

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 604**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2012 PCT/FR2012/000193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12728639 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2717891**

54 Título: **Composición de Bixa orellana para el tratamiento de la degeneración macular**

30 Prioridad:

13.05.2011 FR 1154172

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

73 Titular/es:

**BIOPHYTIS (50.0%)
14 avenue de l'Opéra
75001 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VEILLET, STANISLAS;
LAFONT, RENÉ;
FONTAINE, VALÉRIE y
SAHEL, JOSÉ-ALAIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 609 604 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

Composición de *Bixa orellana* para el tratamiento de la degeneración macular

La invención se refiere al uso de compuestos y de una composición para prevenir ciertas afecciones de la retina.

La invención tiene por objeto mejorar la visión de los individuos afectados, o al menos estabilizar la evolución de estas afecciones.

La degeneración macular asociada a la edad, o DMAE, es una enfermedad degenerativa de la retina crónica, progresiva e incapacitante, que afecta a las personas mayores y cuyo origen es multifactorial (Bellman et Sahel, 2007). En Francia, es la primera causa de discapacidad visual después de los 50 años y se estima en un millón el número de personas afectadas. La predisposición genética a la enfermedad (Fajnkuchen et Cohen, 2008) es responsable de un número creciente de casos de mala visión, proporcional al aumento de la esperanza de vida. Esta enfermedad afecta a una pequeña parte de la retina, la mácula, una zona que sirve para fijar los objetos, leer, reconocer las caras y distinguir los colores. La DMAE es sin duda muy poligénica con la intervención de factores de riesgo como la exposición prolongada a la luz, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia y el tabaquismo. Existen dos tipos de DMAE, la forma seca o atrófica que representa el 80% de los casos, y la forma húmeda o exudativa. Sólo esta última, caracterizada por la aparición de nuevos vasos detrás de la retina, puede actualmente beneficiarse de los tratamientos.

Los mecanismos fisiopatológicos de la DMAE son aún poco conocidos, pero la implicación de los procesos de intoxicación que conducen a la muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) ha sido establecida en los últimos años. De hecho, durante el envejecimiento, estas células pueden presentar problemas operativos asociados a la acumulación en los lisosomas de los complejos proteo-lipídicos denominados gránulos de lipofuscina. Estos gránulos se forman progresivamente por una acumulación de proteínas y lípidos no degradados procedentes de segmentos externos de los fotorreceptores fagocitados por el EPR (Finnemann et al., 2002). La lipofuscina contiene también compuestos citotóxicos derivados del ciclo visual, como la A2E, que se forma por adición de dos moléculas de trans-retinal con una molécula de etanolamina. Bajo el efecto de la luz azul, la A2E se oxida e induce oxidaciones protéicas, lipídicas y del ADN, provocando de este modo un estrés oxidante importante en las células del EPR durante el envejecimiento (Kim et al., 2006). Los intentos de prevención o tratamiento de la forma seca de la DMAE se basan en una complementación nutricional con sustancias susceptibles de reducir la acumulación y/o los efectos deletéreos de la A2E (Dubernard et al., 2006; Souied et al., 2007; Dutot et al., 2008; Lecerf, 2009; Cohen et al., 2010; Lecerf et Desmettre, 2010).

Teniendo en cuenta el papel muy probable de este mecanismo en el desarrollo de la DMAE, los inventores han utilizado un modelo celular de fototoxicidad inducida por la asociación de un tratamiento con A2E y una iluminación con luz azul de los cultivos primarios del EPR en el que se ha medido la supervivencia celular. Este modelo, desarrollado por el *Institut de la Vision*, permite así realizar el cribado de moléculas para el descubrimiento de nuevos candidatos para el tratamiento de la forma seca de la DMAE. Este modelo original está más cerca de la situación "fisiológica" que las líneas celulares utilizadas comúnmente en otros laboratorios (Dunn et al., 1996), porque las células utilizadas contienen sustancias protectoras aportadas por la alimentación del animal y por tanto no se encuentran en situación de "carencia" y su perturbación es provocada por el aporte de A2E.

