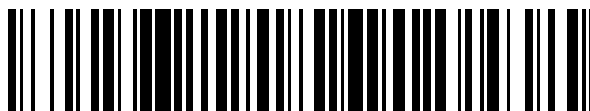


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 471**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2013 PCT/JP2013/080052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14069666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2013 E 13851411 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2914257**

54 Título: **Agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral**

30 Prioridad:

30.10.2012 JP 2012238541

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

24.10.2019

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**KUMAGAI, KOTA;
MORITA, MASAHIKO;
HARA, TAKAHIRO y
FUKUNAGA, KOHJI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 728 471 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

Agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral, que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo como principios activos.

10 **Antecedentes de la técnica**

El cerebro es la región más significativa del sistema nervioso central para la transmisión de información a través de nervios, tales como el movimiento y la percepción, y desempeña un papel importante en la actividad mental humana, tal como sensaciones, emociones, razonamiento o similares. Entre las disfunciones cerebrales superiores causadas por traumatismos cerebrales, trastornos cerebrovasculares, cerebritis, hipoxia o similares se incluyen un amplio abanico de defectos de la memoria, la atención, el funcionamiento ejecutivo, el comportamiento social y similares, y sus características varían dependiendo de la parte dañada del cerebro. Además, asimismo se informa de que el deterioro de la función cerebral puede estar causado por fatiga (literatura no de patentes nº 1), conduciendo al deterioro de capacidades, tales como la memoria, el aprendizaje, la atención, la concentración, el juicio o similares.

La citrulina es uno de los aminoácidos existentes en forma libre y no se utiliza como constituyente para la síntesis de proteínas *in vivo*. En el cuerpo, la citrulina sirve como precursor de la arginina en la biosíntesis de la arginina o como componente importante en el ciclo del NO participante en el suministro de óxido nítrico (NO). La citrulina ingerida se convierte mayoritariamente en arginina en el riñón y la arginina producida se suministra sistémicamente de manera eficiente (literatura no de patentes nº 2).

La arginina es un aminoácido que será un sustrato directo de la óxido nítrico (NO) sintasa. Además, la arginina es un intermediario en el ciclo de la urea en el hígado y desempeña un papel importante en la destoxificación del amonio producida en el cuerpo. El NO sintetizado a partir de la arginina como sustrato ejerce una diversidad de funciones fisiológicas en el mantenimiento de las funciones vasculares normales, incluyendo la vasodilatación, la inhibición de la oxidación de LDL, la inhibición de la agregación plaquetaria, el efecto antiproliferación sobre las células de músculo liso, el efecto antioxidante y similares.

Se informa de que la ingestión de citrulina muestra una acción antiarterioesclerótica y mejora la circulación sanguínea mediante la producción del vasodilatador NO (literatura no de patentes nº 3) y la citrulina es ampliamente utilizada en Estados Unidos como material alimenticio para producir NO destinado a mejorar la circulación sanguínea. La citrulina asimismo se utiliza en Europa como fármaco antifatiga en forma de citrulina-malato.

El glutatión es un tripéptido compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina, y desempeña un papel crucial en la eliminación de las especies de oxígeno reactivo *in vivo*. El glutatión asimismo participa en el mecanismo de destoxificación para eliminar xenobióticos del cuerpo.

Se informa de que la ingestión de glutatión muestra un efecto hepatoprotector (literatura no de patentes nº 4), un efecto blanqueador (literatura no de patentes nº 5) o similar. Debido a dichas funciones, el glutatión se utiliza como agente destoxicante en caso de envenenamiento; como fármaco para mejorar la función hepática, o como material alimentario antioxidante.

