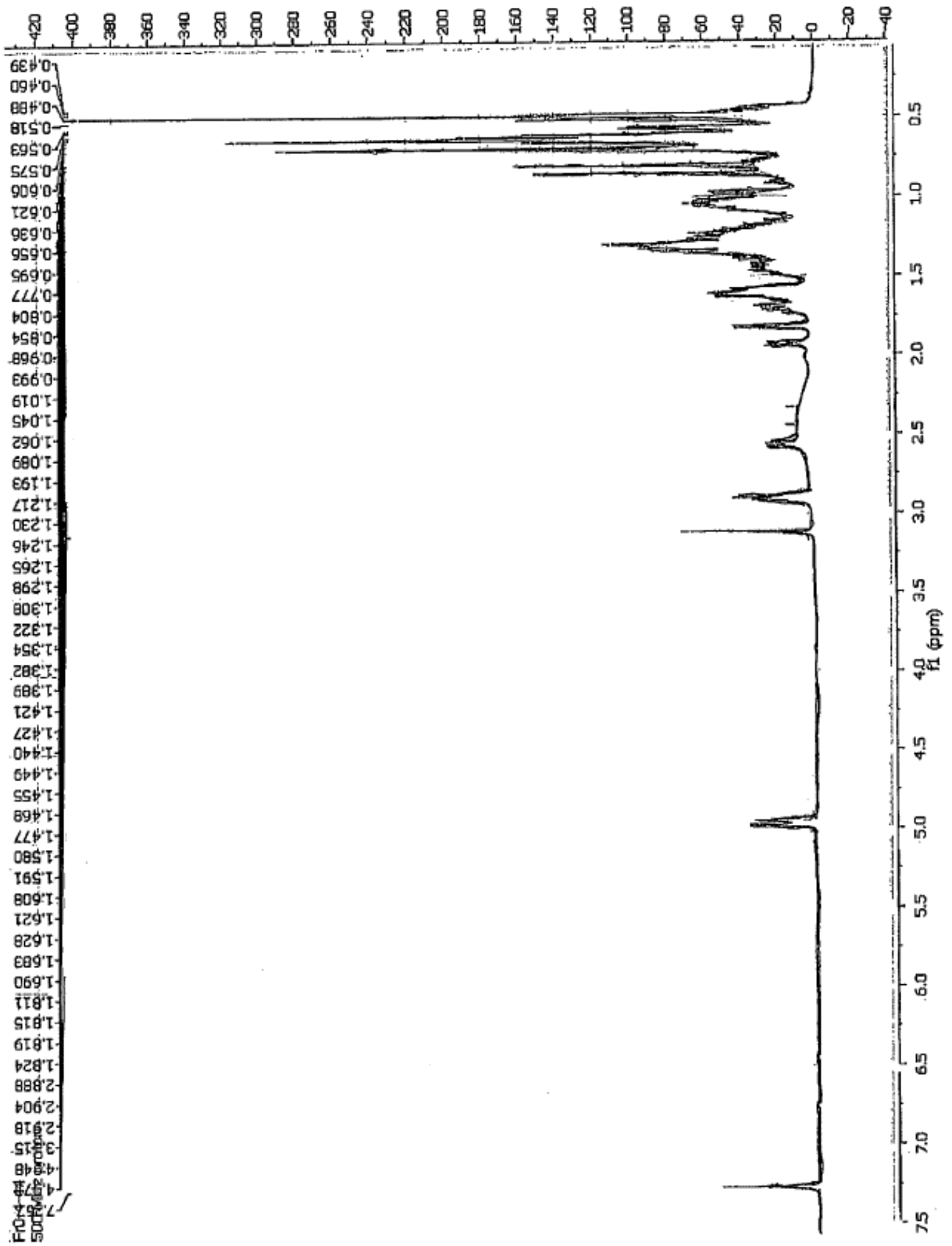


FIG. 9D

