

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 454**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4045** (2006.01)

**A23K 20/168** (2006.01)

**A23K 50/40** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/US2012/040658**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12796892 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2717695**

54 Título: **Métodos para reducir la neurodegeneración**

30 Prioridad:

**08.06.2011 US 201161520332 P**

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

**14.03.2017**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MIDDLETON, RONDO, PAUL y  
ZANGHI, BRIAN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 605 454 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**

Métodos para reducir la neurodegeneración

5 Referencia cruzada a solicitudes afines

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional U.S. que lleva el número de serie 61/520332.

10 Antecedentes de la invención

Ámbito de la invención

La invención se refiere en general a métodos para reducir la neurodegeneración y en particular a métodos de uso de la melatonina para reducir la neurodegeneración en animales caninos.

15 Descripción de la técnica afín

La neurodegeneración está asociada a diversas enfermedades severas y letales de los animales, p. ej. la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Estas enfermedades de aparición tardía están asociadas con la formación de agregados intracelulares causados por proteínas tóxicas. Según una teoría corriente, la acumulación de estas proteínas citoplasmáticas tóxicas conduce a la neurodegeneración porque las proteínas tóxicas desencadenan la muerte de las células nerviosas. En tales circunstancias, las células nerviosas aparentemente pierden la capacidad de degradar a estas proteínas tóxicas.

25 La degradación de las proteínas citoplasmáticas viene mediada por un proceso celular denominado macroautofagia, también llamada simplemente autofagia. La reducción de la autofagia en las células nerviosas conduce a la neurodegeneración. La reducción por autofagia está asociada a una deficiencia en el gen atg7 o en el gen atg5, genes que producen las proteínas que desempeñan un papel clave en la autofagia.

30 Se ha demostrado que hay varias proteína-quinasas que regulan la autofagia. Una de las mejor caracterizadas es la diana de la rapamicina en un mamífero (mammalian Target of Rapamycin = mTOR). La mTOR es una proteína-quinasa de serina/treonina que regula el crecimiento de las células, la proliferación celular, la motilidad celular, la supervivencia de las células, la síntesis de proteínas y la transcripción. La mTOR pertenece al grupo de las proteína-quinasas afines a la fosfatidilinositol-3-quinasa. La mTOR activa el mecanismo de la autofagia cuando se halla en forma inactivada o desfosforilada. En la patente US-7052870 se describen métodos para regular el mecanismo de la mTOR.

40 Guo y col. (J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [med. Sci.], 30(1), 2010) publican un estudio, en el que han explorado el mecanismo de protección de N2a con la melatonina en un modelo de isquemia/reperfusión por autofagia.

Ya se conocen métodos de modular la autofagia. La rapamicina inhibe específicamente la expresión de la mTOR, lo cual permite inducir el mecanismo de la autofagia. Sin embargo, la terapia de larga duración con rapamicina tiene efectos secundarios negativos, incluidas la deficiente curación de las heridas y la inmunosupresión.

45 Existe, pues, demanda de nuevos métodos para inhibir la expresión de la mTOR, aumentar la autofagia y reducir la neurodegeneración en animales caninos.

Resumen de la invención

50 Es, pues, objeto de la presente invención proporcionar métodos para reducir la neurodegeneración en animales caninos.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos para activar el mecanismo de autofagia en animales caninos.

55 Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos para inhibir la expresión de la mTOR en animales caninos.

60 Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos para inhibir la expresión de la quinasa S6 en animales caninos.

Uno o más de estos u otros objetos se alcanzan administrando melatonina a los animales en cantidades suficientes para reducir la neurodegeneración, activar el mecanismo de autofagia, inhibir la expresión de la mTOR, inhibir la expresión de la quinasa S6, o una combinación de los mismos. En general, la melatonina se administra a los animales caninos en cantidades comprendidas aprox. entre 1 ng/kg/día y 2 mg/kg/día.

Los expertos podrán apreciar fácilmente otros objetos adicionales, características y ventajas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “neurodegeneración” indica la pérdida progresiva de la estructura o la función neuronal, incluida la muerte de las neuronas.