Es conocido que la enfermedad cerebrovascular isquémica causa la muerte de células neuronales cerebrales, conduciendo al deterioro de la función cerebral. La causa incluye daños neurovasculares, disfunción endotelial, flujo sanguíneo cerebral disminuido o similares (literatura no de patentes nº 6) y se entiende que una reducción de la producción normal de NO en las células endoteliales y un flujo sanguíneo cerebral disminuido causan la muerte de las células neuronales cerebrales y el deterioro de la función cerebral. En otras palabras, se espera que las células neuronales cerebrales puedan protegerse y que el deterioro de la función cerebral pueda prevenirse o mejorarse mediante la potenciación de la producción de NO en las células endoteliales y el flujo sanguíneo cerebral.

Hasta el momento, han aparecido informes sobre la mejora de la concentración de la atención mediante la ingestión oral de citrulina (literatura de patentes nº 1), la utilización de citrulina para mejorar la salud de un sujeto con un factor de riesgo de enfermedad neurodegenerativa progresiva asociada a la edad, tal como la enfermedad de Alzheimer (literatura de patentes nº 2) y la mejora de la capacidad de memoria y aprendizaje mediante la inyección intraperitoneal de arginina (literatura no de patentes nº 7). Además, se ha informado de que el glutatión participa en el mantenimiento de la homeostasis de la función cerebral (literatura no de patentes nº 8) y la reducción del metabolismo del tejido cerebral puede protegerse mediante la infusión de glutatión (literatura no de patentes nº 9). Sin embargo, no han aparecido informes de que la ingestión oral de glutatión muestre el efecto de prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral y pueda obtenerse un efecto sinérgico de prevención o mejora del

deterioro de la función cerebral mediante la utilización de citrulina o una sal de la misma en combinación con glutatión o una sal del mismo.

Listado de referencias

5

Literatura de patentes

[LTP1] Documento nº WO 2009/096505

[LTP2] Documento nº US 2006/046982

10

Literatura no de patentes

[LNP1] Journal of occupational health, 2007, Vol.49, p.203-208.

[LNP2] Amino Acids, 2005, Vol.29, p.177-205.

15

[LNP3] PNAS, 2005, Vol.102, p.13681-13686.

[LNP4] Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 1998, Vol.44, p.613-624.

[LNP5] Journal of Dermatological Treatment, 2012, Vol.23-2, p.97-102.

[LNP6] Neuroscience, 1999, Vol.91, p.203-210.

[LNP7] Psychopharmacology, 2003, Vol.167, p.291-296.

20

[LNP8] International Journal of Cell Biology, 2012, Vol.2012, Article ID 434971.

[LNP9] Anesthesia, 1982, Vol.31-4, p.313-327.

Sumario de la invención

25

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral, tal como una capacidad de percepción disminuida, una capacidad de aprendizaje de memoria disminuidos, una capacidad de pensamiento disminuida, una concentración disminuida, una atención disminuida, una capacidad de juicio disminuida, depresión y un rendimiento del ejercicio disminuido así causado.

30

Solución al problema

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, puede proporcionarse un agente seguro y eficaz para proteger las células neuronales cerebrales y un agente seguro y eficaz para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral, que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo como principios activos. Según el agente de la presente invención, el comportamiento de memoria puede mejorarse sinérgica y eficazmente mediante la utilización de citrulina o una sal de la misma en combinación con glutatión o una sal del mismo, y puede obtenerse un efecto excelente como el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral.

40

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la tasa de comportamiento de alternancia espontánea (alternancia) en la prueba del laberinto en Y tras la administración de cada concentración de la muestra en ratones durante 7 días. Media \pm error estándar. N=5 a 7. Se observan diferencias significativas entre diferentes letras.

50

La figura 2 representa el tiempo transcurrido en el compartimiento iluminado (tiempo de latencia) en la prueba de evitación pasiva tras la administración de cada concentración de la muestra en ratones durante 7 días. Media \pm error estándar. N=5 a 7. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre diferentes letras.

55

La figura 3 representa la proporción entre la frecuencia de exploración de objetos familiares y objetos nuevos en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos tras la administración de cada concentración de la muestra en ratones durante 7 días. Media \pm error estándar. N=5 a 7. ** indica diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los objetos familiares y los objetos nuevos.