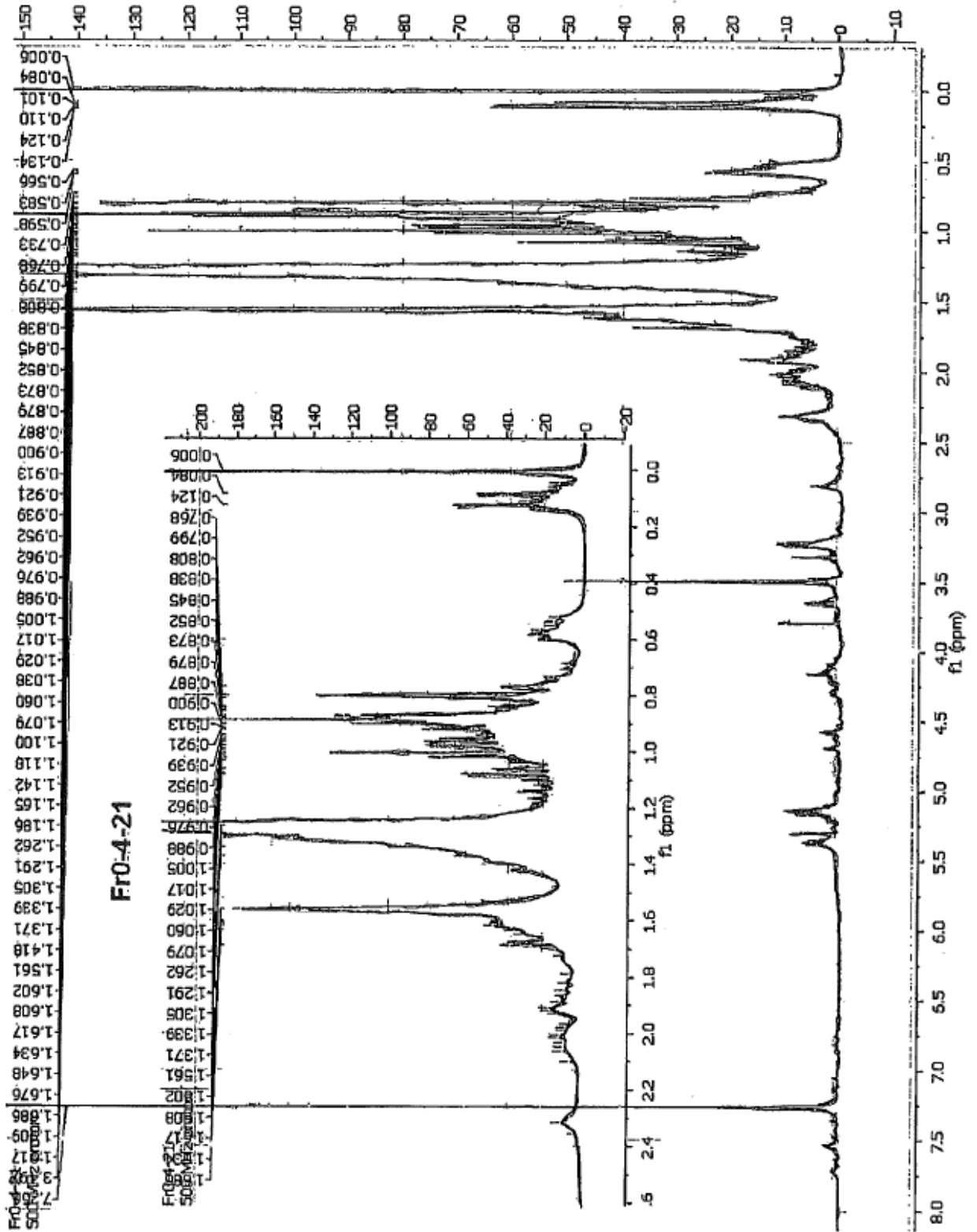


FIG. 9E

