

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 343**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2013 PCT/SE2013/051098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14046603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2013 E 13773433 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2897604**

54 Título: **Composiciones para la mejora de la función cerebral**

30 Prioridad:

19.09.2012 SE 1200567
19.09.2012 US 201261703163 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2018

73 Titular/es:

GRESPO AB (100.0%)
Sveavägen 17 14 tr
111 57 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

PIERZYNOWSKI, STEFAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 681 343 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

Composiciones para la mejora de la función cerebral

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina y de los productos nutracéuticos, en particular, al tratamiento de trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos, y a la mejora de la función cerebral.

10 Antecedentes

Hace ya tiempo que se sabe que la formación de nuevas neuronas a partir de células madre neuronales (neurogénesis) continúa durante toda la vida en mamíferos adultos, incluidos los seres humanos, aunque tiene una clara tendencia a disminuir con la edad. Uno de los locus más activos para la neurogénesis en adultos es el hipocampo, que desempeña un papel crucial en la memoria y navegación espacial. El hipocampo también es una de las primeras regiones afectadas por la enfermedad de Alzheimer. La estimulación de la neurogénesis en adultos ha sido objeto de intensa investigación considerando la hipótesis de que varios trastornos neurológicos (en particular, trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer así como la depresión) puedan tratarse de este modo.

Los eosinófilos (o granulocitos eosinófilos) son glóbulos blancos que intervienen en la defensa contra parásitos, pero también intervienen en muchas enfermedades neoplásicas, autoinmunitarias y alérgicas. Hay varios tratamientos que reducen el número de eosinófilos tales como corticosteroides, mepoluzimab, reslizumab, antagonistas de los receptores de leucotrienos e imatinib, ninguno de los cuales está exento de inconvenientes.

El documento WO 2006/016828 da a conocer el uso terapéutico del ácido α -cetoglutarico (AKG) para tratar trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer.

El documento EP 1 915 913 A1 da a conocer un producto alimenticio que comprende AKG, una lipasa y una proteasa.

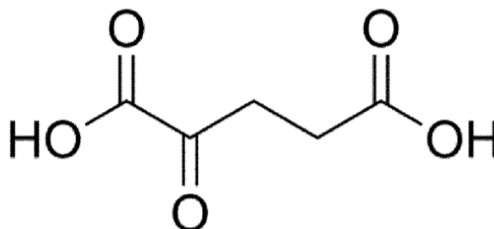
El documento US 2011/064712 A 1 describe un suplemento dietético, que comprende AKG, una lipasa, una proteasa y una amilasa.

Existe una necesidad médica considerable no satisfecha de tratamientos alternativos y/o mejorados de trastornos que cursan con eosinofilia, trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos, y de la mejora de la función cerebral.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar tales tratamientos y medios para tales tratamientos.

40 Definiciones

A lo largo de esta solicitud, a menos que se especifique lo contrario, la abreviatura AKG se refiere al ácido alfa-cetoglutarico (véase la fórmula I):



Fórmula I

así como cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Tales sales de la invención pueden ser inorgánicas u orgánicas. Los ejemplos de sales preferibles incluyen sales de sodio y calcio del ácido alfa-cetoglutarico (designadas Na-AKG y Ca-AKG, respectivamente). Otras sales preferibles incluyen potasio-AKG y magnesio-AKG, así como sales orgánicas del ácido alfa-cetoglutarico en las que el contraión es un aminoácido presente de forma natural en proteínas (tales como arginina, leucina, isoleucina), piridoxina, quitosano, creatina u ornitina.

El término *sal farmacéuticamente aceptable* abarca cualesquiera sales que son farmacéuticamente aceptables en el sentido de que no son tóxicas para el sujeto previsto en las dosis previstas, y son suficientemente estables y solubles para la finalidad prevista. Preferiblemente, el contraión de alfa-cetoglutarato en una sal farmacéuticamente aceptable de la invención no es un principio activo de por sí, aunque puede que en algunos casos sea aceptable que el contraión sea un principio activo.

El término *lipasa*, en el contexto de la presente invención, se refiere a enzimas que catalizan la liberación hidrolítica de ácidos grasos a partir de triglicéridos que liberan ácidos grasos y glicerol, monoglicéridos y/o diglicéridos. Preferiblemente, una lipasa cataliza la liberación de ácido graso poliinsaturado (PUFA, por sus siglas en inglés) de cadena larga o cadena media. En este contexto, "cadena larga" puede referirse a ácidos grasos que tienen colas con más de 12 carbonos de longitud y "cadena media" a ácidos grasos que tienen colas de 6-12 carbonos de longitud. Poliinsaturado quiere decir que hay al menos dos dobles enlaces entre los átomos de carbono en la cola de ácidos poliinsaturados. Los ejemplos de PUFA incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido linoeláidico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Es preferible que la actividad de la lipasa de la presente invención sea sustancialmente independiente del pH y que la lipasa sea activa a pH 6-8.

El término *lipasa*, en el contexto de la presente invención, comprende lipasas de cualquier origen, incluyendo origen humano, animal, vegetal y fúngico, bacteriano, eucariota y procariota, independientemente de que la lipasa haya sido producida por medios recombinantes o por medios no recombinantes.

Preferiblemente, la lipasa es o se ha convertido en estable en medio ácido. Una lipasa estable en medio ácido de este tipo puede ser lipasa-CLEC (cristales enzimáticos reticulados). En la técnica, se conocen cristales de lipasa-CLEC de este tipo y métodos para su fabricación, por ejemplo, a partir del documento US2006/0121017. También es posible utilizar lipasas que no son estables en medio ácido si la cantidad administrada se incrementa para compensar la pérdida de actividad en el estómago, reduciendo la acidez del estómago del paciente con antiácidos, inhibidores de la bomba de protones y otros medios farmacológicos adecuados, o si la lipasa se formula en una formulación gastroprotectora muy conocida en la técnica.

El término *proteasa*, en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteinasa, enzima proteolítica o peptidasa, que es una enzima que cataliza la ruptura de enlaces amida peptídicos interiores en una proteína. Específicamente, las proteasas catalizan la conversión de proteínas en proteínas/péptidos más pequeños y/o sus aminoácidos componentes por ruptura de la unión amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Las proteasas se identifican generalmente por su tipo catalítico, p. ej., ácido aspártico peptidasas, cisteína (tiol) peptidasas, metalopeptidasas, serina peptidasas, treonina peptidasas, proteasas alcalinas o semialcalinas, neutras y peptidasas de mecanismo catalítico desconocido (véase <http://merops.sanger.ac.uk>). Cualquier tipo catalítico queda abarcado por el término en el contexto de la presente invención. El término *proteasa*, en el contexto de la presente invención, comprende proteasas de cualquier origen, incluyendo origen humano, animal, vegetal y fúngico, bacteriano, eucariota y procariota, independientemente de que la proteasa haya sido producida por medios recombinantes o por medios no recombinantes.

El término *amilasa*, en el contexto de la presente invención, se refiere a enzimas amilasas que tienen especificidad para gran variedad de sustratos y catalizan la hidrólisis de uniones α -1,4-glucosídicas del almidón, glucógeno y polisacáridos relacionados que contienen tres o más unidades de D-glucosa unidas por uniones α -1,4, obteniéndose maltosa, glucosa y/o dextrinas límite de 2-3 unidades. El término *amilasa*, en el contexto de la presente invención, comprende amilasas de cualquier origen, incluyendo origen humano, animal, vegetal y fúngico, bacteriano, eucariota y procariota, independientemente de que la amilasa haya sido producida por medios recombinantes o por medios no recombinantes.

El término "unidad USP" se refiere a la unidad de actividad enzimática de la Farmacopea de los Estados Unidos presente en un agente o composición. Una unidad USP de lipasa, proteasa o amilasa se define en Pancrelipase, USP, U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP 24, págs. 1254-1255 (2000).

El término *neurogénesis*, en el contexto de la presente invención, se considera que significa el proceso mediante el cual se forman neuronas a partir de células madre neuronales. En la neurogénesis, hay una producción activa de nuevas neuronas, astrocitos, glía y otros linajes neuronales a partir de células madre o progenitoras neuronales no diferenciadas.

El término *enfermedad neurodegenerativa*, en el contexto de la presente invención, es un término genérico para cualquier enfermedad que provoca la pérdida progresiva de la estructura y/o función de neuronas, con o sin la muerte de neuronas. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica.

El término *pancrelipasa*, en el contexto de la presente invención, no abarca únicamente la pancrelipasa según el significado normal del término en la técnica, sino incluso preparados similares tales como pancreatina, y preparados similares procedentes de cualquier fuente animal.

Breve descripción de los dibujos

Para consultar una explicación de los grupos, véase la tabla 1 y el ejemplo 1.

- 5 La figura 1 ilustra neurogénesis en adultos incrementada detectada por un número incrementado de neuronas positivas para la nestina por 1 mm de longitud de capa piramidal en la zona CA1 del hipocampo por medio de la presente invención. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.
- 10 La figura 2 ilustra un rendimiento cognitivo mejorado por medio de la presente invención, detectado en el porcentaje de alteraciones espontáneas en una prueba de laberinto en T. (+) denota intentos correctos – el animal visitó los brazos izquierdo y derecho, (-) denota intentos incorrectos – el animal visitó el mismo brazo dos veces.
- 15 La figura 3 ilustra resultados del análisis bioquímico de sangre. Figura 3A: 10^3 plaquetas/ μ l. Figura 3B: Linfocitos (%). Figura 3C: Eosinófilos (%).Figura 3D: Monocitos (%). Las letras a o c indican una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo de control ($p < 0,05$).
- 20 La figura 4 muestra el número promedio de terminaciones sinápticas por $100 \mu\text{m}^2$ de la zona CA1 del hipocampo en grupos con tratamiento diferentes. El asterisco (*) denota significación estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$).
- La figura 5 muestra el área promedio (μm^2) de terminación sináptica en la zona CA1 del hipocampo en grupos con tratamiento diferentes.
- 25 La figura 6 muestra el número promedio de vesículas sinápticas por sinapsis (A) y por $100 \mu\text{m}^2$ de terminación sináptica (B) en la zona CA1 del hipocampo. El asterisco (*) denota significación estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$).
- La figura 7 muestra la distancia promedio (nm) desde las vesículas sinápticas a la zona activa de terminación presináptica. El asterisco (*) denota significación estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$).
- 30 La figura 8 muestra la distancia promedio (nm) desde una vesícula hasta la vesícula vecina más próxima de terminación presináptica. El asterisco (*) denota significación estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$).
- 35 La figura 9 muestra la proporción (%) de sinapsis perforadas y múltiples en la zona CA1 del hipocampo. El resto representa sinapsis simples. Las letras sobre las barras grises y negras describen diferencia estadística cuando $p < 0,05$. Las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí dese un punto de vista estadístico. La C denota control emparejado por edad (viejos).
- 40 La figura 10 ilustra rendimiento cognitivo mejorado por medio de la presente invención, detectado en el porcentaje de alteraciones espontáneas en una prueba de laberinto en T (véase el ejemplo 5). La prueba se realizó al inicio (0 meses), y se repitió a los 2 y 4 meses. Se muestra la fracción de intentos correctos, con un intervalo de confianza del 95% calculado mediante el método de Wald modificado. El tratamiento al inicio (0) y el tratamiento a los 4 meses son significativamente diferentes desde un punto de vista estadístico al menos con $p < 0,05$, ya que los intervalos de confianza del 95% no se solapan.
- 45 La figura 11 muestra la fracción de animales individuales del ejemplo 5 que muestran un rendimiento deteriorado o mejorado en la prueba de laberinto en T a los 2 y 4 meses (resultados combinados) en comparación con su rendimiento de referencia individual. La fracción de animales en el grupo con rendimiento mejorado se muestra mediante las columnas negras y la fracción de rendimiento deteriorado se muestra mediante las columnas grises. Grupo 1 = controles sin tratar emparejados por edad, Grupo 2 = tratamiento con AKG+enzimas. La diferencia es significativa con $p < 0,05$.

Sumario de la invención

55 La presente invención proporciona los siguientes puntos.

1. Una composición que comprende:
 - 60 a. ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AKG); y
 - b. una lipasa, una proteasa y una amilasa,
 - para su uso como medicamento.
- 65 2. La composición según el punto 1, para su uso según el punto 1, en la que:

la composición comprende 200-20000 unidades USP de lipasa por mmol de AKG;

la composición comprende 500-50000 unidades USP de proteasa por mmol de AKG; y/o

la composición comprende 200-20000 unidades USP de amilasa por mmol de AKG.

3. La composición según el punto 1, para su uso según el punto 1, que comprende 3000-300000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG como cristales de lipasa reticulados, 2000-200000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-30000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

4. La composición según el punto 1, para su uso según el punto 1, que comprende pancrelipasa en una cantidad correspondiente a 300-300000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG.

5. La composición según cualquiera de los puntos anteriores, para su uso según el punto 1, en el que la composición comprende alfa-cetoglutarato de sodio.

6. La composición según cualquiera de los puntos anteriores, para su uso según el punto 1, en el que la composición comprende alfa-cetoglutarato de calcio.

7. La composición según cualquiera de los puntos anteriores, para su uso según el punto 1, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neurológico seleccionado de trastornos neurológicos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria y trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria, depresión y síndrome de fatiga crónica.

8. La composición según cualquiera de los puntos anteriores, para su uso según el punto 1 ó 7, para su uso en un método que comprende administrar una cantidad de la composición que contiene 0,5-24 mmol de AKG a un paciente al día.

9. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o prevención de trastornos neurodegenerativos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria y trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, y trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria,

comprendiendo el método administrar a un sujeto:

a. ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

b. una lipasa, una proteasa y una amilasa.

10. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según el punto 9, en el que:

el método comprende administrar 200-20000 unidades USP de lipasa por mmol de AKG;

el método comprende administrar 500-5000 unidades USP de proteasa por mmol de AKG; y/o

el método comprende administrar 200-20000 unidades USP de amilasa por mmol de AKG.

11. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según el punto 9, en el que:

el método comprende administrar 3000-300000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG como cristales de lipasa reticulados, 2000-200000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-30000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

- 5 12. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según el punto 9, en el que el método comprende administrar pancrelipasa en una cantidad correspondiente a 300-300000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG.
- 10 13. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de los puntos 9-12, en el que el método comprende administrar alfa-cetoglutarato de sodio.
14. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de los puntos 9-13, en el que el método comprende administrar alfa-cetoglutarato de calcio.
- 15 15. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de los puntos 9-14, en el que el método comprende administrar 0,5-24 mmol de AKG al día al sujeto.

Descripción detallada

20 Los inventores han descubierto que AKG, así como una composición que comprende lipasa, proteasa y amilasa, ejercían efectos sobre la neurogénesis y cognición. Una combinación de AKG y dichas enzimas ejercía un efecto sinérgico sobre la neurogénesis y sobre la mejora de la cognición. La combinación también ejerce un efecto sinérgico sobre la morfología sináptica.