El término “melatonina” indica la 5-metoxi-N-acetilriptamina y sus derivados o análogos, que tienen sustancialmente la misma actividad biológica que la 5-metoxi-N-acetilriptamina y sus compuestos previos (precursores) “in vivo”. El término significa además cualquier otra hormona que tenga sustancialmente la misma actividad biológica que la 5-metoxi-N-acetilriptamina sobre el mecanismo de autofagia.

El término “animal” indica cualquier animal canino que pueda beneficiarse de la reducción de la neurodegeneración.

El término “animales de compañía” significa animales caninos domesticados, por ejemplo perros.

El término “ng/kg” significa nanogramos por kilogramo del peso corporal de un animal.

El término “mg/kg” significa miligramos por kilogramo del peso corporal de un animal.

El término “suplemento dietético” significa un producto destinado a ingerirse como adición a la dieta animal normal. Los suplementos dietéticos pueden presentarse en diversas formas, p. ej. sólida, líquida, gel, tableta, cápsula, polvo y similares. Se presentan con preferencia en formas adecuadas de dosificación. En algunas formas de ejecución se proporcionan en envases a granel para el consumidor, por ejemplo polvos a granel, líquidos, geles o aceites. En otras formas de ejecución, los suplementos se presentan en cantidades de granel que pueden incluirse en otros productos alimentarios, por ejemplo bocado (snack), golosinas (treats), barras alimentarias, bebidas y similares.

Los intervalos aquí mencionados se emplean en forma abreviada, con el fin de evitar la enumeración completa y descripción de todos y cada uno de los valores del intervalo. Puede elegirse cualquier valor apropiado del intervalo, si procede, por ejemplo el valor más alto, el valor más bajo o el valor final del intervalo.

Tal como se emplea aquí, la forma singular de un término incluye también a las plurales y viceversa, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, las referencias “un”, “una”, “el” y “la” incluyen en general a los plurales de los términos en cuestión. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “un método” incluye a una pluralidad de tales “compuestos” o “métodos”. De igual manera, los términos “comprender”, “comprende” y “comprenden” deberá interpretarse en sentido inclusivo y no exclusivo. De igual manera, los términos “incluyen”, “incluir” y “o” deberían tomarse en sentido inclusivo, a menos que tal interpretación esté claramente prohibida por el contexto.

Los términos “comprender” o “incluir” se emplean para abarcar las formas de ejecución contempladas en los términos “constar esencialmente de” o “constar de”. De manera similar, el término “consta esencialmente de” se emplea para incluir las formas de ejecución contempladas en el término “consta de”.

Los métodos, composiciones y otras ventajas aquí descritas no se limitan a la metodología particular, protocolos y reactivos aquí descritos, porque son susceptibles de variación, tal como podrán apreciar los expertos. Además, la terminología aquí empleada está al servicio solamente de describir las formas de ejecución especiales y no pretende ni lo intenta limitar el alcance, que se describe o se reivindica.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos, los términos de este ámbito industrial y los acrónimos aquí empleados tienen los significados aceptados en general por los expertos en el o los ámbitos de la invención, o en el o los ámbitos en los que se emplea dicho término. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden emplear muchas composiciones, métodos, artículos de fabricación industrial u otros medios o materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, serán preferidas las composiciones, métodos, artículos de fabricación industrial u otros medios o materiales aquí descritos.

La invención

En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir la neurodegeneración en animales caninos. Los métodos consisten en administrar a los animales caninos una cantidad de melatonina que reduzca la neurodegeneración.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para activar el mecanismo de autofagia en los animales caninos. Los métodos consisten en administrar a los animales caninos una cantidad de melatonina que active el mecanismo de autofagia.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de la mTOR en animales caninos. Los métodos consisten en administrar a los animales caninos una cantidad de melatonina que inhiba la expresión de la mTOR.

5 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de la quinasa S6 en animales caninos. Los métodos consisten en administrar a los animales caninos una cantidad de melatonina que inhiba la expresión de la quinasa S6.