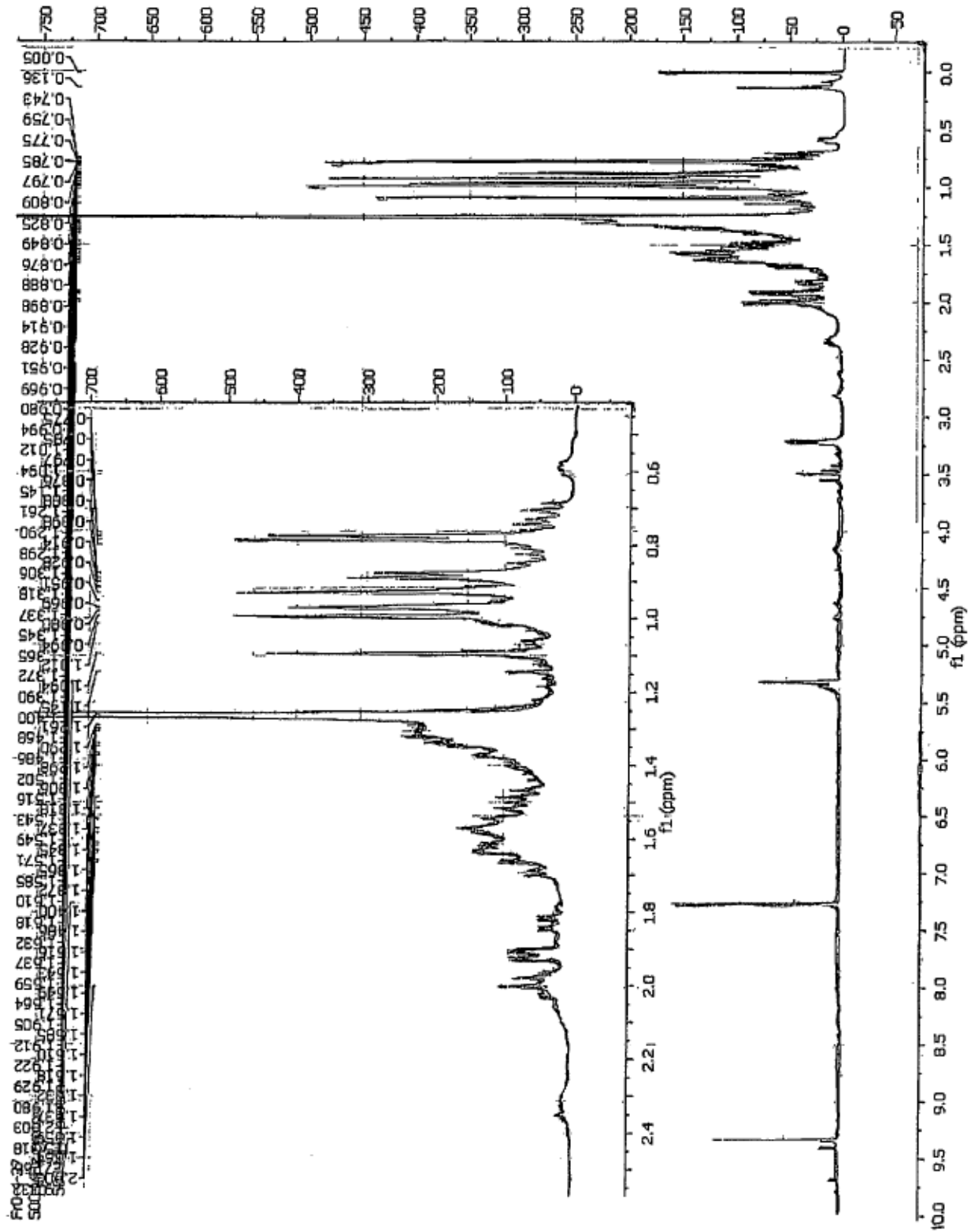