La invención prevé por tanto encontrar un tratamiento alternativo a los ya existentes.

Más precisamente, los inventores han descubierto que la incubación previa de células con ciertas moléculas permitía disminuir en gran medida la muerte celular provocada por una iluminación con radiación azul de células del EPR tratadas previamente con A2E.

Según la invención, estas moléculas están presentes en un extracto de bija, o bien proceden de derivados del ácido gálico o de compuestos de la familia de las antocianidinas.

Un aspecto de la invención se refiere por tanto a una composición que comprende un extracto de semillas de bija, para la fotoprotección de las células del epitelio pigmentario de la retina en mamíferos.

La bija, o urucú, o *Bixa orellana* es un árbol o arbusto de América tropical. Da frutos rojos con espinas rellenos de semillas.

En el marco de la invención, se entiende por "extracto de semillas de *Bixa orellana*" un extracto preparado a partir de la parte externa de las semillas, es decir de la sustancia cerosa que recubre las semillas de *Bixa orellana*. Se sabe que esta sustancia cerosa es rica en bixina y carotenoides, así como se conoce su uso como colorante alimentario.

Se conoce por el documento WO 01/85183 una composición para la prevención y el tratamiento de trastornos oculares, pudiendo incluir dicha composición un extracto de *Bixa orellana* como inhibidor de la aldosa-reductasa.

Este extracto que comprende ácido gálico y/o pirogalol, se trata verdaderamente de un extracto de hojas de *Bixa orellana*, tal como ha descrito Terashima et al. (Chem. Pharm. Bull. **39**(12), 3346-3347 (1991)), que muestra efecti-

vamente su actividad como inhibidor de la aldosa-reductasa.

Además, el documento WO 01/85183 muestra la inhibición de la aldosa-reductasa como formando parte de un mecanismo de protección contra las cataratas y la retinopatía diabética.

5 El documento WO 01/85183 no muestra por tanto la eficacia de un extracto de semillas de *Bixa orellana* para la fotoprotección de las células del EPR.

Según un modo de realización de la presente invención, la composición a base de semillas de *Bixa orellana* está destinada al tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en mamíferos.

10 Según otro modo de realización de la invención, la composición está destinada al tratamiento de la enfermedad de Stargardt y/o la retinopatía pigmentaria. La enfermedad de Stargardt, o síndrome de Stargardt, es una patología hereditaria, que asocia una disminución de la agudeza visual bilateral a una atrofia de la mácula.

Según otro modo de realización de la invención, la composición está destinada a prevenir daños de la retina susceptibles de ser causados por la exposición a la radiación azul. Por radiación azul se entiende la radiación correspondiente a la banda azul del espectro de luz visible, es decir la longitud de onda comprendida entre 435 y 490 nm.

15 Según un modo de realización de la invención, la composición comprende además un derivado de ácido gálico y/o un compuesto de la familia de las antocianidinas.

El derivado de ácido gálico puede ser ácido elágico, principalmente purificado o aportado en forma de un extracto de granada. En efecto, la granada contiene ácido elágico en cantidades importantes (Panichayupakarananta et al., 2010).

20 El compuesto de la familia de las antocianidinas puede ser cianidina, principalmente purificada o aportada en forma de un extracto de acai. Esta planta contiene en efecto glicósidos de cianidina. La cianidina puede igualmente ser aportada en forma de un extracto de hibisco.

La composición a base de semillas de *Bixa orellana* se puede utilizar en forma de un alimento, un complemento alimenticio o un medicamento.

25 Por complemento alimenticio, se entiende un producto que contiene dicho compuesto o dicho extracto o está enriquecido en dicho compuesto, teniendo por objeto dicho extracto complementar la alimentación aportando nutrientes beneficiosos para la salud según la definición dada por la Directiva Europea 2002/46/CE. Por ejemplo, un complemento alimenticio puede ser una cápsula o comprimido para tragar o un polvo o pequeña ampolla para mezclar con un alimento y que presenta efectos beneficiosos sobre la retina.