25 Composiciones sinérgicas

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer composiciones sinérgicas novedosas, para su uso como medicamento, que comprenden ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AKG), y una lipasa, una proteasa y una amilasa, estando los constituyentes presentes en cantidades relativas sinérgicamente eficaces.

30 Tales composiciones ejercen un efecto sinérgico al fomentar la neurogénesis, mejorar la morfología sináptica y reducir los números de eosinófilos, lo que permite el tratamiento de varias afecciones tal como se explica en más detalle a continuación.

35 En la técnica, se conocen lipasas, proteasas y amilasas (y combinaciones de las mismas) adecuadas para su uso en la composición de la invención, véanse, por ejemplo, los documentos US2006/012017, US2004/0057944, US2001/0046493 y US6 051 220.

40 La composición puede comprender además excipientes o aditivos farmacéutica o nutricionalmente aceptables. De manera opcional, la composición puede incluir principios activos adicionales. Preferiblemente, la composición no incluye principios activos adicionales.

45 La composición es preferiblemente para la administración oral. Puede formularse de cualquier forma que sea bien conocida en la técnica para la administración oral de las sustancias que comprende. Si la formulación comprende lipasa que no es estable en medio ácido, puede ser preferible encapsular al menos este componente en un recubrimiento entérico protector. Tales recubrimientos son bien conocidos en la técnica y se encuentran en productos que ya se comercializan.

50 La composición puede ser un suplemento alimenticio, un producto nutracéutico, una composición farmacéutica, un suplemento dietético o un aditivo alimentario.

Lipasa

55 La composición del primer aspecto comprende una lipasa. La lipasa puede seleccionarse de una lipasa de mamífero, una lipasa microbiana, una lipasa bacteriana, una lipasa de pancrelipasa (es decir, una lipasa incluida en la pancrelipasa), una lipasa de lipotamasa (es decir, una lipasa incluida en la lipotamasa), lipasa de *Pseudomonas*, lipasa estimulada por sales biliares (BSSL, por sus siglas en inglés) humana o de otro mamífero, o lipasa dependiente de sales biliares (BSDL, por sus siglas en inglés), lipasa de *Rhizopus oryzae*, lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Rhizopus delemar*, lipasa de *Burkholderia*, más preferiblemente lipasa de *Burkholderia cepacia*, de la forma más preferible lipasa de *Burkholderia cepacia* como cristales de lipasa reticulados.

60 La composición puede comprender 300-300000 unidades USP de lipasa por g de AKG, preferiblemente 3000-300000 unidades USP de lipasa por g de AKG, más preferiblemente 6000-150000 unidades USP de lipasa por g de AKG e incluso más preferiblemente 15000-60000 unidades USP de lipasa por g de AKG, y de la forma más preferible aproximadamente 30000 unidades USP de lipasa por g de AKG.

Proteasa

5 La composición del primer aspecto comprende una proteasa. La proteasa puede seleccionarse de una proteasa de mamífero, una proteasa microbiana, una proteasa fúngica, una proteasa de pancrelipasa (es decir, una proteasa incluida en la pancrelipasa), una proteasa de lipotamasa (es decir, una proteasa incluida en la pancrelipasa), una proteasa de *Aspergillus*, de la forma más preferible proteasa de *Aspergillus melleus*.

10 La composición puede comprender 200-2000000 unidades USP de proteasa por g de AKG, preferiblemente 2000-200000 unidades USP de proteasa por g de AKG, más preferiblemente 4000-100000 unidades USP de proteasa por g de AKG e incluso más preferiblemente 10000-40000 unidades USP de proteasa por g de AKG, y de la forma más preferible aproximadamente 20000 unidades USP de proteasa por g de AKG.

Amilasa

15 La composición del primer aspecto comprende una amilasa. La amilasa puede seleccionarse de una amilasa de mamífero, una amilasa microbiana, una amilasa fúngica, una amilasa de pancrelipasa (es decir, una amilasa incluida en la pancrelipasa), una amilasa de lipotamasa (es decir, una amilasa incluida en la lipotamasa), una amilasa de *Aspergillus*, de la forma más preferible amilasa de *Aspergillus oryzae*.

20 La composición puede comprender 30,0-3000000 unidades USP de amilasa por g de AKG, preferiblemente 300-300000 unidades USP de amilasa por g de AKG, más preferiblemente 300-30000 unidades USP de amilasa por g de AKG e incluso más preferiblemente 600-15000 unidades USP de amilasa por g de AKG, y de la forma más preferible aproximadamente 3000 unidades USP de amilasa por g de AKG.

Ciertas combinaciones y variantes preferidas

30 La composición del primer aspecto puede comprender 300-3000000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), 200-2000000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 30,0-3000000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

35 La composición del primer aspecto puede comprender 3000-300000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), 2000-200000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-300000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

40 La composición del primer aspecto puede comprender 6000-150000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), 4000-100000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-30000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

45 La composición del primer aspecto puede comprender 15000-60000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), 10000-40000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 600-15000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

50 La composición del primer aspecto puede comprender aproximadamente 30000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), aproximadamente 20000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y aproximadamente 3000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.

55 La composición del primer aspecto puede comprender lipotamasa. La cantidad de lipotamasa puede ser de 300-300000 unidades USP de lipasa de lipotamasa por g de AKG, preferiblemente 3000-150000 unidades USP de lipasa de lipotamasa por g de AKG, más preferiblemente 15000-60000 unidades USP de lipasa de lipotamasa por g de AKG y de la forma más preferible aproximadamente 30000 unidades USP de lipasa de lipotamasa por g de AKG. Una composición con AKG y lipotamasa puede comprender Na-AKG y Ca-AKG en cantidades iguales en cuanto al peso.

60 La composición del primer aspecto puede comprender pancrelipasa. La cantidad de pancrelipasa puede ser de 300-300000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG, preferiblemente 3000-150000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG, más preferiblemente 1500-60000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG y de la forma más preferible aproximadamente 30000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG. Una composición con AKG y pancrelipasa puede comprender Na-AKG y Ca-AKG en cantidades iguales en cuanto al peso.

La presente descripción también proporciona realizaciones adicionales de la composición del primer aspecto en la tabla X adjuntada después de la sección de los ejemplos. Solamente forman parte de la invención realizaciones que contienen las tres enzimas.

5 Los contenidos de la tabla X se han de leer como se indica a continuación.

10 Cada línea en la tabla X corresponde a una realización. Empezando por la izquierda, la primera columna denotada “#” muestra el número de identificación de la realización. La segunda columna de la izquierda denotada “A” muestra el intervalo de concentración de la lipasa para esa realización, haciendo referencia a las tablas Y y Z. La tercera columna de la izquierda denotada “B” muestra el intervalo de concentración de la proteasa para esa realización, haciendo referencia a las tablas Y y Z. La cuarta columna de la izquierda denotada “C” muestra el intervalo de concentración de amilasa para esa realización, haciendo referencia a las tablas Y y Z.

15 Tabla Y: Interpretación de las columnas A, B y C de la tabla X:

Valor de la columna A, B o C de la tabla X	Intervalo de cantidad correspondiente
1	del valor de referencia/250 al valor de referencia multiplicado por 250
2	del valor de referencia/100 al valor de referencia multiplicado por 100
3	del valor de referencia/25 al valor de referencia multiplicado por 25
4	del valor de referencia/10 al valor de referencia multiplicado por 10
5	del valor de referencia/5 al valor de referencia multiplicado 5
6	del valor de referencia al valor de referencia multiplicado por 5
7	del valor de referencia/5 al valor de referencia
8	del valor de referencia al valor de referencia multiplicado por 25
9	del valor de referencia/25 al valor de referencia
10	valor de referencia multiplicado por 0 (=no está presente)

20 También se contempla que cualquiera de los valores extremos de los intervalos de cualquier realización en la tabla X puede combinarse con cualquier otro valor extremo de un intervalo (en la misma columna) de otra realización de la tabla X.

25 Por ejemplo, dos realizaciones con valores 2 y 9, respectivamente, en la columna A pueden combinarse para dar una cualquiera de cuatro realizaciones adicionales, en las que el intervalo de cantidad es (1) del valor de referencia/100 al valor de referencia, (2) del valor de referencia al valor de referencia multiplicado por 100, (3) del valor de referencia/25 al valor de referencia multiplicado por 100 o (4) del valor de referencia/100 al valor de referencia/25.

30 También puede utilizarse cualquier valor extremo en una realización para constituir el valor extremo de un intervalo abierto de una realización adicional. Por ejemplo, el valor 2 en la columna A constituye la base para una realización en la que la cantidad de lipasa es de “al menos el valor de referencia/100”, y una realización en la que la cantidad de lipasa es de “al menos el valor de referencia multiplicado por 100” unidades USP/mmol de AKG. De forma similar, el valor 2 en la columna A constituye la base para una realización en la que la cantidad de lipasa es de “menos que el valor de referencia/100”, y una realización en la que la cantidad de lipasa es de “menos que el valor de referencia multiplicado por 100” unidades USP/mmol de AKG.

35 Tabla Z: Valores de referencia para la interpretación de las columnas A, B y C de la tabla X (haciendo referencia a la tabla Y)

Elemento	Valor de referencia (unidades USP/mmol de AKG)
Lipasa, columna A de la tabla X	2000
Proteasa, columna B de la tabla X	5000
Amilasa, columna C de la tabla X	2000

Para facilitar la comprensión de cómo se ha de leer la tabla X, se proporciona el siguiente ejemplo:

La realización 53 de la tabla X corresponde a los siguientes valores: columna A = 1, columna B = 6, columna C = 3.

A partir de la tabla Y puede deducirse, por tanto, que la realización 53 corresponde a una cantidad de lipasa del valor de referencia/250 al valor de referencia multiplicado por 250, una cantidad de proteasa del valor de referencia al valor de referencia multiplicado por 5, y una cantidad de amilasa del valor de referencia/25 al valor de referencia multiplicado por 25.

Los valores de referencia pueden encontrarse en la tabla z, mediante la cual la realización 53 corresponde a:

- cantidad de lipasa: de 2000/250 a 2000 veces 250 unidades USP/mmol de AKG = 8-500.000 unidades USP de lipasa/mmol de AKG
- cantidad de proteasa: de 5000 a 5000 veces 5 unidades USP/mmol de AKG = 5.000-25.000 unidades USP de proteasa/mmol de AKG
- cantidad de amilasa: de 2000/25 a 2000 veces 25 unidades USP/mmol de AKG = 8-50.000 unidades USP de amilasa/mmol de AKG

Preferiblemente, las realizaciones del primer aspecto de la invención que se dan a conocer en la tabla X, haciendo referencia a las tablas Z e Y, comprenden lipasa de *Burkholderia cepacia* como una lipasa (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), proteasa de *Aspergillus melleus* como una proteasa y amilasa de *Aspergillus oryzae* como una amilasa.

Más preferiblemente, las realizaciones del primer aspecto de la invención que se dan a conocer en la tabla X, haciendo referencia a las tablas Z e Y, comprenden lipasa de *Burkholderia cepacia* como la única lipasa (preferiblemente como cristales de lipasa reticulados), proteasa de *Aspergillus melleus* como la única proteasa y/o amilasa de *Aspergillus oryzae* como la única amilasa.

AKG

El componente AKG en la composición del primer aspecto tal como se ha dado a conocer anteriormente (incluyendo las realizaciones de la tabla X) puede consistir en o comprender alfa-cetoglutarato de sodio, alfa-cetoglutarato de calcio o una combinación de los mismos (preferiblemente en cantidades iguales). El componente AKG también puede comprender o consistir en otra sal inorgánica farmacéuticamente aceptable de AKG, que incluye alfa-cetoglutarato de magnesio o potasio, o una sal orgánica farmacéuticamente aceptable de AKG, tal como ornitina-AKG, arginina-AKG, quitosano-AKG, piridoxina-AKG, leucina-AKG, isoleucina-AKG o creatina-AKG, o una combinación de las mismas.

Métodos y usos para la composición del primer aspecto

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición según el primer aspecto, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neurológico seleccionado de trastornos neurodegenerativos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria, y trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición según el primer aspecto, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de: enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia medular, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, traumatismo de la médula espinal, lesión cerebral/medular relacionada con el cáncer, esquizofrenia y otras psicosis, síndrome de liencefalia, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, fobias, estrés y síndromes relacionados, trastornos de la función cognitiva, agresividad, toxicomanía y alcoholismo, síndromes de comportamiento obsesivo-compulsivo, trastorno del estado de ánimo estacional, trastorno límite de la personalidad, parálisis cerebral, adicción a medicamentos para mejorar la calidad de vida, demencia multiinfarto, demencia por cuerpos de Lewy, demencia geriátrica senil, epilepsia y lesión relacionada con la epilepsia, epilepsia del lóbulo temporal, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, neurocirugía, lesión cerebral/medular relacionada con un traumatismo, incluyendo la lesión cerebral relacionada con una conmoción, lesión cerebral debida a una conmoción repetida o traumatismo repetido en la cabeza, y lesión cerebral provocada por la onda expansiva de una explosión, lesión de tejido cerebral/medular relacionada con un tratamiento contra el cáncer, lesión cerebral/medular relacionada con una infección e inflamación, lesión cerebral/medular relacionada con una toxina ambiental, esclerosis múltiple, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, narcolepsia, trastornos del sueño y trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria.

En un cuarto aspecto, se proporciona una composición según el primer aspecto, para su uso en un método que comprende administrar una cantidad de la composición que contiene 0,03-100 g de AKG a un paciente al día, 0,1-30 g de AKG a un paciente al día, 1-10 g de AKG a un paciente al día o 2-6 g de AKG a un paciente al día.

5 El cuarto aspecto también proporciona una composición según el primer aspecto, para su uso en un método que comprende administrar a un paciente (preferiblemente humano) a diario una cantidad de la composición que contiene las siguientes cantidades de AKG en mmol: 0,5-240, 1-120, 3-60, 5-36, 9-24, 0,5-3, 0,5-5, 0,5-9, 0,5-12, 1-5, 3-9, 3-12, 3-24, 1-5, 3-5, 1-3, 9-36, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 9, aproximadamente 12, aproximadamente 24, aproximadamente 36, aproximadamente 60, aproximadamente 120 o aproximadamente 240. También se contempla cualquier intervalo formado por cualquier combinación de los valores extremos de los intervalos mencionados anteriormente.

10 Dicha administración puede ser oral. Dicho paciente puede ser, preferentemente, un ser humano, en particular un ser humano que necesita tal tratamiento.

15 También se da a conocer un uso de una composición según el primer aspecto en la fabricación de un suplemento alimenticio, un suplemento dietético, un producto nutracéutico o un aditivo alimentario. Adicionalmente, se da a conocer un uso de una composición según el primer aspecto como un suplemento dietético, un suplemento alimenticio, un producto nutracéutico o un aditivo alimentario.