60

La figura 4 representa la viabilidad de las células nerviosas hipocámpicas tras la administración de cada concentración de la muestra en ratones durante 12 días. Media \pm error estándar. N=4. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre diferentes letras.

Descripción de las formas de realización

La citrulina utilizada en la presente exposición incluye L-citrulina y D-citrulina. Resulta preferida la L-citrulina. La citrulina puede obtenerse mediante síntesis química, fermentación o similar. La citrulina puede obtenerse además mediante la adquisición de un producto disponible comercialmente. Un método de síntesis química de la citrulina incluye los métodos descritos en J. Biol. Chem. 122:477, 1938, y J. Org. Chem. 6:410, 1941.

Un método para producir L-citrulina mediante fermentación incluye los métodos descritos en las publicaciones de patente japonesa nº 1978-075387 y nº 1988-068091. Además, la L-citrulina y la D-citrulina asimismo pueden adquirirse de Sigma-Aldrich Co. o similar.

Entre las sales de citrulina se incluyen sales de adición de ácido, sales metálicas, sales de amonio, sales de adición de amina orgánica, sales de adición de aminoácido y similares. La sal de adición de ácido incluye sales de ácido inorgánico, tales como hidrocloreuro, sulfato, nitrato, fosfato y similares, y sales de ácido orgánico, tales como acetato, maleato, fumarato, citrato, malato, lactato, α -cetoglutarato, gluconato, caprilato y similares. La sal metálica incluye sales de metal alcalino, tales como sales sódicas, sales potásicas y similares, sales de metal alcalino-térreo, tales como sales de magnesio, sales de calcio y similares, sales de aluminio, sales de cinc y similares. La sal de amonio incluye sales amónicas, sales de tetrametil-amonio y similares. La sal de adición de amina orgánica incluye sales de morfolina, sales de piperidina y similares. La sal de adición de aminoácido incluye sales de glicina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y similares. Entre las sales anteriormente indicadas de citrulina, se utiliza preferentemente el malato. Otras sales o dos o más sales pueden utilizarse en una combinación apropiada.

El glutatión utilizado en la presente exposición incluye un glutatión reducido y un glutatión oxidado.

El glutatión reducido se refiere a un tripéptido con una estructura γ -L-Glu-L-Cys-Gly, y el glutatión oxidado se refiere a un dipéptido de glutatión en el que dos moléculas de glutatión reducido se encuentran unidas mediante un enlace SS.

El glutatión reducido y el glutatión oxidado utilizados en la presente exposición pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento de producción. Los procedimientos para la producción de glutatión reducido incluyen el método de extracción a partir de microorganismos tales como levaduras y similares [Methods in Enzymology, 3, 603, 1957], el método de síntesis química [Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, 2529, 1980], el método enzimático (publicación de patente japonesa nº 1986-74595) y similares. El procedimiento para la producción de glutatión oxidado incluye el método de [Acta Biochim. Pol., 17, 175, 1970] y similares. Asimismo, pueden adquirirse glutatión reducido y glutatión oxidado de Sigma-Aldrich Co., o similares.

El agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición incluye glutatión reducido o glutatión oxidado solo o incluye glutatión reducido y glutatión oxidado simultáneamente.

El glutatión reducido y el glutatión oxidado comprendidos en el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición pueden existir en forma de una sal de los mismos en el agente. La sal de glutatión reducido y glutatión oxidado puede ser la misma sal que la de la citrulina indicada anteriormente.

Una proporción de composición de citrulina o una sal de la misma a glutatión o una sal del mismo en el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición es de 1:100 a 100:1, preferentemente de 1:50 a 50:1, particularmente preferentemente de 10:1 a 1:10 en peso.

Como agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición, puede administrarse citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo por sí solos, aunque habitualmente resulta preferido proporcionar el agente en forma de diversos tipos de preparación.

Las preparaciones comprenden, como principios activos, citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo, y pueden incluir además cualesquiera principios activos. Las preparaciones se producen según cualesquiera métodos conocidos en el campo técnico de la farmacéutica, mediante la mezcla de los principios activos con uno o más tipos de portadores farmacéuticamente aceptables.