30 Por medicamento, se entiende un producto que contiene una dosis precisa de dicho compuesto, o de dicho extracto, según la definición dada por la Directiva Europea 65/65/CE, es decir, cualquier sustancia o composición que se presenta como poseedora de propiedades curativas o preventivas respecto a enfermedades humanas o de animales. Por ejemplo, el medicamento que contiene el compuesto en dosis terapéuticas se pueden administrar por vía oral como una cápsula o comprimido o se puede inyectar por vía intravítrea o cualquier otra vía que permita conferir efectos beneficiosos a la retina.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende un derivado del ácido gálico y/o un compuesto de la familia de las antocianidinas, para la fotoprotección de las células del epitelio pigmentario de la retina en mamíferos.

40 El derivado del ácido gálico es preferiblemente el ácido elágico, principalmente purificado o aportado en forma de un extracto de granada. El compuesto de la familia de las antocianidinas es preferiblemente cianidina, principalmente purificada o aportada en forma de un extracto de acai o hibisco.

Las aplicaciones de esta otra composición son las mismas que las de la composición previamente citada, que comprende un extracto de semillas de *Bixa orellana*. Como esta última, esta otra composición se puede utilizar en forma de un alimento, un complemento alimenticio o un medicamento.

45 La invención se comprenderá mejor a partir de la lectura de la siguiente descripción y del examen de las figuras que se acompañan. Estas son indicativas y de ninguna manera limitativas de la invención.

La figura 1 ilustra el efecto de un extracto de bija, bixina y norbixina sobre la protección del EPR sometido a ensayo de fototoxicidad.

La figura 2 ilustra el efecto de ácido clorogénico, rutina y ácido elágico sobre la protección del EPR sometido a ensayo de fototoxicidad.

50 La figura 3 ilustra el efecto de cianidina, 3-glucósido de cianidina, 3-sambubiósido de delfinidina y 20-hidroxiecdisona sobre la protección del EPR sometido a ensayo de fototoxicidad.

Ejemplos de realización de la invención

I. Preparación de un extracto de *Bixa orellana* (extracto A)

5 El extracto A se prepara por agitación de semillas de bija en etanol absoluto (3 L por kg de semillas) durante 16 horas. La agitación en alcohol tiene por efecto separar la película cerosa que se encuentra en la superficie de las semillas.

Se obtiene una suspensión. Se pasa por un tamiz con el fin de eliminar las semillas de bija. Esta suspensión se reduce a continuación hasta 1/8 y luego se decanta. Se forma un depósito sólido.

Se elimina el líquido sobrenadante, rico en lípidos. Al depósito sólido se le añade maltodextrina y se seca por pulverización.

10 El extracto A contiene 16% en masa de bixina. En los siguientes ejemplos, la concentración del extracto se expresa en equivalentes de bixina.

El extracto A es igualmente rico en carotenoides. Contiene igualmente otros compuestos terpénicos, tales como geranil-geraniol y tocotrienoles (90% de δ y 10% de β), así como varios flavonoides.

El extracto A presenta las siguientes características para 100 g (Tabla 1):

15 *Tabla 1*

| | |
|------------------------------|-------------|
| Valor energético | 319,04 Kcal |
| Glúcidos por diferencia | 38,10 g |
| Bixina | 16 g |
| Proteínas | 7,7 g |
| Materia grasa por hidrólisis | 1,6 g |
| Fibras totales | 27,9 g |
| Sodio | 8,2 mg |
| Humedad | 6% |
| Materias minerales | 4,3 % |

Según una variante de la invención, el extracto A puede ser sometido a saponificación, con el fin de transformar la totalidad o parte de la bixina del extracto en norbixina.

II. Ensayos de actividad

20 Los inventores analizaron 15 sustancias naturales y el extractos A en un modelo celular de fototoxicidad del EPR descrito a continuación (Tabla 2).