20 AKG para su uso en un método de tratamiento o prevención

En un quinto aspecto, la presente invención también proporciona ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o prevención de trastornos neurodegenerativos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria, trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia medular, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, traumatismo de la médula espinal, lesión cerebral/medular relacionada con el cáncer, esquizofrenia y otras psicosis, síndrome de lisencefalia, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, fobias, estrés y síndromes relacionados, trastornos de la función cognitiva, agresividad, toxicomanía y alcoholismo, síndromes de comportamiento obsesivo-compulsivo, trastorno del estado de ánimo estacional, trastorno límite de la personalidad, parálisis cerebral, adicción a medicamentos para mejorar la calidad de vida, demencia multiinfarto, demencia por cuerpos de Lewy, demencia geriátrica senil, epilepsia y lesión relacionada con la epilepsia, epilepsia del lóbulo temporal, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, neurocirugía, lesión cerebral/medular relacionada con un traumatismo, incluyendo la lesión cerebral relacionada con una conmoción, lesión cerebral debida a una conmoción repetida o traumatismo repetido en la cabeza, y lesión cerebral provocada por la onda expansiva de una explosión, lesión de tejido cerebral/medular relacionada con un tratamiento contra el cáncer, lesión cerebral/medular relacionada con una infección e inflamación, lesión cerebral/medular relacionada con una toxina ambiental, esclerosis múltiple, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, narcolepsia, trastornos del sueño, trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria, un trastorno que cursa con eosinofilia, asma, dermatitis atópica, esofagitis eosinofílica y rinoconjuntivitis; enfermedades autoinmunitarias que incluyen la cirrosis biliar primaria, tiroiditis fibrosa invasiva de Riedel, dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren; eosinofilia inducida por infección parasitaria, incluyendo la eosinofilia inducida por una infección helmíntica; enfermedad injerto contra huésped; eosinofilia medicamentosa; eosinofilia primaria, eosinofilia inducida por una enfermedad neoplásica, incluyendo la eosinofilia asociada con el linfoma de linfocitos T cutáneo primario, síndrome de Sézary, enfermedad de Hodgkin, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de hígado y cáncer de vejiga, comprendiendo el método administrar ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una lipasa, una proteasa y una amilasa a un sujeto.

El AKG, la lipasa, la proteasa y la amilasa administrados en el método al que se hace referencia en el quinto aspecto pueden tener las mismas propiedades y características tal como se especifican para los compuestos de la composición del primer aspecto.

Las cantidades relativas y absolutas de AKG, la lipasa, la proteasa y la amilasa administrados en el método al que se hace referencia en el décimo aspecto pueden ser como las especificadas para la composición del primer aspecto y sus usos.

El método del quinto aspecto puede comprender administrar AKG al sujeto en una concentración de 0,03-100 g/día, 0,1-30 g al día, 1-10 g al día o 2-6 g al día.

En particular, el método del quinto aspecto puede comprender administrar a un paciente (preferiblemente humano) diariamente la siguiente cantidad de AKG en mmol: 0,5-240, 1-120, 3-60, 5-36, 9-24, 0,5-3, 0,5-5, 0,5-9, 0,5-12, 1-5, 3-9, 3-12, 3-24, 1-5, 3-5, 1-3, 9-36, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 3,

aproximadamente 5, aproximadamente 9, aproximadamente 12, aproximadamente 24, aproximadamente 36, aproximadamente 60, aproximadamente 120 o aproximadamente 240. También se contempla cualquier intervalo formado mediante la combinación de los valores extremos de los intervalos mencionados anteriormente.

5 El método al que se hace referencia en el quinto aspecto puede comprender administrar el AKG, la lipasa, la proteasa y/o la amilasa simultáneamente, por separado o consecutivamente. Dichos componentes se pueden administrar en formulaciones que comprenden cualquier combinación de las sustancias.

10 Preferiblemente, el método al que se hace referencia en el quinto aspecto comprende administrar AKG y lipotamasa simultáneamente, por separado o consecutivamente. También preferiblemente, el método al que se hace referencia en el quinto aspecto comprende administrar AKG y pancrelipasa simultáneamente, por separado o consecutivamente.

15 Los siguientes ejemplos no se deben interpretar como limitativos. El término "comprender" se utiliza con carácter inclusivo, es decir, en el sentido de "incluyendo, pero sin limitarse a".

Ejemplos

Ejemplo 1: introducción de neurogénesis en el hipocampo

20 Tras la tanda de tratamiento tal como se especifica en la sección de materiales y métodos, los animales se sacrificaron y sus cerebros se analizaron histológicamente para cuantificar la neurogénesis en el hipocampo.

25 La nestina es un marcador de neuronas inmaduras. Se hallaron células positivas para la nestina en la capa del hipocampo de las neuronas piramidales. Los somas de células del hipocampo presentaron una fuerte tinción con nestina. En algunas células, se extienden prolongaciones largas, que parecen ser dendritas, en el interior de capas más profundas del hipocampo, y estas prolongaciones también fueron positivas para la nestina. Estas células fueron estructuralmente similares a células piramidales en todos los campos CA del hipocampo (CA1-CA3). Las similitudes estructurales entre las células positivas para la nestina y las neuronas permiten considerar este tipo de células como neuronas neogeneradas.

30 Los resultados indicaron que tanto KG como ENZ incrementaron la neurogénesis en el hipocampo en comparación con controles emparejados por edad (=“viejos”) (véase la figura 1). Obsérvese, en particular, que la combinación de AKG+ENZ fue incluso más eficaz y dio como resultado un incremento sinérgico en la neurogénesis (el grupo tratado con AKG+ENZ fue significativamente diferente, desde un punto de vista estadístico, a ambos grupos tratados con AKG y con ENZ). El nivel de neurogénesis obtenido mediante la terapia combinada equiparó el nivel de neurogénesis en los animales viejos al nivel de los animales jóvenes.

35 Conclusión: el tratamiento con AKG, ENZ o AKG+ENZ incrementa la neurogénesis. La combinación de AKG+ENZ ejerce un efecto sinérgico.

Ejemplo 2: Mejora de la función cognitiva/memoria

45 Durante la tanda de tratamiento, los animales se sometieron a una prueba de laberinto en T en la que se midió la función cognitiva y/o memoria tal como se especifica en la sección de materiales y métodos.

50 Asombrosamente, los resultados se correlacionan perfectamente con el incremento en neurogénesis observado en el ejemplo 1 (véase la figura 2). Esto sugiere que la neurogénesis dio como resultado una función cognitiva mejorada. Independientemente del mecanismo, los experimentos muestran que todos de AKG, ENZ y AKG+ENZ mejoraron la cognición en animales viejos, con un efecto superior para la combinación de AKG+ENZ.

Ejemplo 3: Reducción de los eosinófilos en sangre

55 Se analizaron muestras de sangre para determinar los efectos en parámetros sanguíneos tal como se detalla en la sección de métodos y materiales.

60 Los resultados (figura 3) mostraron que mientras que los recuentos de plaquetas, linfocitos y monocitos no se vieron afectados por los tratamientos, el recuento de eosinófilos fue reducido notoriamente por la combinación de AKG+ENZ, pero no por AKG por sí solo o ENZ por sí solas. Nuevamente, la combinación de AKG+ ENZ presentó un efecto sinérgico.

Ejemplo 4: Alteraciones de la morfología sináptica

Introducción

65

Se eligió el hipocampo como objeto de investigación ya que es uno de los componentes principales del cerebro de los seres humanos y otros vertebrados. Pertenece al sistema límbico y desempeña papeles importantes en la consolidación de información de la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo, y la memoria y navegación espaciales, y la formación de emociones y el comportamiento, la función cognitiva. El hipocampo es muy vulnerable a diferentes estímulos nocivos. El daño en el hipocampo puede ser el resultado de la privación de oxígeno (hipoxia), encefalitis, epilepsia del lóbulo temporal medial, trastornos seniles (enfermedad de Alzheimer) y otros. El hipocampo es una de las primeras regiones del cerebro afectadas; la pérdida de memoria y la desorientación se incluyen entre los primeros síntomas.

También cabe destacar que las neuronas del hipocampo están dispuestas de una forma espacial específica, que permite la estimación precisa de su cantidad y calidad.

En conjunto, todas estas características (papel funcional, alta vulnerabilidad, disposición de las neuronas) hacen que el hipocampo sea uno de los sistemas más adecuados para la investigación neurológica.

Hay numerosas enfermedades que cursan con la pérdida de sinapsis. Cabe destacar que tanto la cantidad como la estructura de las sinapsis se ven afectadas en enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, síndrome de Down, esquizofrenia y traumatismo craneoencefálico, y estrés. Algunos autores han observado pérdida sináptica durante el proceso normal de envejecimiento.

Los estudios anatómicos y funcionales indican que existe una disminución en el volumen y peso del cerebro humano en individuos ≥ 60 años. El que la pérdida de volumen del cerebro represente una pérdida de neuronas, encogimiento de las mismas o ambos sigue creando controversia. La pérdida de neuronas parece tener lugar en regiones específicas del cerebro que incluyen el hipocampo, la corteza cerebral y el complejo amigdalino.

El hipocampo es una de las regiones del cerebro que se ven notoriamente afectadas por la neurodegeneración y el deterioro funcional incluso en lo que se sigue considerando como "proceso normal de envejecimiento". Una cantidad neuronal disminuida, una disminución del número de conexiones sinápticas, patología intracelular, todos estos hechos sugieren que la formación del hipocampo puede ser especialmente vulnerable a los efectos del proceso de envejecimiento. Los estudios morfológicos del hipocampo en ratas jóvenes y viejas han revelado que las neuronas piramidales en las ratas viejas son más pequeñas y contienen menos ramificaciones y espinas dendríticas. La densidad de las terminaciones presinápticas por unidad de longitud de la membrana postsináptica también es más baja.

Cada terminación presináptica contiene cientos de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores. Las vesículas sinápticas son orgánulos de 40 nm de diámetro que constituyen el orgánulo central para la liberación y el almacenamiento de un neurotransmisor que experimenta continuamente un ciclo exo-endocitótico. Durante este ciclo, las vesículas cambian sus posiciones dentro de una terminación presináptica y su número, así como su disposición espacial, pueden facilitar la compresión de un recambio de neurotransmisores.

Cuando un potencial de acción despolariza la membrana plasmática presináptica, se abren los canales de Ca^{2+} y el Ca^{2+} fluye al interior de la terminación para desencadenar la exocitosis de vesículas sinápticas, liberando de este modo sus neurotransmisores en la hendidura sináptica.

El ciclo de exocitosis de vesículas sinápticas consiste en la exocitosis seguida por endocitosis y reciclaje. Las vesículas sinápticas se llenan de neurotransmisores (NT) mediante el transporte activo (captación de neurotransmisores) estimulado por un gradiente electroquímico establecido por una bomba de protones que acidifica el interior de las vesículas (acidificación de las vesículas).

De cara a la exocitosis sináptica, las vesículas sinápticas son acopladas a la zona activa y preparadas por un proceso dependiente de ATP que capacita a las vesículas para responder a una señal de Ca^{2+} . Cuando un potencial de acción despolariza la membrana presináptica, se abren los canales de Ca^{2+} , provocando un incremento local del Ca^{2+} intracelular en la zona activa que desencadena la finalización de la reacción de fusión. Entonces, los neurotransmisores liberados se unen a receptores asociados con la densidad postsináptica (DPS).

Resultados

En la parte central del *stratum radiatum* de CA1 analizada en el estudio, la gran mayoría de los estímulos sinápticos son excitadores y finalizan preferentemente en el eje dendrítico. Teniendo en cuenta estos aspectos, se podrían centrar los análisis en el conjunto de sinapsis de las espinas de CA1.

El número de terminaciones sinápticas por unidad de área ($100 \mu m^2$) en los animales de control viejos es tres veces inferior en comparación con los animales jóvenes, pero después del tratamiento a largo plazo con AKG y/o lipasa+proteasa+amilasa el número de contactos sinápticos se incrementó hasta el 55% (AKG y ENZ) y hasta el 47% (AKG+ENZ) (figura 4). El área de terminaciones sinápticas en los animales viejos de todos los grupos fue tres veces mayor que en los animales jóvenes y fue prácticamente idéntica (figura 6).

Una disminución del número de SV por terminación en los animales viejos en comparación con los animales más jóvenes también podría apuntar a un deterioro del proceso de reciclaje de SV. Se ha demostrado en muchos estudios que las proteínas de las vesículas sinápticas cambian su nivel de fosforilación en estados fisiológicos y patológicos.

El número de SV por terminación presináptica se incrementó en los grupos tratados con AKG, ENZ y AKG+ENZ de jerbos en comparación con animales de control viejos (figura 6A), mientras que el número de SV por unidades al cuadrado ($100 \mu\text{m}^2$) de terminación no difirió de los controles, a excepción del grupo 1 (figuras 6B). Esta diferencia se debe al hecho de que el área de terminaciones sinápticas en los animales viejos de todos los grupos fue significativamente mayor que en los animales jóvenes.

Cabe destacar que el grupo de controles jóvenes representa el estado fisiológico del hipocampo, en el que la sinaptogénesis y síntesis de neurotransmisores no están afectadas por el proceso de envejecimiento o alguna patología, ni estimuladas por ningún factor externo. El número de vesículas en sinapsis está estrechamente correlacionado con la cantidad de neurotransmisores, y este fenómeno de acumulación observado puede explicarse debido a la estimulación por síntesis de neurotransmisores inducida por el tratamiento.

En las sinapsis del hipocampo de los jerbos de control viejos y de los jerbos de los grupos 1 (AKG) y 2 (enzimas), se manifestaron cambios en la distribución espacial de vesículas sinápticas que incluyen el incremento de una distancia de una vesícula a la zona activa (figura 7). Estos parámetros son significativamente inferiores en los jerbos del grupo 3 (AKG+enzimas) y son sólo ligeramente mayores en comparación con los de los animales jóvenes. Existe diferenciación de los grupos de vesículas sinápticas dependiendo de su distancia a la zona activa. El grupo de vesículas más próximo está diseñado para la liberación inmediata de la terminación presináptica y la neurotransmisión más rápida. Por tanto, la reducción de la distancia promedio de una vesícula sináptica a la zona activa es indicativa de una mejora de la transmisión sináptica.

El análisis de la formación de agrupaciones de vesículas mostró que también se separaron SV una distancia mayor: el valor de NND promedio estimado para los animales de control viejos fue aproximadamente el 30% más alto que para los jóvenes (figura 8). Únicamente se manifestó una disminución significativa de NND en comparación con los animales de control viejos (grupo 4) en el grupo 3. Se utilizó la distancia a la primera vecina más próxima de cada vesícula para medir la tendencia de las vesículas sinápticas a formar agrupaciones espaciales. Obsérvese que la densidad de vesículas es el número de vesículas por 1 unidad de área, y el parámetro NND no es la distancia promedio de vesícula a vesícula, sino la distancia promedio a la vesícula vecina más próxima, la comparación de estos parámetros describe la diferencia de distribución espacial de vesículas en sinapsis.