FIG. 9F

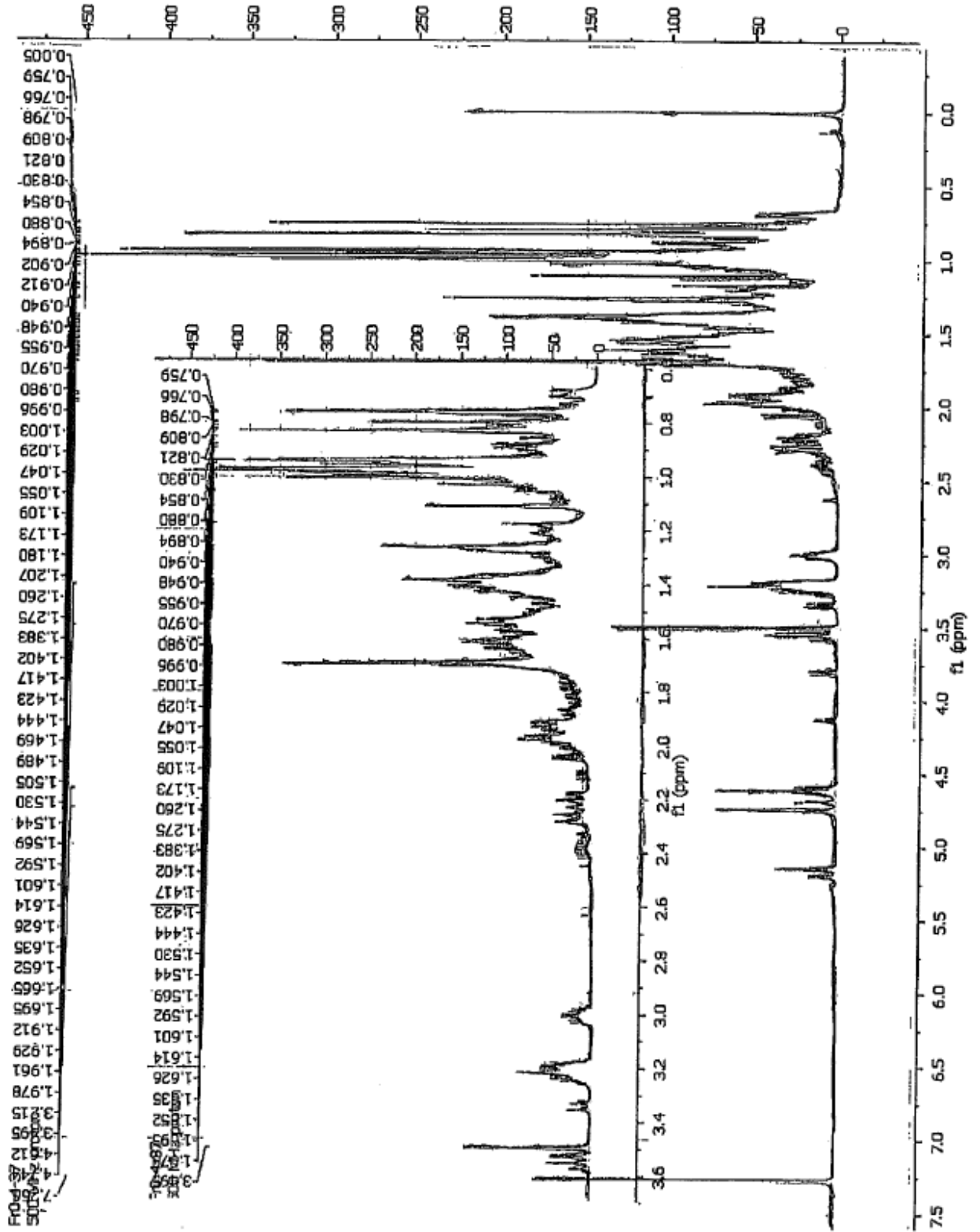