Entre las vías de administración de la preparación pueden incluirse la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración intravenosa, la administración intraperitoneal, la administración subcutánea o similares. Resulta preferida la administración oral.

La preparación puede administrarse en forma de preparaciones orales, tales como comprimidos, polvos, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, infusiones/decocciones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tinturas, extractos líquidos y similares, o preparaciones parenterales, tales como inyecciones, gotas, cremas, supositorios y similares. Resultan preferidas las preparaciones orales.

Las preparaciones líquidas adecuadas para la administración oral, tales como los jarabes, pueden prepararse mediante la adición de agua, azúcares tales como sacarosa, sorbitol, fructosa o similares, glicoles tales como polietilenglicol, propilenglicol o similares, aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja o similares, antisépticos tales como éster de p-hidroxibenzoato o similares, derivados de ácido paraoxibenzoico, tales como paraoxibenzoato de metilo, conservantes tales como benzoato sódico o similares, saborizantes tales como saborizante de fresa, de menta o similares, o similares.

Por ejemplo, pueden prepararse comprimidos, polvos, gránulos o similares adecuados para la administración oral mediante la adición de excipientes, tales como azúcares, tales como lactosa, azúcar blanco, glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol o similares, almidón tales como patata, trigo, maíz o similares, sustancias inorgánicas tales como carbonato de calcio, sulfato de calcio, hidrogenocarbonato de sodio, cloruro sódico o similares, polvos vegetales, tales como celulosa cristalina, polvos de regaliz, genciana en polvo o similares, agentes desintegrantes tales como almidón, agar, polvos de gelatina, celulosa cristalina, carmelosa sódica, carmelosa de calcio, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato sódico, alginato sódico o similares, lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, aceite vegetal hidrogenado, macrogol, aceite de silicona o similares, ligantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, carmelosa, gelatina, pasta de almidón o similares, tensioactivos tales como ésteres de ácido graso o similares, plastificadores tales como glicerina o similares.

Las preparaciones adecuadas para la ingestión oral o la administración incluyen aditivos utilizados generalmente en alimentos, tales como edulcorantes, agentes colorantes, conservantes, espesantes, estabilizadores, antioxidantes, desarrolladores de color, agentes blanqueadores, fungicidas, bases de goma, agentes amargos, enzimas, agentes de recubrimiento, agentes ácidos, condimentos, emulsionantes, intensificadores, agentes facilitadores de la fabricación, saborizantes, extractos de especias y similares.

Las formas o preparaciones de producto adecuadas para la ingestión oral o la administración pueden procesarse en, por ejemplo, comprimidos, polvos, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, infusiones/decocciones, cápsulas, bebidas, líquidos, elixires, extractos, tinturas o extractos líquidos en una forma de envasado unitario por ingestión, según el periodo de ingestión, frecuencia de ingestión, dosis de ingestión y similares. Por ejemplo, "forma de envasado unitario por ingestión" se refiere a que se envasa una cantidad predeterminada para cada ingestión y "forma de envasado unitario para 1 semana a 3 meses" se refiere a que se envasa una dosis de ingestión para 1 semana a 3 meses. Entre los ejemplos de la forma de envasado unitario se incluye una forma para prescribir una cantidad predeterminada, tal como un paquete, un envase, una botella o similar.

Con respecto a la "forma de envasado unitario por ingestión", por ejemplo, en el caso de que la forma o preparación de producto sea una bebida, 50 mg o más de citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo suspendidos o disueltos en una bebida pueden envasarse en su totalidad en una botella para una ingestión.

Con respecto a la "forma de envasado unitario para 1 semana a 3 meses", por ejemplo, se ingiere una vez al día para proporcionar una dosis de ingestión diaria de 300 mg; se encuentran contenidos 50 mg de citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo en un comprimido, y se envasan 42 a 540 comprimidos en cada forma de envasado.