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para incidir en uno o más estados patológicos o enfermedades asociados con un aumento de la expresión de la mTOR en los animales caninos. Los métodos consisten en administrar a los animales caninos una cantidad de melatonina que incida en el estado patológico o la enfermedad. La melatonina puede emplearse para incidir en cualquier estado patológico o enfermedad asociada con un aumento de la expresión de la mTOR en los animales, p. ej. las enfermedades de las neuronas motoras. En general, la melatonina se administra al animal para disminuir la expresión de la mTOR y por tanto para incidir en el estado patológico o enfermedad con el fin de que el animal salga beneficiado de ello, p. ej. con un aumento de la salud o del bienestar de dicho animal, una reducción de la severidad del estado patológico o enfermedad, o un alivio de los síntomas provocados por dicha enfermedad o estado patológico.

20 La invención se basa en el descubrimiento básico de que la melatonina es eficaz para una o más de las siguientes: reducción de la neurodegeneración, activación del mecanismo de autofagia, inhibición de la expresión de la mTOR o inhibición de la expresión de la quinasa S6 en animales. Aunque no se asume ninguna teoría, se cree que la melatonina afecta o incide en la expresión de la mTOR y de la quinasa S6 y que regulando tal expresión activa el mecanismo de autofagia en las neuronas y reduce la neurodegeneración, que es el resultado de la acumulación de proteínas tóxicas en las neuronas.

25 En los métodos de la invención se administra la melatonina al animal en cualquier cantidad eficaz para reducir la neurodegeneración, activar el mecanismo de autofagia, inhibir la expresión de la mTOR, inhibir la expresión de la quinasa S6, incidir sobre uno o más estados patológicos o enfermedades asociados con un aumento de la expresión de la mTOR o una combinación de los mismos. Se administra la melatonina al animal en cantidades comprendidas entre aprox. 1 ng/kg/día y 2 mg/kg/día. Los expertos pueden escoger la cantidad de melatonina que se va a administrar al animal en base a su edad, tamaño, peso, salud, estado patológico y similares.

30 La melatonina se administra empleando cualquier método adecuado, con preferencia por vía oral. Normalmente se administra la melatonina en forma de cápsula, gel, tableta o cualquier otra forma adecuada de administración oral. En una forma preferida de ejecución se administra la melatonina como parte de una composición comestible, con preferencia una composición alimentaria o un suplemento dietético. En ciertas formas de ejecución se administra la melatonina como componente de una composición alimentaria para animales de compañía, con preferencia una composición alimentaria formulada para animales caninos, por ejemplo perros. En las formas de ejecución más preferidas, la composición alimentaria se formula para perros. En otras formas de ejecución se administra la melatonina como suplemento dietético.

35 Para la administración oral puede incorporarse la melatonina por ejemplo a tabletas o cápsulas fabricadas por medios convencionales junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo ligantes (p. ej. almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas de relleno (p. ej. lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (p. ej. estearato magnésico, talco o sílice); desintegrantes (p. ej. almidón de patata o almidón-glicolato sódico); o agentes humectantes (p. ej. laurilsulfato sódico). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma por ejemplo de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como producto seco para reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden fabricarse por medios convencionales junto con aditivos farmacéuticamente aceptables, como son los agentes de suspensión (p. ej. jarabe de sorbita, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej. lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej. aceite de almendras, ésteres de tipo aceite, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej. p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener además sales tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, si procede. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse de modo conveniente para proporcionar una liberación controlada de la melatonina. En una forma preferida de ejecución se incorpora la melatonina a una tableta o a una cápsula.

40 Se administra la melatonina al animal es en cualquier forma de melatonina adecuada para la administración a un animal. Se obtiene la melatonina de cualquier fuente apropiada, sintética o natural. Una fuente preferida de melatonina es la melatonina sintética, p. ej. en formas de tableta, cápsula o tableta sublingual. Otras fuentes de melatonina incluyen las naturales, p. ej. las algas, hongos y plantas, p. ej. semillas y nueces. La melatonina puede derivarse de una mezcla de fuentes de melatonina, ya sean naturales, ya sean sintéticas. Para las composiciones comestibles, la melatonina se deriva normalmente de algas u otros ingredientes naturales, que se incluyen como componentes de la composición comestible, p. ej. una composición alimentaria para animales de compañía.