Los tratamientos a largo plazo provocaron modificaciones estructuralmente marcadas de los tipos de terminaciones sinápticas. Se observó un incremento importante en la cantidad de sinapsis perforadas en los grupos 3 y 2, y en menor medida, múltiples botones de espinas (figura 9).

Se cree que el incremento en la proporción de sinapsis perforadas es más eficaz en la transmisión sináptica y puede considerarse como un mecanismo compensatorio en el caso de la pérdida sináptica. Las perforaciones también se han correlacionado con la sinaptogénesis reactiva. La densidad de sinapsis perforadas acompaña a la exactitud de reconocimiento de la memoria. La remodelación de las sinapsis se reconoce como una señal de mejora neurológica, conforme a lo cual el resultado es alentador para el tratamiento y la profilaxis de trastornos neurológicos en general y, la enfermedad de Alzheimer en particular, con los tratamientos eficaces.

El presente estudio indica que la alteración morfológica de sinapsis asociada con la plasticidad sináptica puede, de hecho, estar relacionada con mecanismos de activación en estados patológicos y fisiológicos alterados. Los parámetros de los contactos sinápticos, tales como sus dimensiones, forma, tamaño de terminación presináptica, densidad y distribución de SV, están todos relacionados con la eficacia de la transmisión sináptica.

Resumiendo, en el presente documento se describe varias alteraciones morfológicas dentro de las redes sinápticas que son consecuencias del proceso de envejecimiento. Se descubrió que los contactos sinápticos son capaces de manifestar modificaciones en condiciones de tratamiento de la invención en animales. La densidad disminuida de sinapsis excitadoras en el *stratum radiatum* de CA1 de animales viejos comparada con animales jóvenes es indicativa de recuperación después del tratamiento a largo plazo. Cambios morfológicos potencialmente perjudiciales en las sinapsis, tales como la inflamación de elementos sinápticos, la disminución y redistribución de grupos de SV, van acompañados por algunas modificaciones adaptativas aparentemente compensatorias: un incremento de las perforaciones, lo cual supuestamente podría ser reflejo del fortalecimiento de los contactos sinápticos, así como un incremento relativo en múltiples botones de espinas, lo cual sugiere sinaptogénesis reactiva.

Conclusiones

En las sinapsis del hipocampo de los jerbos viejos hay cambios en la distribución espacial de vesículas sinápticas que incluyen el incremento de una distancia de una vesícula a la zona activa y a la vesícula vecina más próxima.

La redistribución de diferentes tipos de terminaciones sinápticas tiene lugar con el incremento en los números de sinapsis perforadas y múltiples.

- 5 Es posible que estos cambios plásticos inducidos por el tratamiento desempeñen un papel en el mecanismo de mejora de la función neuronal del hipocampo manifestada en el laberinto en T.

Ejemplo 5: Función cognitiva mejorada

- 10 Se realizó un estudio repetido utilizando jerbos de Mongolia de edad avanzada de acuerdo con el ejemplo 1, con modificación de los componentes enzimáticos tal como se especifica en la sección de materiales y métodos.

En este experimento, había dos grupos, control y tratamiento con AKG+enzimas. Se realizó un análisis de comportamiento con el laberinto en T a los 0, 2 y 4 meses. Tal como se muestra en la figura 10, el grupo con tratamiento ya mejoró su rendimiento a los 2 meses, con una mejora significativa adicional a los 4 meses, mientras que el grupo de control no manifestó ninguna tendencia clara.

Los resultados demuestran que los resultados del ejemplo 1 fueron reproducibles con preparados enzimáticos y concentraciones diferentes, que se comenzó a manifestar un efecto perceptible a los 2 meses de tratamiento y la mejora continuó adicionalmente durante 4 meses de tratamiento.

Se calcularon los datos estadísticos para cada animal, tanto en los grupos de control como experimental. Se comparó la diferencia entre el porcentaje de tareas resueltas en el primer intento y la media de los porcentajes de tareas resueltas en dos intentos consecutivos (figura 11). Los animales individuales del grupo experimental (grupo 1) tienden a manifestar un incremento del número de tareas resueltas por prueba con mayor frecuencia y, en casos en los que se observa incremento, a presentar unos incrementos mayores que los animales del grupo de control. Los jerbos del primer grupo en el 67,7% de los casos manifestaron un rendimiento mejorado a los 2 y 4 meses (resultados combinados) en comparación con el rendimiento de referencia. En cambio, en el grupo de control (grupo 2) únicamente el 29% mostró un rendimiento mejorado (figura 11).

En conclusión, los animales sin ningún tratamiento tienden a mostrar resultados peores con el transcurso del tiempo (posiblemente debido al proceso de envejecimiento) pero los animales con tratamiento tienden a mostrar un rendimiento mejorado con el transcurso del tiempo, manifestando un efecto potenciador del rendimiento cognitivo por parte del tratamiento.

La medida permite distinguir si hay desviaciones individuales en la capacidad para superar la prueba durante la tanda de tratamiento. Debido a que el número de animales es suficientemente grande, el dato estadístico U, dato estadístico decisivo de la prueba de Mann-Whitney, es aproximadamente gaussiano con parámetros conocidos, y la probabilidad de que ambos grupos se describan con la misma ley estadística es de menos de 0,05, lo cual demuestra que con el nivel de confianza del 0,05 hay diferencias cualitativas entre dos grupos.

Materiales y métodos

45 En el ejemplo 1, los animales se alimentaron con la dieta estándar B de Labofeed (de la empresa Labofeed; planta de producción de pienso Andrzej Morawski, Kcynia cerca de Bydgoszcz, Polonia) suplementada con los compuestos objeto de prueba tal como se especifica en la tabla 1.

Tabla 1: Grupos con tratamiento, ejemplo 1

Grupo	Aditivo
Controles emparejados por edad (denominados también C, Contr (viejos), control de viejos o C(L))	Ninguno
AKG (denominado también A o AKG de viejos)	1% de AKG de calcio en peso 1% de AKG de sodio en peso AKG total: aprox. 114 mmol/kg
ENZ (denominado también E, Enz o Enz de viejos)	600000 unidades USP de lipasa/kg 400000 unidades USP de proteasa/kg 60000 unidades USP de amilasa/kg
AKG+ENZ (denominado también A+E, AKG-Enz, AKG+Enz de viejos)	1% de AKG de calcio en peso 1% de AKG de sodio en peso 600000 unidades USP de lipasa/kg 400000 unidades USP de proteasa/kg 60000 unidades USP de amilasa/kg
Controles de jóvenes (denominados también J, Contr (jóvenes), Jóvenes)	Ninguno

La lipasa, proteasa y amilasa se obtuvieron como cápsulas que contenían 30000 unidades USP/cápsula de lipasa, 20000 unidades USP/cápsula de proteasa y 3000 unidades USP/cápsula de amilasa, preparadas como se muestra en la tabla 2. Se mezclaron los contenidos de 20 cápsulas por cada kg de pienso para los grupos tratados con ENZ y con AKG+ENZ.

Tabla 2. Cápsulas con lipasa, proteasa y amilasa

Componente	Cantidad (unidades USP/cápsula)	Cantidad (mg/cápsula)	Proveedor	N.º de cat.
lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>	30000	13,1	Sigma Aldrich	534641
proteínasa de <i>Aspergillus melleus</i>	20000	14,3	Sigma Aldrich	P4032
α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	3000	30,0	Sigma Aldrich	10065

Las cápsulas también contenían relleno hasta un peso de 200 mg.

En el ejemplo 5, los animales se alimentaron con dieta estándar B de Labofeed (de la empresa Labofeed; Planta de producción de pienso Andrzej Morawski, Kcynia cerca de Bydgoszcz, Polonia) suplementada con los compuestos objeto de prueba tal como se especifica en la tabla 3.

Tabla 3: Grupos con tratamiento, ejemplo 5

Grupo	Aditivo
Controles emparejados por edad	Ninguno
AKG+ENZ (denominado también A+E)	1% de AKG de calcio en peso 1% de AKG de sodio en peso AKG total: aprox. 114 mmol/kg 200000 unidades USP de lipasa/kg 750000 unidades USP de proteasa/kg 664000 unidades USP de amilasa/kg

Las enzimas de la tabla 3 se especifican adicionalmente en la tabla 4.

Tabla 4. Especificación de la lipasa, proteasa y amilasa del ejemplo 5

Componente	Actividad determinada USP/mg	Cantidad (mg/kg de pienso)	Proveedor	Denominación del fabricante
lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>	400	500	Amano	Lipase PS
proteínasa de <i>Aspergillus melleus</i>	1500	500	Amano	Protease DS-K
α -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	3370	16850	Amano	Amylase DS

Resumen del estudio

Animales y cuidados de los animales (ejemplos 1-4)

Para una alimentación a largo plazo (durante 6 meses), se utilizaron 75 jerbos de Mongolia machos viejos, seleccionados aleatoriamente. Los jerbos seleccionados tenían una edad de aproximadamente 1,5 años al inicio del experimento con un peso corporal medio de $88,0 \pm 6$ g y una edad de 2 años al final del experimento. Adicionalmente, se utilizaron 6 jerbos machos con una edad intermedia entre "joven" y adulto (6 meses) para un "control de edad" adicional (denominado "Control (jóvenes)", o "Jóvenes" o "J" en los gráficos).

Los jerbos se alojaron en jaulas individuales y se dividieron en grupos que recibieron tratamientos diferentes (tabla 1). Cada jaula disponía de una botella para beber.

Los jerbos (4-8 por jaula) se alojaron en jaulas de policarbonato transparentes (48x27x20 cm) que contenían un lecho de mazorca de maíz, papel adsorbente como material de nidificación y una lata (13 cm de largo x 10 cm de diámetro) para el enriquecimiento.

Tenían acceso libre a comida (individual para cada grupo, tablas 1-2) y agua, y se proporcionaban una vez al día.

Las luces estaban encendidas de 07:00 a 19:00 h, y la temperatura ambiente y la humedad se mantuvieron a aproximadamente 23 °C y el 30-70%, respectivamente.

5

Todos los jerbos se aclimataron a las jaulas durante una semana antes de iniciar el experimento.

Animales y cuidados de los animales (ejemplo 5)

10 Los cuidados de los animales fueron similares a los de los ejemplos 1-4 anteriores con la excepción de que únicamente se incluyeron y trataron dos grupos conforme con la tablas 3-4.

Los grupos de control comprendían 15 animales mientras que el grupo con tratamiento emparejado por edad comprendía 16 animales.

15

Evaluación de la neurogénesis en el hipocampo

Preparación de muestras morfológicas

20 Al final del experimento, se anestesiaron jerbos con ketamina (100 mg/kg de peso corporal, por vía intramuscular) y se fijaron mediante perfusión transcardíaca con formaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,25% en tampón de fosfato 0,1 M. Después de la perfusión, se aislaron los cerebros y se separaron en dos hemisferios.

Ensayo inmunocitoquímico

25

Las muestras para el ensayo inmunohistoquímico (un hemisferio de cada animal) se fijaron posteriormente durante la noche en el mismo fijador a +4 °C. Al día siguiente, se cortaron en forma de cortes frontales con un grosor de 50 µm mediante un vibratomo Vibroslice 752M (Campden Instruments Ltd, Gran Bretaña). Los cortes cerebrales se lavaron con tampón de fosfato 0,1 M de pH 7,4 y se trataron en una disolución de bloqueo que contenía suero de cabra normal al 1% y Triton X-100 al 0,3%. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-nestina de cabra (1:500) (Santa Cruz biotechnology, Inc, EE. UU.) para detectar células neuronales inmaduras proliferantes, que expresan la nestina de los filamentos intermedios específicos de las neuronas. Los cortes se incubaron con anticuerpos primarios durante 16 horas a +4 °C. Después de lavar, los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios contra los anticuerpos de cabra conjugados con Alexa Fluor 647 (1:1000) (Molecular probes, EE. UU.) durante 1,5 h a temperatura ambiente. Entonces, los cortes se lavaron, se colocaron sobre portaobjetos histológicos y se montaron en un medio de montaje fluorescente (Dako, Dinamarca). Se tomaron imágenes del tejido del hipocampo con un microscopio confocal FV1000-BX61WI (Olympus, Japón). Se realizó un análisis cualitativo de la distribución de células positivas para la nestina en el área CA1 del hipocampo para cada grupo experimental.

30

35

Análisis estadístico

Todos los datos estadísticos se estimaron con STATISTICA ver.7.0 (StatSoft, EE. UU.). Se utilizó la prueba bilateral de Kolmogorov-Smirnov para evaluar las diferencias entre las muestras (se consideró que $p < 0,05$ indicaba la significancia estadística). Se utilizó el EE (error estándar) como barras de error.

45

Alteraciones sinápticas

Microscopía electrónica

50 Se anestesiaron los jerbos con una dosis subletal de ketamina (100 mg/kg de peso corporal, por vía intramuscular) y se fijaron mediante perfusión transcardíaca con formaldehído al 4% y glutaraldehído 0,25% en tampón de fosfato 0,1 M. Después de la perfusión, se aislaron los cerebros y se separaron en dos hemisferios.

Se utilizó un hemisferio de cada animal para el ensayo inmunohistoquímico.

55

Se aisló el hipocampo de otro hemisferio de cada animal y se cortó en forma de cortes transversales con un grosor de 400 µm mediante un cortador (cortador de tejidos McIlwain, Gran Bretaña). Los cortes se fijaron posteriormente en disolución de fijación con glutaraldehído al 2,5% durante 1,5 h y a continuación en OsO₄ al 1% durante 1 h. Entonces, los cortes tisulares se deshidrataron en una serie ascendente de etanol seguido de acetona seca y se embebieron en resina EPON según el protocolo oficial. Las secciones se produjeron mediante un ultramicrotomo LKB-8800. Se utilizaron secciones semidelgadas (1 µm) de hipocampo teñidas con azul de toluidina para localizar el área CA1 del hipocampo. Para la microscopía electrónica, se tiñeron secciones untradelgadas (70 nm) de la parte central del *stratum pyramidale* y *stratum radiatum* de CA1 con acetato de uranilo y citrato de plomo.