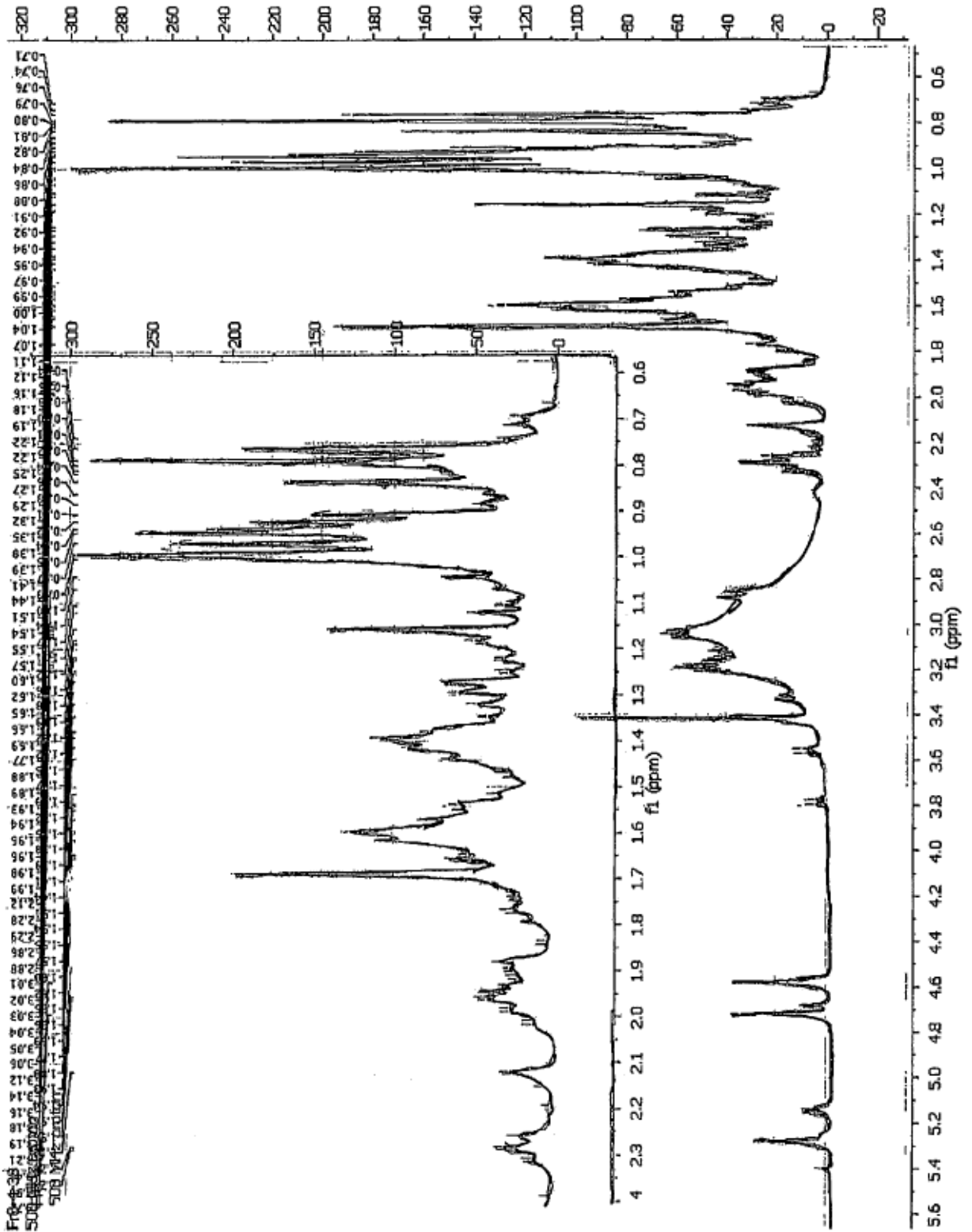


FIG. 9G