En otro aspecto, la invención proporciona envases útiles para contener la melatonina de la invención. El envase consta por lo menos de un material apropiado para contener la melatonina y una etiqueta pegada al material que contiene una palabra o varias palabras, dibujo, diseño, acrónimo, eslogan, frase u otro dispositivo o combinaciones de los mismos, que indique que el envase contiene un compuesto útil para reducir la neurodegeneración, activar el mecanismo de autofagia, inhibir la expresión de la mTOR, inhibir la expresión de la quinasa S6, incidir en uno o más estados patológicos o enfermedades asociados con el aumento de la expresión de la mTOR en los animales, o una combinación de los mismos. Normalmente tal dispositivo contiene las palabras “neurodegeneración reducida” o “activa la autofagia” o “inhibe la expresión de la mTOR” o “inhibe la expresión de la quinasa S6” o “incide sobre uno o más estados patológicos o enfermedades asociados con un aumento de la expresión de la mTOR” o “retarda el envejecimiento” o una expresión equivalente impresa en el material. Es útil para la invención cualquier configuración de envase y de material de envase adecuado para contener la melatonina, p. ej. una bolsa (bag), una caja, una bolsita (sachet), una botella, un bote, una bolsa pequeña (pouch) y similares, fabricados con papel, plástico, lámina, metal y similares. En las formas preferidas de ejecución, el envase contiene además la melatonina. En varias formas de ejecución, el envase contiene también por lo menos una ventana que permite ver el contenido del envase sin necesidad de abrir dicho envase. En algunas formas de ejecución, la ventana es una porción transparente del material de envase. En otras, la ventana es una porción omitida en el material de envase.

En otro aspecto, en la invención se describen métodos para inhibir la expresión de la mTOR o la quinasa S6 en neuronas “in vitro”. Los métodos consisten en exponer las neuronas a la cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la mTOR o que inhibe la expresión de la quinasa S6. Por lo general, las neuronas se exponen a un medio de cultivo celular con o sin suero que normalmente contiene niveles muy bajos o no detectables de melatonina. Por lo tanto, la exposición de las neuronas a un medio enriquecido en melatonina sintética o melatonina extraída o melatonina de fuentes naturales inhibe la expresión de la mTOR o la expresión de la quinasa S6, induce los procesos de autofagia o reduce la neurodegeneración.

En otro aspecto, en la invención se describen métodos para inhibir la expresión de la mTOR o de la quinasa S6 en células “in vitro”. Estas células incluyen, pero no se limitan a células primarias obtenidas de animales completos, células de líneas celulares establecidas o células transformadas de un tipo a otro. Estos métodos consisten en exponer las células a una cantidad de melatonina que inhiba la expresión de la mTOR o que inhiba la expresión de la quinasa S6. En general, las células se exponen a medios de cultivo celular con o sin suero, que normalmente contienen niveles muy bajos o no detectables de melatonina. Por lo tanto, la exposición de las células a un medio enriquecido en melatonina sintética o extraída o melatonina de fuentes naturales inhibe la expresión de la mTOR o de la quinasa S6, induce los procesos de autofagia o reduce la neurodegeneración.

## Ejemplos

La invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, aunque se da por supuesto que estos ejemplos se facilitan con fines meramente ilustrativos y no se pretende limitar con ellos el alcance de la invención, a menos que se indique específicamente lo contrario.

### Ejemplo 1

Procedimiento de cultivo celular: se obtienen las células de riñón canino Madin Darby (MDCK), que son un producto comercial, de la ATCC en forma de suspensión patrón de células inmortalizadas. Las células MDCK se cultivan a 37°C en una atmósfera del 95 % de aire y un 5 % de CO<sub>2</sub> y en un medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) que contiene un 10% de suero fetal bovino y un 1% de una solución de antibiótico/antimicrobiano (cargada en el DMEM). Se cambia el medio y se pasan las células cada 1 - 2 días empleando una solución que contiene un 0,05% de tripsina. Para la extracción del RNA se depositan las células en placas con una densidad de siembra de 50.000 a 60.000 células/cm<sup>2</sup> en platos de 35 mm. Veinticuatro horas después de la siembra se cambia el medio por el control (cargado en el DMEM) o por un medio de ensayo (cargado en el DMEM + melatonina 1 nM). Se recolectan las células los días 1, 3 ó 5 días después de la exposición al control o al medio de ensayo. Se cambia el medio de los platos restantes en los días de la recolección de las células.