60

65 Las imágenes se tomaron usando el microscopio electrónico de transmisión JEM-100CX (Jeol, Japón) con un aumento de x 10000. Se proporcionaron los cálculos para tres animales de cada grupo:

Grupo 1 (AKG)

Grupo 2 (Lipasa+proteasa+amilasa)

5

Grupo 3 (AKG+ lipasa+proteasa+amilasa)

Grupo 4 (Control de viejos)

10

Grupo (Jóvenes)

Las terminaciones sinápticas del área investigada revelaron un alto grado de plasticidad estructural que incluía modificaciones en la razón de diferentes formas de terminaciones sinápticas (simple, perforada, múltiples botones). La sinapsis perforada se definió como una sinapsis con DPS discontinua. Las sinapsis con más de una espina en contacto con la misma terminación presináptica se clasificaron como múltiples botones de espinas (MSB).

15

Para el análisis de la distribución de SV, las coordenadas x e y de centros del perfil de SV y puntos que localizan la zona activa de una sinapsis se marcaron con el software ImageTool de UTHSCSA (versión 3, Universidad de Texas, San Antonio, TX; ftp://maxrad6.uthscsa.edu) en micrografías digitales, utilizando el puntero. La distancia más corta de una SV al perfil de la zona activa (denominada en lo sucesivo distancia a la zona activa (AZD)), así como la proximidad espacial de perfiles de SV entre sí (denominada la distancia a la vecina más próxima (NND)) se cuantificaron utilizando el formalismo de la vecina más próxima con el software LoClust tal como se describe (Nikonenko y Skibo, 2004).

20

Las cantidades de AZD y NND se combinaron por grupo. Para cada estado experimental y de control, se han analizado 100 sinapsis que contenían SV. Se realizó un análisis estadístico utilizando el software Statistica (versión 5, StatSoft, EE. UU.). Los valores se muestran como la media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizó la prueba bilateral de Kolmogorov-Smirnov para evaluar las diferencias entre las muestras (se consideró que $P < 0,05$ indicada la significancia estadística).

25

30

Morfometría sináptica y cuantificación de la distribución de las vesículas sinápticas

Se llevaron a cabo estimaciones de la densidad sináptica en fotografías individuales contando todas las sinapsis de espinas asimétricas (determinadas por la presencia de una cabeza de espina con DPS prominente y vesículas sinápticas (SV) acopladas a la zona activa de una terminación presináptica) sobre la superficie de la microfotografía limitada por el marco de recuento (área de estudio de 36 mkm^2) seguida del cálculo del número de sinapsis por unidad de área de la superficie.

35

Pruebas de comportamiento

40

Alternancia espontánea en el laberinto en T

La alternancia espontánea en el laberinto en T es una prueba de comportamiento para medir la conducta exploradora en animales, especialmente modelos de roedores para trastornos del SNC. Esta prueba se basa en la disposición de los roedores a explorar un entorno nuevo, es decir, prefieren visitar un brazo nuevo del laberinto en vez de un brazo conocido. Muchas partes del cerebro— que incluyen el hipocampo, septo, prosencéfalo basal y corteza prefrontal— intervienen en esta tarea.

45

Este protocolo detalla un método para utilizar un laberinto en T con el fin de evaluar la capacidad cognitiva de roedores. El laberinto en T es un aparato elevado o cerrado con forma de T colocada en horizontal. Los animales parten de la base de la T y se les permite elegir uno de los brazos de meta adosados al otro extremo de la parte troncal. Si se les permiten dos intentos en sucesión rápida, en el segundo intento el roedor tiende a elegir el brazo que no ha visitado antes, lo cual indica que recuerda la primera elección. Esto se denomina “alternancia espontánea”. Tanto la alternancia espontánea como la premiada son muy sensibles a la disfunción del hipocampo, pero también intervienen otras estructuras cerebrales. Cada intento se debe completar en menos de 2 minutos, pero el número total de intentos requeridos variará según requisitos estadísticos y científicos. La alternancia indica la motivación del animal a explorar su entorno y localizar la presencia de recursos tales como comida, agua, compañeros o refugio. Los animales no necesitan ser privados de tales recursos para mostrar una conducta de alternancia; en este caso, esto se denomina “alternancia espontánea”.

50

55

60

Los sujetos se colocaron primero en el brazo de salida del laberinto en T. Al abandonar el brazo de salida, los sujetos eligen entre entrar bien en el brazo de meta izquierda o el derecho. En intentos repetidos, los animales mostraron menos tendencia a entrar en un brazo visitado previamente. Se registraron el porcentaje de alternancia (número de giros en cada brazo de meta) y la duración total de los intentos.

65

En el ejemplo 2, los animales se sometieron a la prueba una vez.

En el ejemplo 5, los animales se sometieron a la prueba 4 días consecutivos al inicio del experimento, y se sometieron subsiguientemente a la prueba 3 días consecutivos después de 2 meses y 4 meses de tratamiento.

5 Análisis bioquímico de sangre

Al final del estudio, se estudiaron parámetros hematológicos utilizando el hemolizador ABX Micros 60 OT (Francia) según los métodos estándar.

10

TABLA X

#	A	B	C
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	1	4
5	1	1	5
6	1	1	6
7	1	1	7
8	1	1	8
9	1	1	9
10	1	1	10
11	1	2	1
12	1	2	2
13	1	2	3
14	1	2	4
15	1	2	5
16	1	2	6
17	1	2	7
18	1	2	8
19	1	2	9
20	1	2	10
21	1	3	1
22	1	3	2

23	1	3	3
24	1	3	4
25	1	3	5
26	1	3	6
27	1	3	7
28	1	3	8
29	1	3	9
30	1	3	10
31	1	4	1
32	1	4	2
33	1	4	3
34	1	4	4
35	1	4	5
36	1	4	6
37	1	4	7
38	1	4	8
39	1	4	9
40	1	4	10
41	1	5	1
42	1	5	2
43	1	5	3
44	1	5	4
45	1	5	5
46	1	5	6

47	1	5	7
48	1	5	8
49	1	5	9
50	1	5	10
51	1	6	1
52	1	6	2
53	1	6	3
54	1	6	4
55	1	6	5
56	1	6	6
57	1	6	7
58	1	6	8
59	1	6	9
60	1	6	10
61	1	7	1
62	1	7	2
63	1	7	3
64	1	7	4
65	1	7	5
66	1	7	6
67	1	7	7
68	1	7	8
69	1	7	9
70	1	7	10

ES 2 681 343 T3

71	1	8	1
72	1	8	2
73	1	8	3
74	1	8	4
75	1	8	5
76	1	8	6
77	1	8	7
78	1	8	8
79	1	8	9
80	1	8	10
81	1	9	1
82	1	9	2
83	1	9	3
84	1	9	4
85	1	9	5
86	1	9	6
87	1	9	7
88	1	9	8
89	1	9	9
90	1	9	10
91	1	10	1
92	1	10	2
93	1	10	3
94	1	10	4

95	1	10	5
96	1	10	6
97	1	10	7
98	1	10	8
99	1	10	9
100	1	10	10
101	2	1	1
102	2	1	2
103	2	1	3
104	2	1	4
105	2	1	5
106	2	1	6
107	2	1	7
108	2	1	8
109	2	1	9
110	2	1	10
111	2	2	1
112	2	2	2
113	2	2	3
114	2	2	4
115	2	2	5
116	2	2	6
117	2	2	7
118	2	2	8

119	2	2	9
120	2	2	10
121	2	3	1
122	2	3	2
123	2	3	3
124	2	3	4
125	2	3	5
126	2	3	6
127	2	3	7
128	2	3	8
129	2	3	9
130	2	3	10
131	2	4	1
132	2	4	2
133	2	4	3
134	2	4	4
135	2	4	5
136	2	4	6
137	2	4	7
138	2	4	8
139	2	4	9
140	2	4	10
141	2	5	1
142	2	5	2

--

143	2	5	3
144	2	5	4
145	2	5	5
146	2	5	6
147	2	5	7
148	2	5	8
149	2	5	9
150	2	5	10
151	2	6	1
152	2	6	2
153	2	6	3
154	2	6	4
155	2	6	5
156	2	6	6
157	2	6	7
158	2	6	8
159	2	6	9
160	2	6	10
161	2	7	1
162	2	7	2
163	2	7	3
164	2	7	4
165	2	7	5
166	2	7	6

167	2	7	7
168	2	7	8
169	2	7	9
170	2	7	10
171	2	8	1
172	2	8	2
173	2	8	3
174	2	8	4
175	2	8	5
176	2	8	6
177	2	8	7
178	2	8	8
179	2	8	9
180	2	8	10
181	2	9	1
182	2	9	2
183	2	9	3
184	2	9	4
185	2	9	5
186	2	9	6
187	2	9	7
188	2	9	8
189	2	9	9
190	2	9	10

191	2	10	1
192	2	10	2
193	2	10	3
194	2	10	4
195	2	10	5
196	2	10	6
197	2	10	7
198	2	10	8
199	2	10	9
200	2	10	10
201	3	1	1
202	3	1	2
203	3	1	3
204	3	1	4
205	3	1	5
206	3	1	6
207	3	1	7
208	3	1	8
209	3	1	9
210	3	1	10
211	3	2	1
212	3	2	2
213	3	2	3
214	3	2	4

ES 2 681 343 T3

215	3	2	5
216	3	2	6
217	3	2	7
218	3	2	8
219	3	2	9
220	3	2	10
221	3	3	1
222	3	3	2
223	3	3	3
224	3	3	4
225	3	3	5
226	3	3	6
227	3	3	7
228	3	3	8
229	3	3	9
230	3	3	10
231	3	4	1
232	3	4	2
233	3	4	3
234	3	4	4
235	3	4	5
236	3	4	6
237	3	4	7
238	3	4	8

239	3	4	9
240	3	4	10
241	3	5	1
242	3	5	2
243	3	5	3
244	3	5	4
245	3	5	5
246	3	5	6
247	3	5	7
248	3	5	8
249	3	5	9
250	3	5	10
251	3	6	1
252	3	6	2
253	3	6	3
254	3	6	4
255	3	6	5
256	3	6	6
257	3	6	7
258	3	6	8
259	3	6	9
260	3	6	10
261	3	7	1
262	3	7	2

263	3	7	3
264	3	7	4
265	3	7	5
266	3	7	6
267	3	7	7
268	3	7	8
269	3	7	9
270	3	7	10
271	3	8	1
272	3	8	2
273	3	8	3
274	3	8	4
275	3	8	5
276	3	8	6
277	3	8	7
278	3	8	8
279	3	8	9
280	3	8	10
281	3	9	1
282	3	9	2
283	3	9	3
284	3	9	4
285	3	9	5
286	3	9	6

ES 2 681 343 T3

287	3	9	7
288	3	9	8
289	3	9	9
290	3	9	10
291	3	10	1
292	3	10	2
293	3	10	3
294	3	10	4
295	3	10	5
296	3	10	6
297	3	10	7
298	3	10	8
299	3	10	9
300	3	10	10
301	4	1	1
302	4	1	2
303	4	1	3
304	4	1	4
305	4	1	5
306	4	1	6
307	4	1	7
308	4	1	8
309	4	1	9
310	4	1	10

311	4	2	1
312	4	2	2
313	4	2	3
314	4	2	4
315	4	2	5
316	4	2	6
317	4	2	7
318	4	2	8
319	4	2	9
320	4	2	10
321	4	3	1
322	4	3	2
323	4	3	3
324	4	3	4
325	4	3	5
326	4	3	6
327	4	3	7
328	4	3	8
329	4	3	9
330	4	3	10
331	4	4	1
332	4	4	2
333	4	4	3
334	4	4	4

335	4	4	5
336	4	4	6
337	4	4	7
338	4	4	8
339	4	4	9
340	4	4	10
341	4	5	1
342	4	5	2
343	4	5	3
344	4	5	4
345	4	5	5
346	4	5	6
347	4	5	7
348	4	5	8
349	4	5	9
350	4	5	10
351	4	6	1
352	4	6	2
353	4	6	3
354	4	6	4
355	4	6	5
356	4	6	6
357	4	6	7
358	4	6	8

ES 2 681 343 T3

359	4	6	9
360	4	6	10
361	4	7	1
362	4	7	2
363	4	7	3
364	4	7	4
365	4	7	5
366	4	7	6
367	4	7	7
368	4	7	8
369	4	7	9
370	4	7	10
371	4	8	1
372	4	8	2
373	4	8	3
374	4	8	4
375	4	8	5
376	4	8	6
377	4	8	7
378	4	8	8
379	4	8	9
380	4	8	10
381	4	9	1
382	4	9	2

383	4	9	3
384	4	9	4
385	4	9	5
386	4	9	6
387	4	9	7
388	4	9	8
389	4	9	9
390	4	9	10
391	4	10	1
392	4	10	2
393	4	10	3
394	4	10	4
395	4	10	5
396	4	10	6
397	4	10	7
398	4	10	8
399	4	10	9
400	4	10	10
401	5	1	1
402	5	1	2
403	5	1	3
404	5	1	4
405	5	1	5
406	5	1	6

407	5	1	7
408	5	1	8
409	5	1	9
410	5	1	10
411	5	2	1
412	5	2	2
413	5	2	3
414	5	2	4
415	5	2	5
416	5	2	6
417	5	2	7
418	5	2	8
419	5	2	9
420	5	2	10
421	5	3	1
422	5	3	2
423	5	3	3
424	5	3	4
425	5	3	5
426	5	3	6
427	5	3	7
428	5	3	8
429	5	3	9
430	5	3	10

ES 2 681 343 T3

431	5	4	1
432	5	4	2
433	5	4	3
434	5	4	4
435	5	4	5
436	5	4	6
437	5	4	7
438	5	4	8
439	5	4	9
440	5	4	10
441	5	5	1
442	5	5	2
443	5	5	3
444	5	5	4
445	5	5	5
446	5	5	6
447	5	5	7
448	5	5	8
449	5	5	9
450	5	5	10
451	5	6	1
452	5	6	2
453	5	6	3
454	5	6	4

455	5	6	5
456	5	6	6
457	5	6	7
458	5	6	8
459	5	6	9
460	5	6	10
461	5	7	1
462	5	7	2
463	5	7	3
464	5	7	4
465	5	7	5
466	5	7	6
467	5	7	7
468	5	7	8
469	5	7	9
470	5	7	10
471	5	8	1
472	5	8	2
473	5	8	3
474	5	8	4
475	5	8	5
476	5	8	6
477	5	8	7
478	5	8	8

479	5	8	9
480	5	8	10
481	5	9	1
482	5	9	2
483	5	9	3
484	5	9	4
485	5	9	5
486	5	9	6
487	5	9	7
488	5	9	8
489	5	9	9
490	5	9	10
491	5	10	1
492	5	10	2
493	5	10	3
494	5	10	4
495	5	10	5
496	5	10	6
497	5	10	7
498	5	10	8
499	5	10	9
500	5	10	10
501	6	1	1
502	6	1	2

ES 2 681 343 T3

503	6	1	3
504	6	1	4
505	6	1	5
506	6	1	6
507	6	1	7
508	6	1	8
509	6	1	9
510	6	1	10
511	6	2	1
512	6	2	2
513	6	2	3
514	6	2	4
515	6	2	5
516	6	2	6
517	6	2	7
518	6	2	8
519	6	2	9
520	6	2	10
521	6	3	1
522	6	3	2
523	6	3	3
524	6	3	4
525	6	3	5
526	6	3	6