Tabla 2

| Tipo | Nombre del compuesto | Fuente (ejemplo) |
|---------------------|----------------------|------------------|
| Controles positivos | Luteína | Espinacas |
| | Zeaxantina | Maíz |
| | Resveratrol | Uvas |
| Carotenoides | Bixina | Bija |
| | Norbixina | " " |
| | Extracto A | " " |
| | Crocetina | Azafrán |
| Ácido fenólico | Ácido clorogénico | Yerba mate |
| Flavona | Orientina | Acai |
| Flavonol | Rutina | Hierba sarracena |

| Tipo | Nombre del compuesto | Fuente (ejemplo) |
|---------------|--------------------------------|------------------|
| Flavanona | Naringenina | Limón |
| Benzipirano | Ácido elágico | Granada |
| Antocianinas | 3-glucósido de cianidina | Acai |
| | 3-sambubiósido de delphinidina | Hibisco |
| Antocianidina | Cianidina* | Acai* |
| Esteroides | 20-Hidroxiecdisona | Quinoa |

*La cianidina se prepara por hidrólisis ácida de sus formas glicosiladas

Con el fin de analizar el efecto fotoprotector de las sustancias ensayadas, los inventores utilizaron un modelo celular de fototoxicidad inducida por tratamiento con A2E seguido por iluminación con radiación azul. Este modelo se realizó a partir de cultivos primarios del EPR de cerdo adulto. La supervivencia celular se determinó por la relación entre el número de células vivas y el número total de células (vivas + muertas, cuantificadas respectivamente usando tinciones específicas). La obtención de imágenes se realizó con un microscopio de fluorescencia controlado por el programa informático Metamorph y las cuantificaciones se realizaron por tratamiento de las imágenes obtenidas por un programa de cuantificación asignado. Los experimentos se realizaron en microplacas de 96 pocillos por cuadruplicado y el experimento se repitió al menos cuatro veces. Las células se trataron durante 48 horas con estos compuestos de las cuales las últimas 24 horas fueron en presencia de A2E, antes de la inducción de la fototoxicidad. Para cada compuesto se analizaron tres concentraciones (0,1, 1 y 10 μM). Ciertos compuestos se sometieron a ensayos suplementarios a 20 μM con el fin de obtener un intervalo de concentraciones.

III. Resultados

Los resultados, presentados en forma de valores medios y desviaciones típicas, se expresan en porcentaje de supervivencia en comparación con el control sin A2E.

Los experimentos no mostraron efecto protector de los 15 compuestos ni del extracto a concentraciones de 0,1 y 1 μM (resultados no mostrados para luteína, zeaxantina, resveratrol, crocetina, naringenina y orientina y resultados mostrados para extracto de bija, cianidina y ácido elágico, Figuras 1 a 3).

En una serie de ensayos ($n = 5$), el extracto A permitió observar una protección importante, con una supervivencia celular a 20 μM del orden de 93% la del control sin A2E, en comparación con la del control + A2E, que no es más que del 45% (Figura 1).

Entre los 15 compuestos analizados a 10 μM , dos proporcionan protección celular contra la fototoxicidad.

Principalmente, a 10 μM , la cianidina proporciona protección del orden del 87% en comparación con el control sin A2E. A 20 μM , este mismo compuesto proporciona una protección casi total (Figura 2).

El ácido elágico proporciona igualmente una protección del orden del 68% en comparación con el control sin A2E. A 20 μM , este compuesto proporciona una protección del mismo orden que la medida a 10 μM , pero con mejor reproducibilidad (Figura 3).

Los efectos fotoprotectores esperados para luteína, zeaxantina y resveratrol ("controles positivos") no se observaron en estas condiciones experimentales.

30 Referencias

Bellmann C, Sahel J-A. 2007. Aspects pathogéniques de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). J. Fr. Ophthalmol. 30 (hors-série 1), 1S11-1S16.

Cohen SY, Mauget-Faysse M, Oubraham H, Algan, M, Conrath J, Roquet W. 2010. Impact des habitudes nutritionnelles sur la pathologie maculaire évalué par mesure de la densité optique du pigment maculaire. J. Fr. Ophthalmol. 33, 234-240.

Dubernard G, Adam R, Proenca J, Offret H, Labetoulle M. 2006. Alimentation et dégénérescence maculaire liée à l'âge. NPG 6(33), 19-21.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Exp. Eye Res. 62, 155-169.