Se recolecta el RNA total de los lisados de las células MDCK empleando un reactivo de estabilización del RNA llamado RNAlater con arreglo a las instrucciones del fabricante (Ambion, Austin, Texas). Se analizan los transcritos de mRNA de la mTOR, la quinasa S6 y los genes de la proteína de unión de la caja TATA por qPCR semicuantitativo en los días 1, 3 y 5 después del tratamiento con el medio. El transcrito del gen de la proteína de unión de la caja TATA se emplea para normalizar la expresión de la mTOR y la quinasa S6, ya que este se emplea habitualmente como gen imprescindible de mantenimiento (“housekeeping” gen).

### Ejemplo 2

Se repite el procedimiento del ejemplo 1. En la tabla 1 se recogen los datos del ejemplo 1 y del ejemplo 2.

Tabla 1

tratamiento	ensayo 1		ensayo 2	
	inducción de mTOR	inducción de quinasa S6	inducción de mTOR	inducción de quinasa S6
día 1 medio de control	1,19	1,21	1,07	1,08
día 1 medio control + melatonina 1 nM	0,93	1,14	0,98	1,05
día 3 medio de control	1,05	0,92	1,05	0,99
día 3 medio control + melatonina 1 nM	0,76	0,66	1,02	0,82
día 5 medio de control	1,22	1,13	1,09	0,99
día 5 medio control + melatonina 1 nM	0,49	0,51	1,01	0,75

Respecto a la tabla 1, las células MDCK tratadas con melatonina 1 nM en el medio de cultivo celular durante hasta 5 días inducirán una disminución del 7,4 al 59,5% de la expresión del mRNA de la mTOR si se comparan con las células de control que no se han tratado. Se observa además que la quinasa S6, que es una proteína diana de la mTOR y es la que causa la activación (por fosforilación) de las proteínas ribosómicas para estimular la síntesis de la proteína, sufre una disminución en la expresión del mRNA del 24,2 al 55 %. Esta disminución en la expresión de la mTOR y de la quinasa S6 indica que la melatonina inhibe el mecanismo de la mTOR. Estos resultados indican que la administración de la melatonina a los animales es útil para reducir la neurodegeneración, activar el mecanismo de autofagia, inhibir la expresión de la mTOR, aumentar la expresión del gen atg5, aumentar la expresión de los genes atg7, incidir sobre uno o más estados patológicos o enfermedades asociados con un aumento de la expresión de la mTOR, o una combinación de los mismos en dichos animales.

En la descripción se han indicado las formas de ejecución preferidas típicas de la invención. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. La cantidad de melatonina que reduce la neurodegeneración para el uso en reducir la neurodegeneración en un animal canino, dicha melatonina se administra en cantidades comprendidas aprox. entre 1 ng/kg/día y 2 mg/kg/día.
2. La cantidad de melatonina que reduce la neurodegeneración para el uso según la reivindicación 1, dicha melatonina se administra en una composición comestible, p. ej. una composición alimentaria.
- 10 3. La cantidad de melatonina que reduce la neurodegeneración para el uso según la reivindicación 2, dicha melatonina se administra como suplemento dietético.
- 15 4. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la mTOR para el uso en la inhibición de la expresión de la mTOR en un animal canino, dicha melatonina se administra en cantidades comprendidas entre aprox. 1 ng/kg/día y 2 mg/kg/día.
- 20 5. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la mTOR para el uso según la reivindicación 4, dicha melatonina se administra en una composición comestible.
6. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la mTOR para el uso según la reivindicación 5, dicha melatonina se administra como suplemento dietético.
- 25 7. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la quinasa S6 para el uso en reducir la neurodegeneración inhibiendo la expresión de la quinasa S6 en un animal canino, dicha melatonina se administra en cantidades comprendidas entre aprox. 1 ng/kg/día y 2 mg/kg/día.
8. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la quinasa S6 para el uso según la reivindicación 7, dicha melatonina se administra en una composición comestible o como suplemento dietético.
- 30 9. La cantidad de melatonina que inhibe la expresión de la quinasa S6 para el uso según la reivindicación 8, dicha composición comestible es una composición alimentaria.