527	6	3	7
528	6	3	8
529	6	3	9
530	6	3	10
531	6	4	1
532	6	4	2
533	6	4	3
534	6	4	4
535	6	4	5
536	6	4	6
537	6	4	7
538	6	4	8
539	6	4	9
540	6	4	10
541	6	5	1
542	6	5	2
543	6	5	3
544	6	5	4
545	6	5	5
546	6	5	6
547	6	5	7
548	6	5	8
549	6	5	9
550	6	5	10

551	6	6	1
552	6	6	2
553	6	6	3
554	6	6	4
555	6	6	5
556	6	6	6
557	6	6	7
558	6	6	8
559	6	6	9
560	6	6	10
561	6	7	1
562	6	7	2
563	6	7	3
564	6	7	4
565	6	7	5
566	6	7	6
567	6	7	7
568	6	7	8
569	6	7	9
570	6	7	10
571	6	8	1
572	6	8	2
573	6	8	3
574	6	8	4

ES 2 681 343 T3

575	6	8	5
576	6	8	6
577	6	8	7
578	6	8	8
579	6	8	9
580	6	8	10
581	6	9	1
582	6	9	2
583	6	9	3
584	6	9	4
585	6	9	5
586	6	9	6
587	6	9	7
588	6	9	8
589	6	9	9
590	6	9	10
591	6	10	1
592	6	10	2
593	6	10	3
594	6	10	4
595	6	10	5
596	6	10	6
597	6	10	7
598	6	10	8

599	6	10	9
600	6	10	10
601	7	1	1
602	7	1	2
603	7	1	3
604	7	1	4
605	7	1	5
606	7	1	6
607	7	1	7
608	7	1	8
609	7	1	9
610	7	1	10
611	7	2	1
612	7	2	2
613	7	2	3
614	7	2	4
615	7	2	5
616	7	2	6
617	7	2	7
618	7	2	8
619	7	2	9
620	7	2	10
621	7	3	1
622	7	3	2

623	7	3	3
624	7	3	4
625	7	3	5
626	7	3	6
627	7	3	7
628	7	3	8
629	7	3	9
630	7	3	10
631	7	4	1
632	7	4	2
633	7	4	3
634	7	4	4
635	7	4	5
636	7	4	6
637	7	4	7
638	7	4	8
639	7	4	9
640	7	4	10
641	7	5	1
642	7	5	2
643	7	5	3
644	7	5	4
645	7	5	5
646	7	5	6

ES 2 681 343 T3

647	7	5	7
648	7	5	8
649	7	5	9
650	7	5	10
651	7	6	1
652	7	6	2
653	7	6	3
654	7	6	4
655	7	6	5
656	7	6	6
657	7	6	7
658	7	6	8
659	7	6	9
660	7	6	10
661	7	7	1
662	7	7	2
663	7	7	3
664	7	7	4
665	7	7	5
666	7	7	6
667	7	7	7
668	7	7	8
669	7	7	9
670	7	7	10

671	7	8	1
672	7	8	2
673	7	8	3
674	7	8	4
675	7	8	5
676	7	8	6
677	7	8	7
678	7	8	8
679	7	8	9
680	7	8	10
681	7	9	1
682	7	9	2
683	7	9	3
684	7	9	4
685	7	9	5
686	7	9	6
687	7	9	7
688	7	9	8
689	7	9	9
690	7	9	10
691	7	10	1
692	7	10	2
693	7	10	3
694	7	10	4

695	7	10	5
696	7	10	6
697	7	10	7
698	7	10	8
699	7	10	9
700	7	10	10
701	8	1	1
702	8	1	2
703	8	1	3
704	8	1	4
705	8	1	5
706	8	1	6
707	8	1	7
708	8	1	8
709	8	1	9
710	8	1	10
711	8	2	1
712	8	2	2
713	8	2	3
714	8	2	4
715	8	2	5
716	8	2	6
717	8	2	7
718	8	2	8

ES 2 681 343 T3

719	8	2	9
720	8	2	10
721	8	3	1
722	8	3	2
723	8	3	3
724	8	3	4
725	8	3	5
726	8	3	6
727	8	3	7
728	8	3	8
729	8	3	9
730	8	3	10
731	8	4	1
732	8	4	2
733	8	4	3
734	8	4	4
735	8	4	5
736	8	4	6
737	8	4	7
738	8	4	8
739	8	4	9
740	8	4	10
741	8	5	1
742	8	5	2

743	8	5	3
744	8	5	4
745	8	5	5
746	8	5	6
747	8	5	7
748	8	5	8
749	8	5	9
750	8	5	10
751	8	6	1
752	8	6	2
753	8	6	3
754	8	6	4
755	8	6	5
756	8	6	6
757	8	6	7
758	8	6	8
759	8	6	9
760	8	6	10
761	8	7	1
762	8	7	2
763	8	7	3
764	8	7	4
765	8	7	5
766	8	7	6

767	8	7	7
768	8	7	8
769	8	7	9
770	8	7	10
771	8	8	1
772	8	8	2
773	8	8	3
774	8	8	4
775	8	8	5
776	8	8	6
777	8	8	7
778	8	8	8
779	8	8	9
780	8	8	10
781	8	9	1
782	8	9	2
783	8	9	3
784	8	9	4
785	8	9	5
786	8	9	6
787	8	9	7
788	8	9	8
789	8	9	9
790	8	9	10

ES 2 681 343 T3

791	8	10	1
792	8	10	2
793	8	10	3
794	8	10	4
795	8	10	5
796	8	10	6
797	8	10	7
798	8	10	8
799	8	10	9
800	8	10	10
801	9	1	1
802	9	1	2
803	9	1	3
804	9	1	4
805	9	1	5
806	9	1	6
807	9	1	7
808	9	1	8
809	9	1	9
810	9	1	10
811	9	2	1
812	9	2	2
813	9	2	3
814	9	2	4

815	9	2	5
816	9	2	6
817	9	2	7
818	9	2	8
819	9	2	9
820	9	2	10
821	9	3	1
822	9	3	2
823	9	3	3
824	9	3	4
825	9	3	5
826	9	3	6
827	9	3	7
828	9	3	8
829	9	3	9
830	9	3	10
831	9	4	1
832	9	4	2
833	9	4	3
834	9	4	4
835	9	4	5
836	9	4	6
837	9	4	7
838	9	4	8

839	9	4	9
840	9	4	10
841	9	5	1
842	9	5	2
843	9	5	3
844	9	5	4
845	9	5	5
846	9	5	6
847	9	5	7
848	9	5	8
849	9	5	9
850	9	5	10
851	9	6	1
852	9	6	2
853	9	6	3
854	9	6	4
855	9	6	5
856	9	6	6
857	9	6	7
858	9	6	8
859	9	6	9
860	9	6	10
861	9	7	1
862	9	7	2

ES 2 681 343 T3

863	9	7	3
864	9	7	4
865	9	7	5
866	9	7	6
867	9	7	7
868	9	7	8
869	9	7	9
870	9	7	10
871	9	8	1
872	9	8	2
873	9	8	3
874	9	8	4
875	9	8	5
876	9	8	6
877	9	8	7
878	9	8	8
879	9	8	9
880	9	8	10
881	9	9	1
882	9	9	2
883	9	9	3
884	9	9	4
885	9	9	5
886	9	9	6

887	9	9	7
888	9	9	8
889	9	9	9
890	9	9	10
891	9	10	1
892	9	10	2
893	9	10	3
894	9	10	4
895	9	10	5
896	9	10	6
897	9	10	7
898	9	10	8
899	9	10	9
900	9	10	10
901	10	1	1
902	10	1	2
903	10	1	3
904	10	1	4
905	10	1	5
906	10	1	6
907	10	1	7
908	10	1	8
909	10	1	9
910	10	1	10

911	10	2	1
912	10	2	2
913	10	2	3
914	10	2	4
915	10	2	5
916	10	2	6
917	10	2	7
918	10	2	8
919	10	2	9
920	10	2	10
921	10	3	1
922	10	3	2
923	10	3	3
924	10	3	4
925	10	3	5
926	10	3	6
927	10	3	7
928	10	3	8
929	10	3	9
930	10	3	10
931	10	4	1
932	10	4	2
933	10	4	3
934	10	4	4

ES 2 681 343 T3

935	10	4	5
936	10	4	6
937	10	4	7
938	10	4	8
939	10	4	9
940	10	4	10
941	10	5	1
942	10	5	2
943	10	5	3
944	10	5	4
945	10	5	5
946	10	5	6
947	10	5	7
948	10	5	8
949	10	5	9
950	10	5	10
951	10	6	1
952	10	6	2
953	10	6	3
954	10	6	4
955	10	6	5
956	10	6	6
957	10	6	7
958	10	6	8

959	10	6	9
960	10	6	10
961	10	7	1
962	10	7	2
963	10	7	3
964	10	7	4
965	10	7	5
966	10	7	6
967	10	7	7
968	10	7	8
969	10	7	9
970	10	7	10
971	10	8	1
972	10	8	2
973	10	8	3
974	10	8	4
975	10	8	5
976	10	8	6
977	10	8	7
978	10	8	8
979	10	8	9
980	10	8	10
981	10	9	1
982	10	9	2

983	10	9	3
984	10	9	4
985	10	9	5
986	10	9	6
987	10	9	7
988	10	9	8
989	10	9	9
990	10	9	10
991	10	10	1
992	10	10	2
993	10	10	3
994	10	10	4
995	10	10	5
996	10	10	6
997	10	10	7
998	10	10	8
999	10	10	9

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
 - 5 a. ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AKG); y
 - b. una lipasa, una proteasa y una amilasa,
 para su uso como medicamento.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en la que:
 - 15 la composición comprende 200-20000 unidades USP de lipasa por mmol de AKG;
 - la composición comprende 500-50000 unidades USP de proteasa por mmol de AKG; y/o
 - la composición comprende 200-20000 unidades USP de amilasa por mmol de AKG.
- 20 3. Composición según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, que comprende 3000-300000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG como cristales de lipasa reticulados, 2000-200000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-300000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.
- 25 4. Composición según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, que comprende pancrelipasa en una cantidad correspondiente a 300-300000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende alfa-cetoglutarato de sodio.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende alfa-cetoglutarato de calcio.
- 30 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neurológico seleccionado de trastornos neurodegenerativos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria y trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria, depresión y síndrome de fatiga crónica.
- 35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso según la reivindicación 1 ó 7, para su uso en un método que comprende administrar una cantidad de la composición que contiene 0,5-24 mmol de AKG a un paciente al día.
- 40 9. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento o prevención de trastornos neurodegenerativos, trastornos de células madre neuronales, trastornos de células progenitoras neuronales, trastornos isquémicos, traumatismos neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades degenerativas de la retina, traumatismo/lesión retinaria y trastornos de la cognición, el aprendizaje y la memoria, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Parkinson y trastornos parkinsonianos, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo craneoencefálico, depresión, depresión/trastorno bipolar, síndrome de fatiga crónica, síndromes/trastornos de ansiedad, autismo, síndrome de Asperger, trastornos por déficit de atención, y trastornos del rendimiento cognitivo o la memoria, comprendiendo el método administrar a un sujeto:
 - 45 a. ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
 - b. una lipasa, una proteasa y una amilasa.
- 50 10. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 9, en el que:
 - 55 el método comprende administrar 200-20000 unidades USP de lipasa por mmol de AKG;
 - 60 el método comprende administrar 500-50000 unidades USP de proteasa por mmol de AKG; y/o

el método comprende administrar 200-20000 unidades USP de amilasa por mmol de AKG.

- 5
11. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 9, en el que:
- el método comprende administrar 3000-300000 unidades USP de lipasa de *Burkholderia cepacia* por g de AKG como cristales de lipasa reticulados, 2000-200000 unidades USP de proteasa de *Aspergillus melleus* por g de AKG y 300-30000 unidades USP de amilasa de *Aspergillus oryzae* por g de AKG.
- 10
12. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 9, en el que el método comprende administrar pancrelipasa en una cantidad correspondiente a 300-300000 unidades USP de lipasa de pancrelipasa por g de AKG.
- 15
13. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el método comprende administrar alfa-cetoglutarato de sodio.
14. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que el método comprende administrar alfa-cetoglutarato de calcio.
- 20
15. Ácido alfa-cetoglutarico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en el que el método comprende administrar 0,5-24 mmol de AKG al día al sujeto.