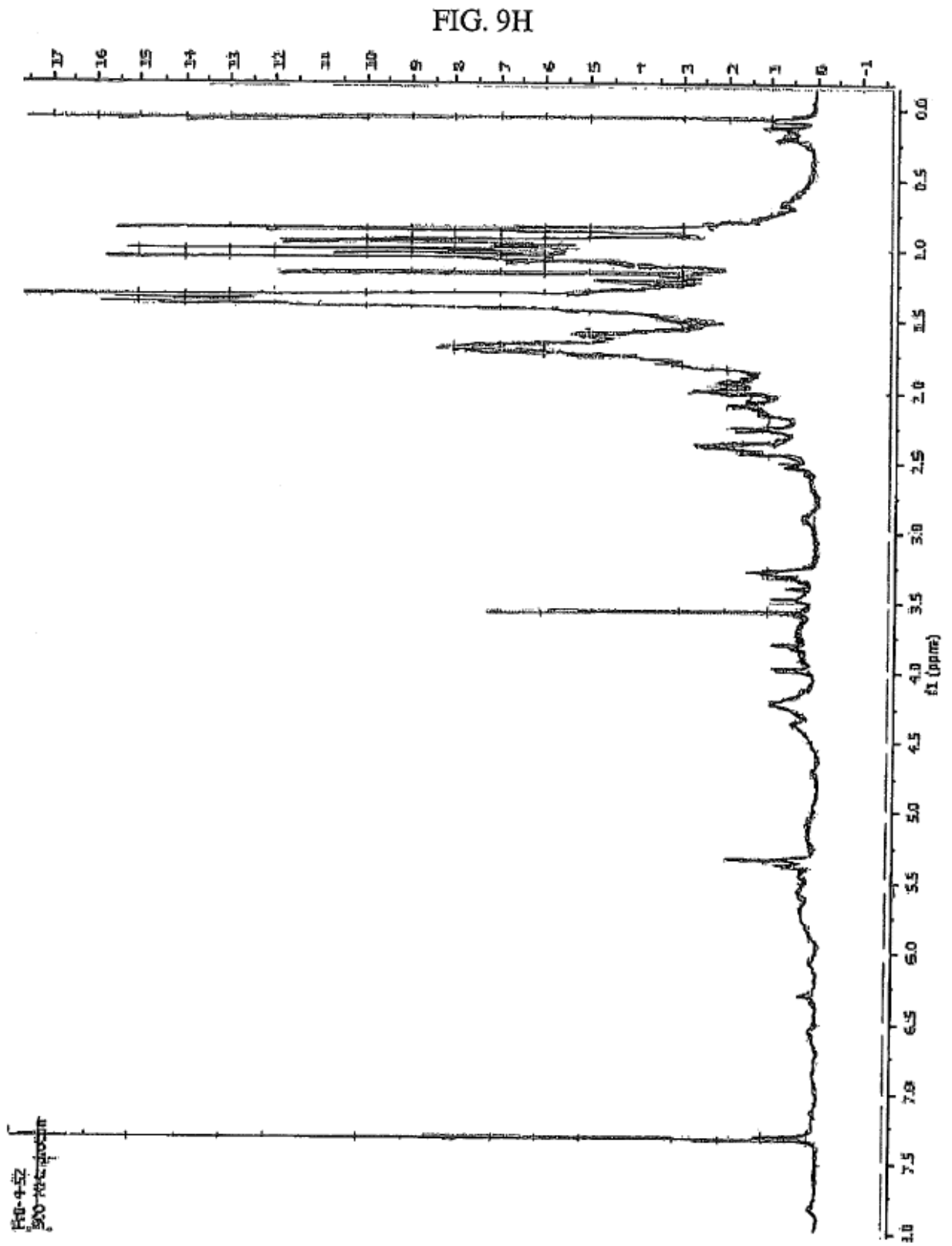


FIG. 9I