40 Dutot M, Rambaux L, Warnet JM, Rat P. 2008. Modulation du stress oxydant par la myrtille riche en polyphénols sur un modèle de cellules humaines de rétine. J. Fr. Ophthalmol. 31(10), 975-980.

Fajnkuchen F, Cohen SY. Dégénérescence maculaire liée à l'âge et génétique: données actuelles. J. Fr. Ophtalmol. 31(6), 630-637.

5 Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. 2002. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 3842-2847.

Kim SR, Nakanishi K, Itagaki Y, Sparrow JR. 2006. Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin. Exp. Eye Res. 82, 828-839.

Lecerf J-M. 2009. Micronutriments: l'exemple de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Médecine Maladies Métaboliques 3(5), 496-501.

10 Lecerf J-M, Desmettre T. 2010. Nutrition et dégénérescence maculaire liée à l'âge. J. Fr. Ophtalmol. 33, 749-757.

Panichayupakarananta P, Issuriya A, Sirikatitham A, Wang W. 2010. Antioxidant assay-guided purification and LC determination of ellagic acid in pomegranate peel. J. Chrom. Sci. 48, 456-459.

Souied E, Le Tien V, Coscas G, Soubrane G. 2007. Vers la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. J. Fr. Ophtalmol. 30(5), 449-455.

15

REIVINDICACIONES

- 1 - Composición que comprende un extracto de semillas de *Bixa orellana* para la fotoprotección de células del epitelio pigmentario de la retina en mamíferos.
- 5 2 - Composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su aplicación en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en mamíferos.
- 3 - Composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Stargardt y/o la retinopatía pigmentaria.
- 4 - Composición de acuerdo con la reivindicación 1, para prevenir daños en la retina que pueden ser causados por la exposición a radiación azul de longitud de onda comprendida entre 435 y 490 nm.
- 10 5 - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un vehículo aceptable para ser ingerido o inyectado en el ojo o inyectado en la sangre.
- 6 - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, como medicamento o complemento alimenticio o alimento.
- 15 7 - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un derivado de ácido gálico y/o un compuesto de la familia de las antocianidinas.
- 8 - Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque el derivado del ácido gálico es el ácido elálgico.
- 9 - Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizada porque el compuesto de la familia de las antocianidinas es la cianidina.

FIGURA 1

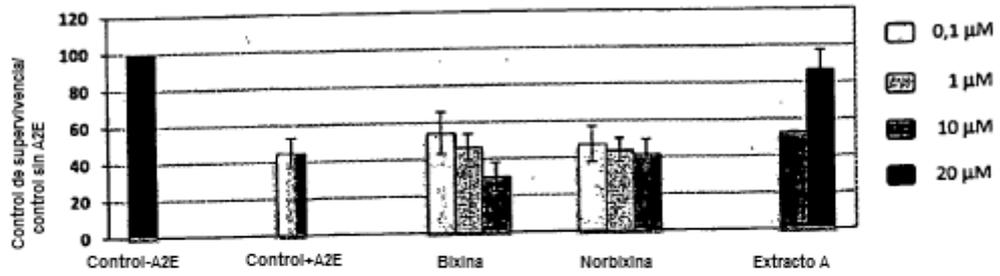


FIGURA 2

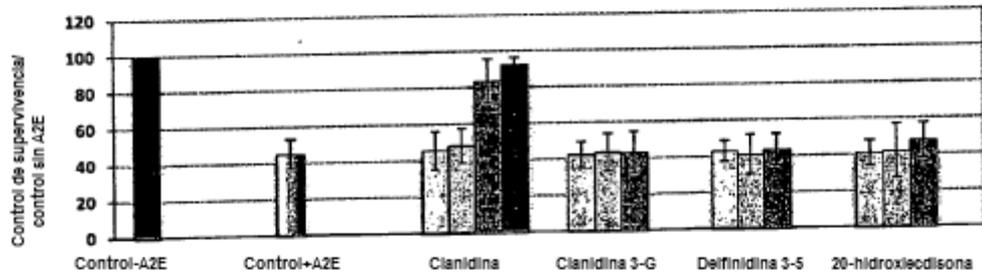


FIGURA 3