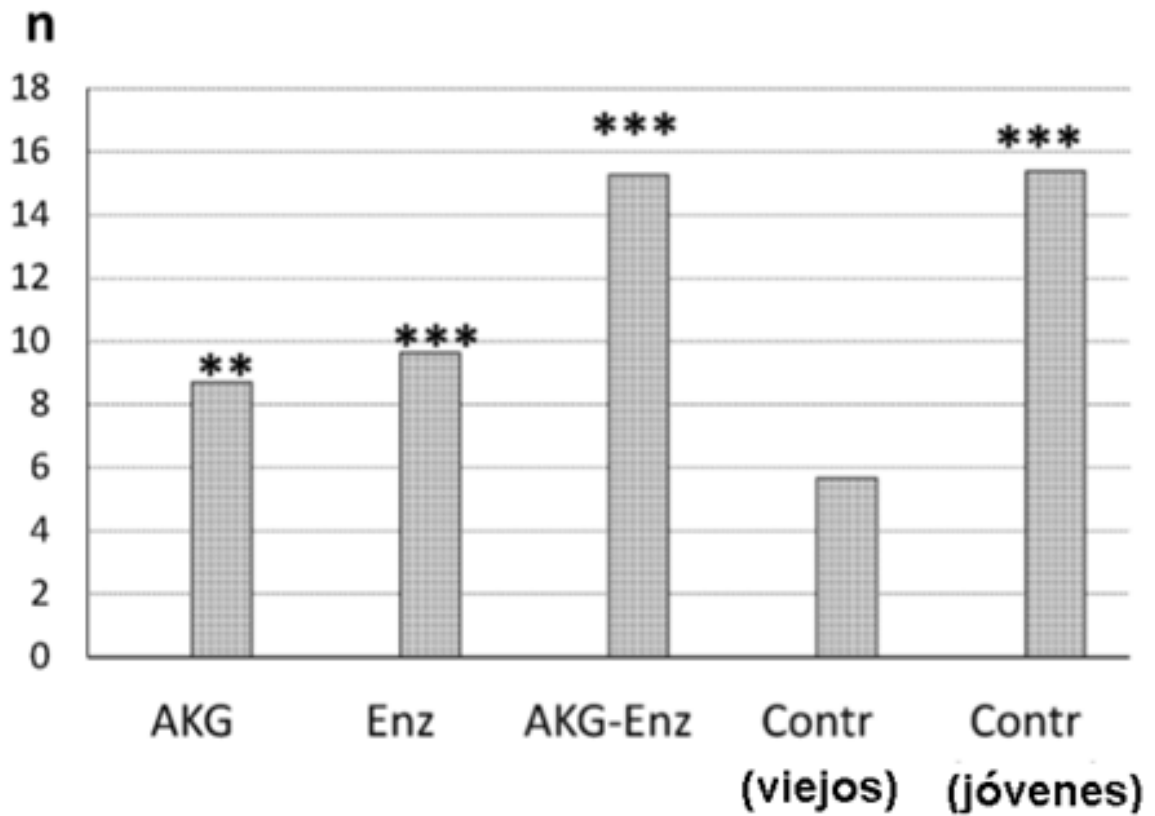


Fig 1

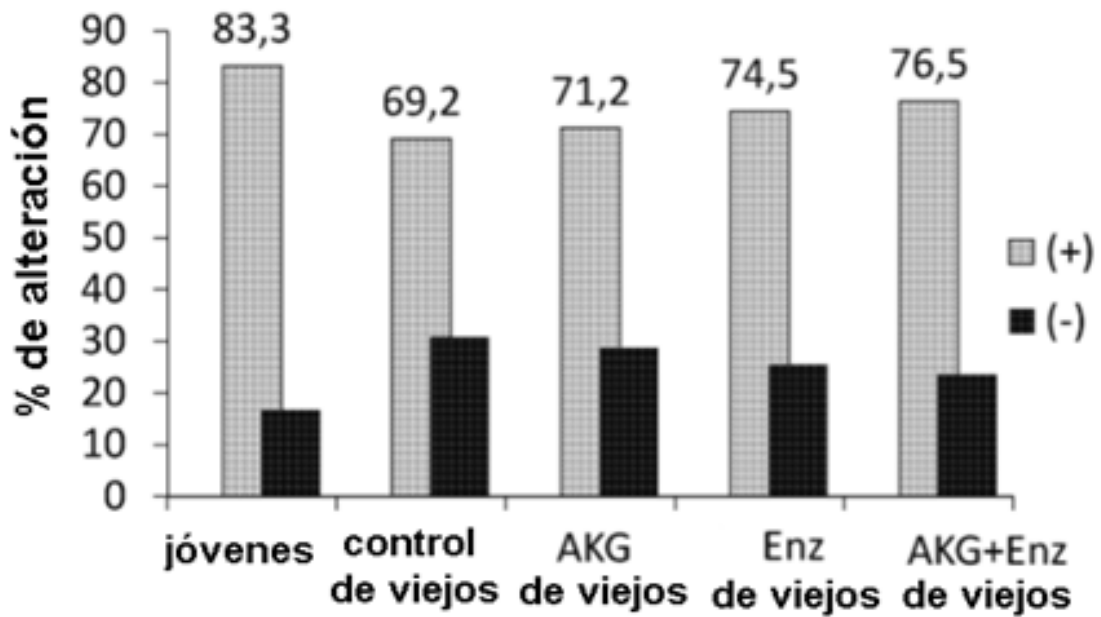


Fig 2

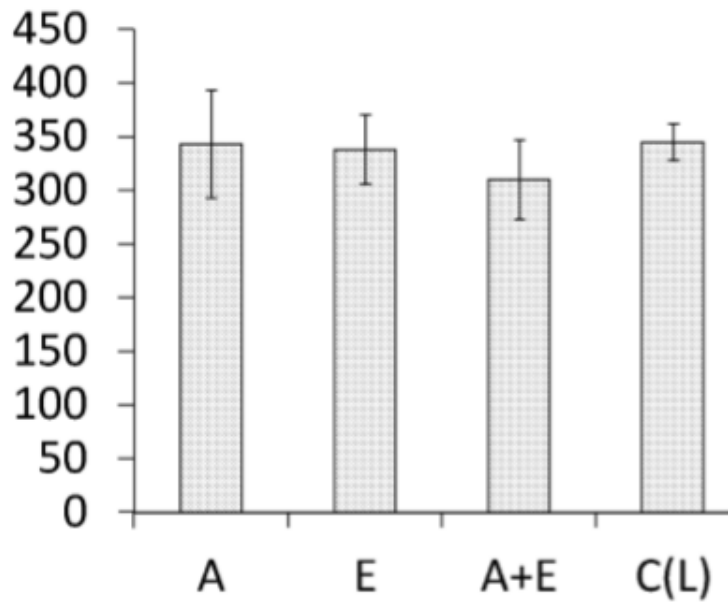


Fig 3A

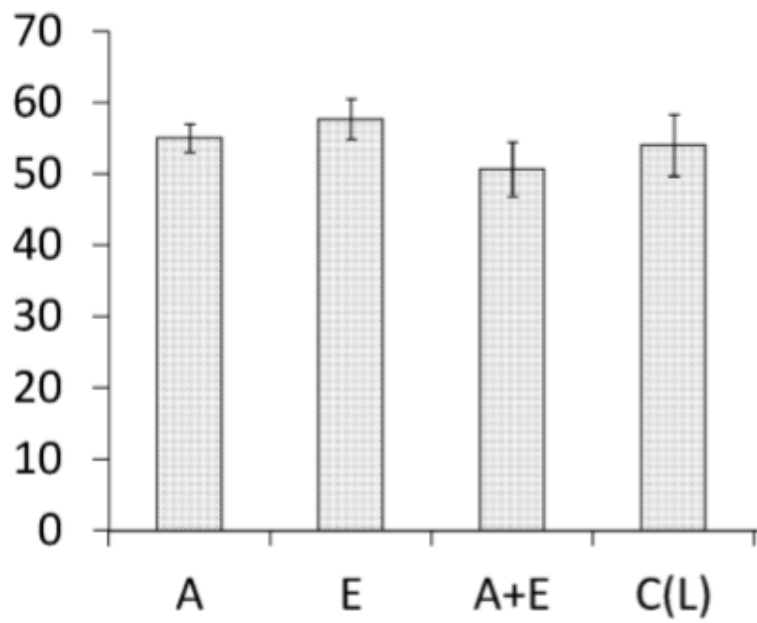


Fig 3B

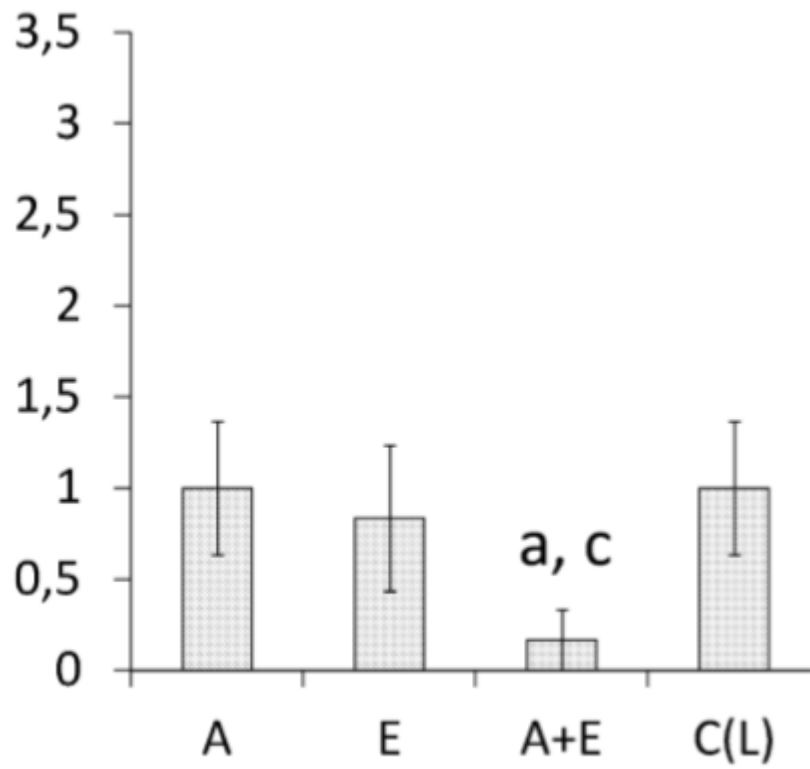


Fig 3C

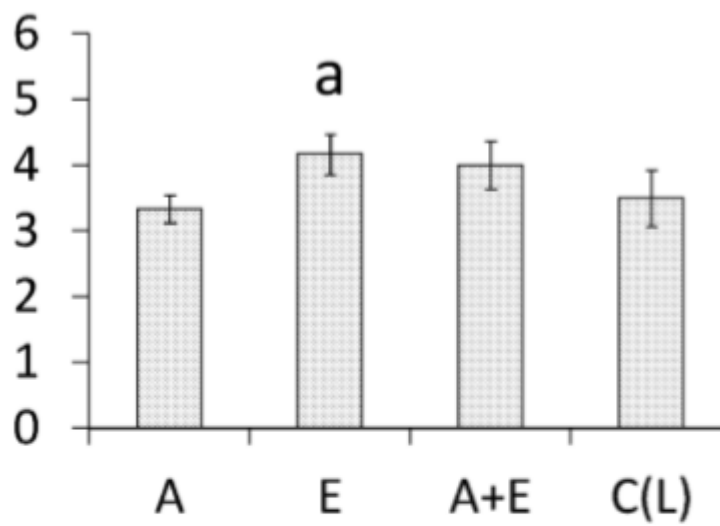


Fig 3D

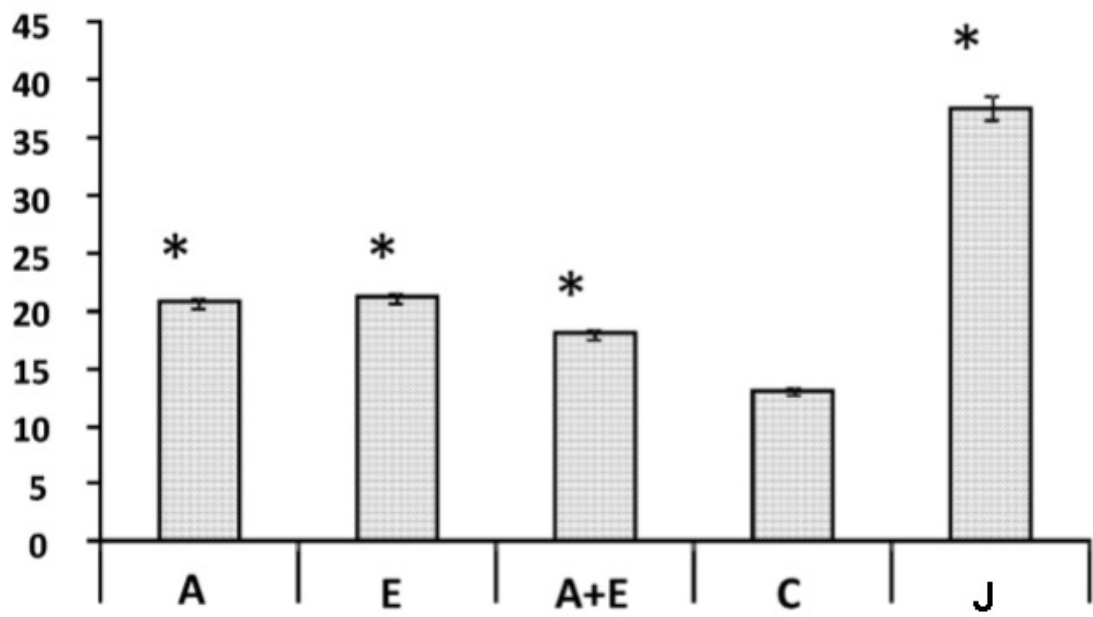


Fig 4



Fig 5

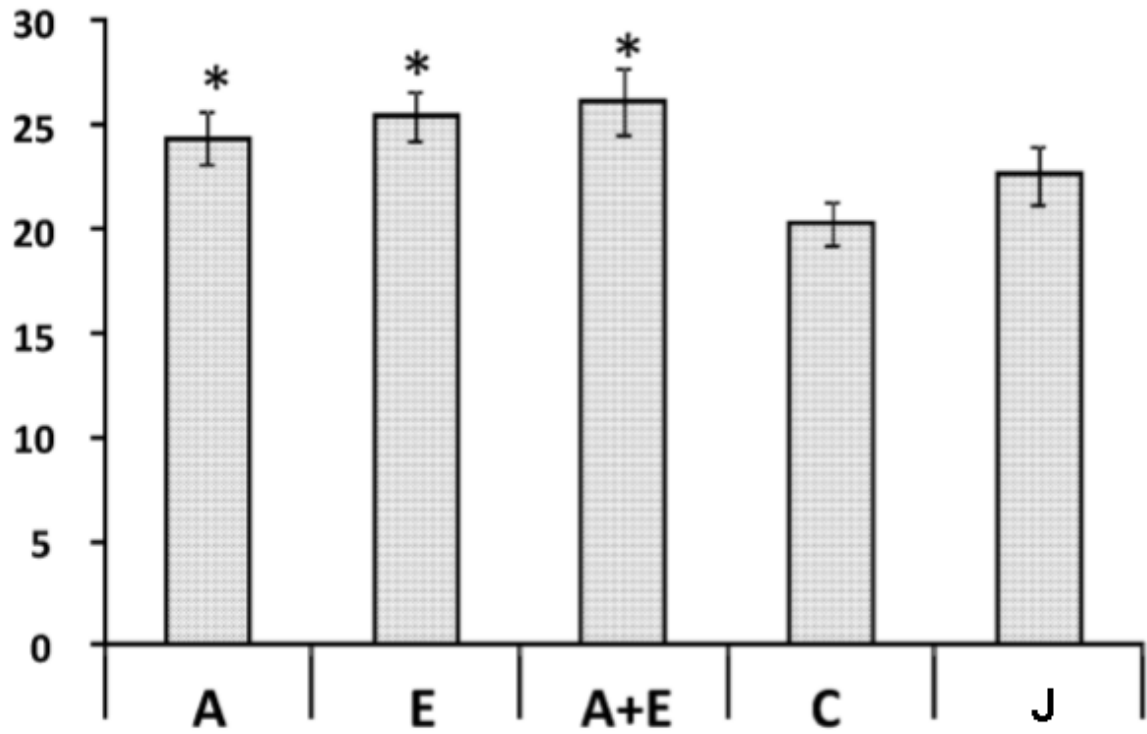


Fig 6A

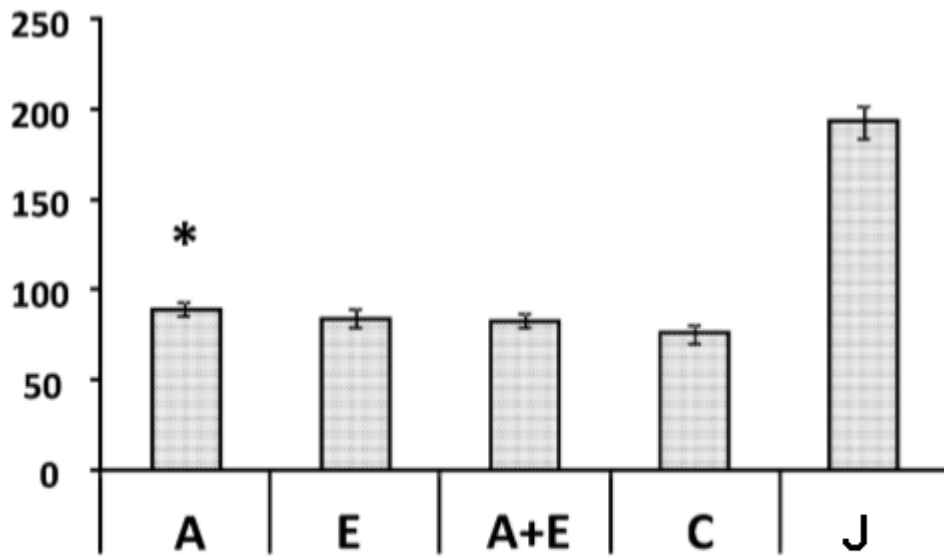


Fig 6B

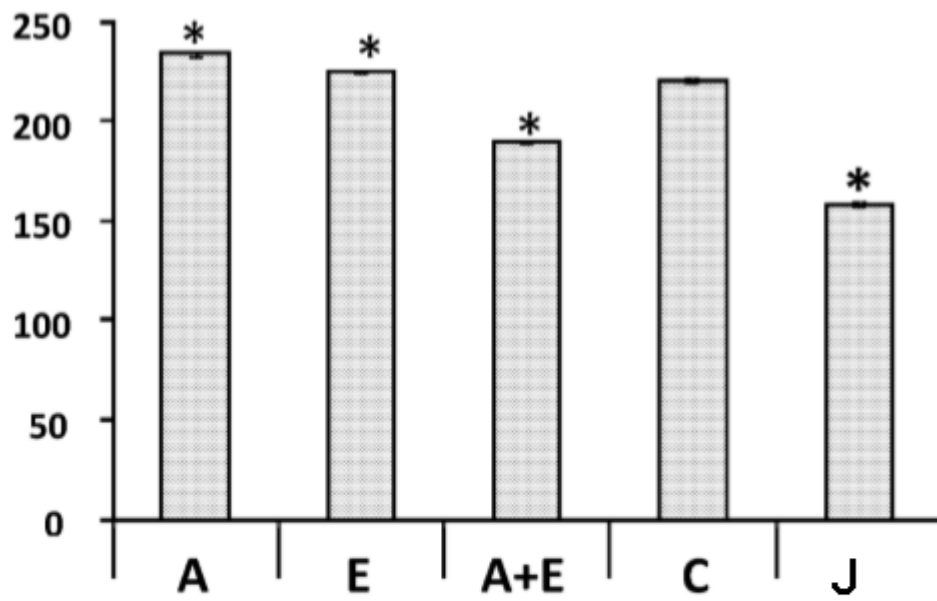


Fig 7

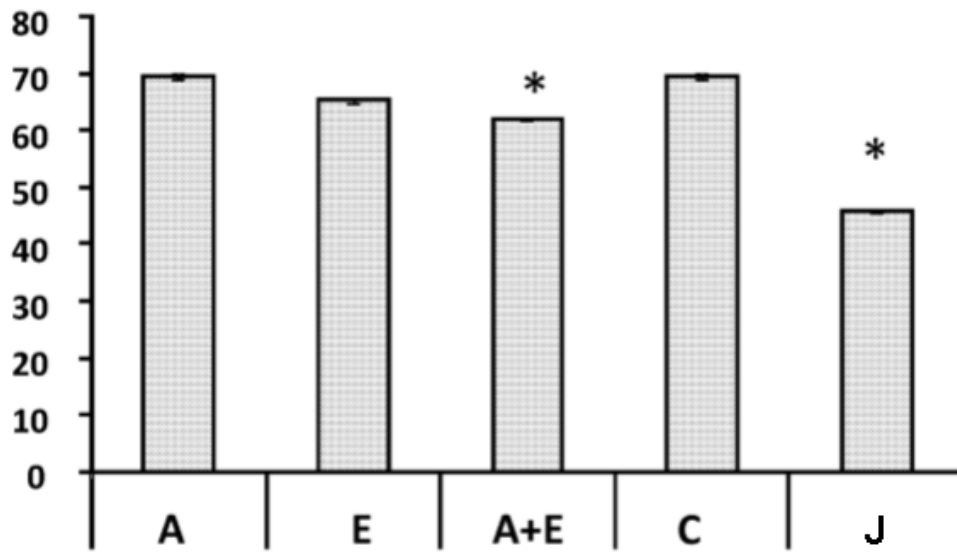


Fig 8

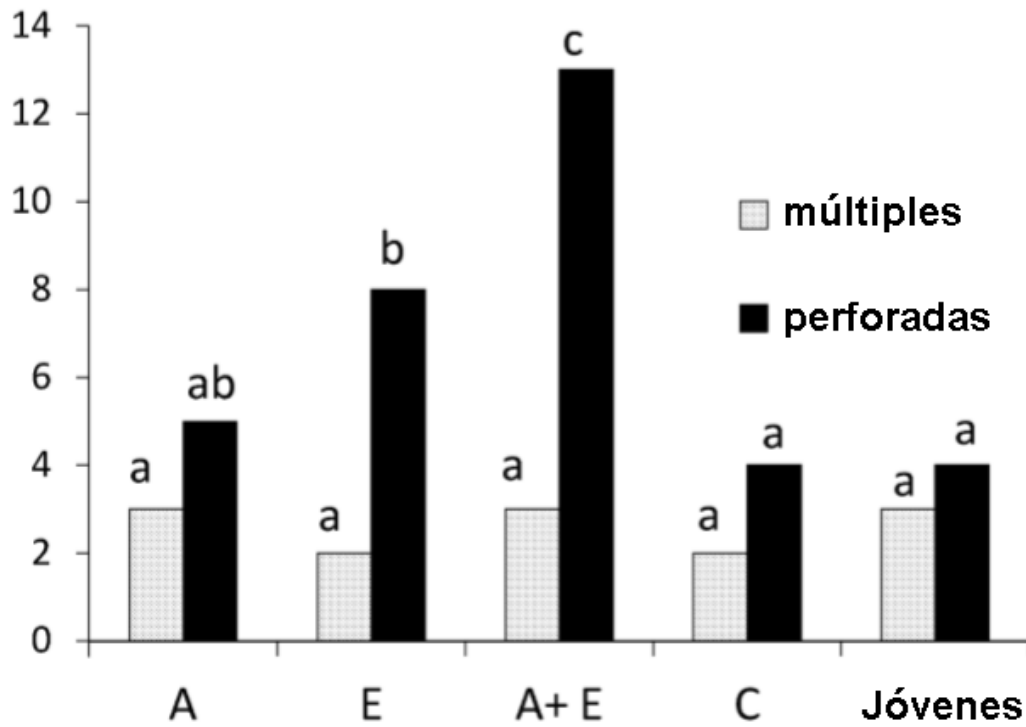


Fig 9

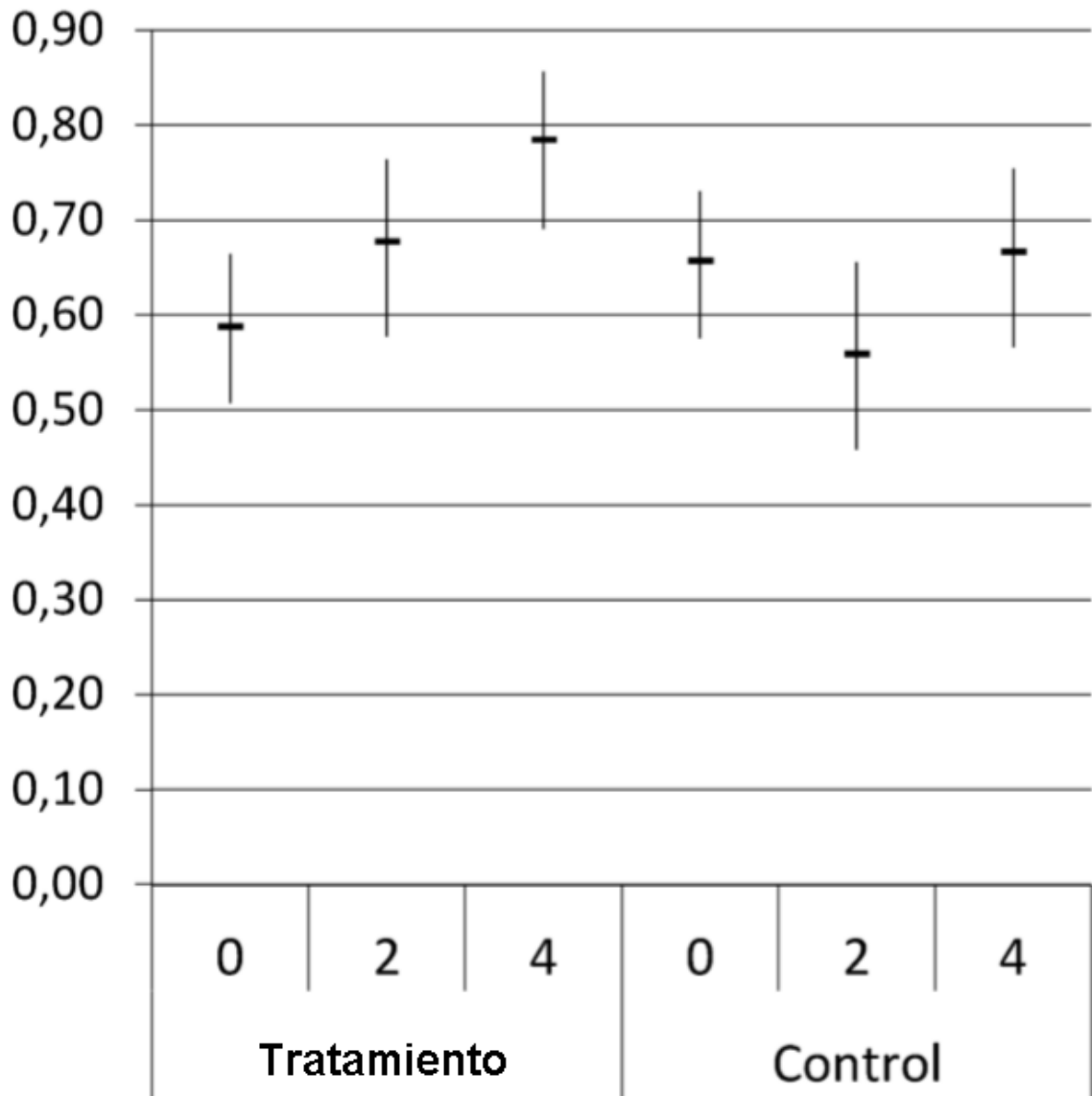


Fig 10

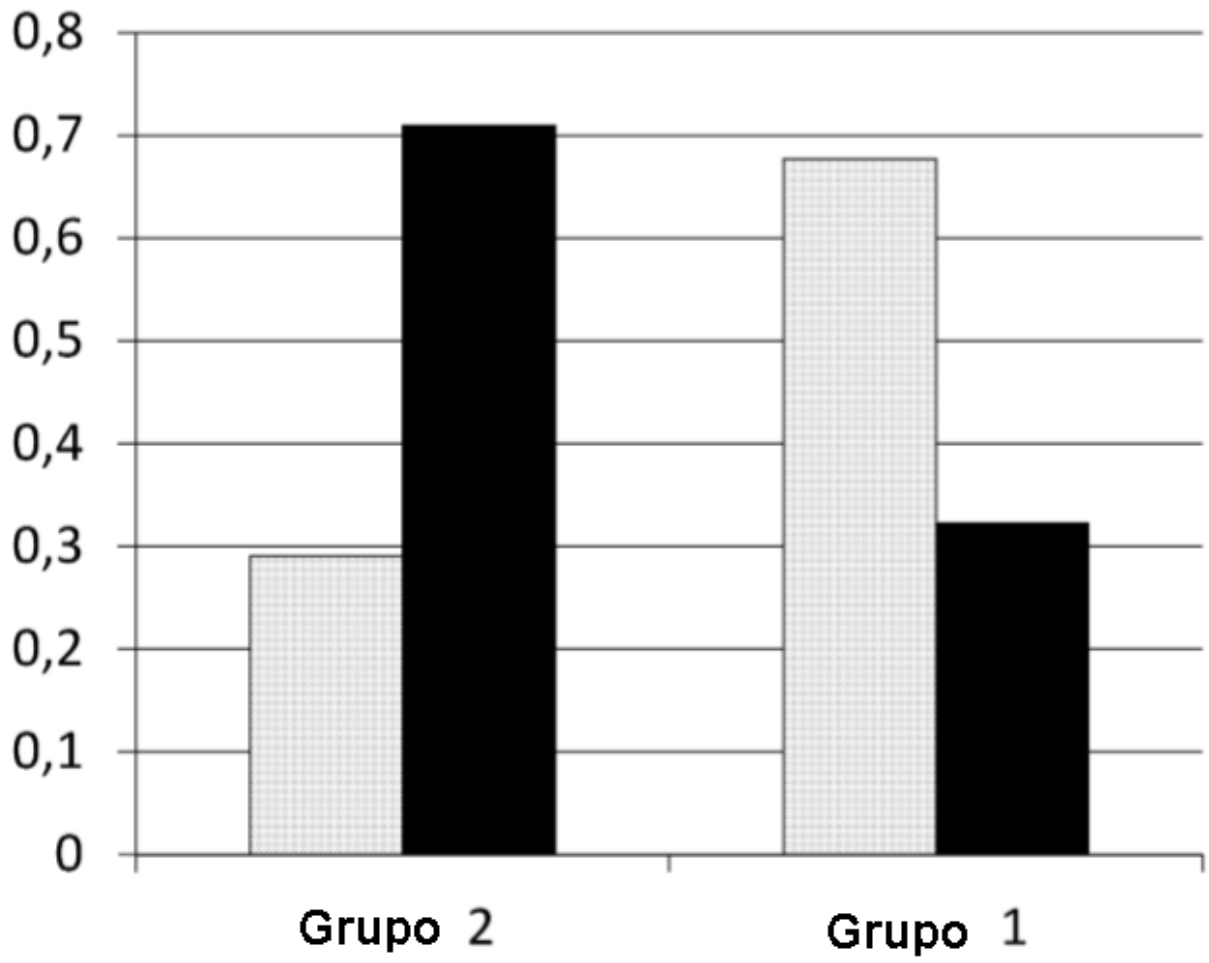


Fig 11