Con respecto a las preparaciones adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, las inyecciones preferentemente comprenden una preparación acuosa esterilizada que contiene citrulina o una sal del mismo y glutatión o una sal del mismo, que es isotónica respecto a la sangre del receptor. En el caso de una inyección, por ejemplo, se prepara una solución para inyección utilizando un portador que contiene una solución salina, una solución de glucosa, o una mezcla de una solución salina y una solución de glucosa.

Asimismo pueden utilizarse en estas preparaciones parenterales uno o más componentes auxiliares seleccionados de entre los antisépticos, conservantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes, ligantes, surfactantes, plastificadores y similares anteriormente indicados para preparaciones orales.

Las concentraciones de citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo en el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición se determinan apropiadamente según el tipo de preparación, el efecto esperado de la administración de la preparación o similar. La citrulina o una sal de la misma habitualmente se encuentra contenida en una cantidad de 0,1% a 90% en peso, preferentemente de 0,5% a 70% en peso, particularmente preferentemente de 1% a 50% en peso. El glutatión o una sal del mismo habitualmente se encuentra contenido en una cantidad de 0,1% a 90% en peso, preferentemente de 0,5% a 70% en peso, particularmente preferentemente de 1% a 50% en peso.

La dosis de administración y la frecuencia de administración del agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición varían dependiendo de la forma de administración, la edad y peso corporal del paciente, y las características o gravedad de los síntomas que deben tratarse. Habitualmente, el agente se administra una a varias veces al día en una cantidad que proporcione una dosis diaria de 50 mg a 30 g, preferentemente de 100 mg a 10 g, particularmente preferentemente de 200 mg a 3 g por adulto en términos de citrulina o una sal de la misma. Además, el agente se administra una a varias veces al día en una cantidad que

proporcione una dosis diaria de 50 mg a 30 g, preferentemente de 100 mg a 10 g, particularmente preferentemente de 200 mg a 3 g por adulto en términos de glutatión o una sal del mismo.

5 El periodo de ingestión o administración no se encuentra particularmente limitado, aunque es generalmente de 1 día a 1 año, preferentemente de 1 semana a 3 meses.

10 El agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición puede utilizarse para proteger las células neuronales del cerebro. El agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición puede utilizarse para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral que se desarrolla a partir de la muerte de células neuronales cerebrales. Entre los ejemplos de los efectos esperados de la prevención o mejora del deterioro de la función cerebral se incluye la prevención o mejora de: la capacidad de percepción disminuida, la capacidad de aprendizaje de memoria disminuida, la capacidad de pensamiento disminuida, la concentración disminuida, la atención disminuida, la capacidad de juicio disminuida, la depresión, la función cognitiva disminuida y el rendimiento en el ejercicio disminuido causados de esta manera.

15 Por lo tanto, el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral de la presente exposición se administra en un sujeto que necesita prevenir la incidencia de dichos síntomas o un sujeto que presenta dichos síntomas, previniendo o mejorando de esta manera los síntomas.

20 Además, en la presente exposición, la citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo pueden utilizarse para fabricar el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral.

25 Además, la presente exposición incluye un método para proteger las células neuronales cerebrales. El método de la presente exposición comprende la etapa de ingerir o administrar citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo en un sujeto que necesita proteger las células neuronales cerebrales, en cantidades suficientes para proteger las células neuronales cerebrales del sujeto.

30 Además, la presente exposición incluye un método para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral. El método de la presente exposición incluye la etapa de ingerir o administrar citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo en un sujeto que necesita prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral, en cantidades suficientes para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral del sujeto.

35 A continuación, en la presente memoria, se describen los ejemplos experimentales referidos a la citrulina y el glutatión para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral.

Ejemplo experimental: ratones C57BL/6J macho de 10 semanas de edad (CLEA Japan, Inc., de aproximadamente 25 g de peso corporal medio por ratón) se aclimataron preliminarmente durante 1 semana y se proporcionaron para los experimentos. Se obtuvo citrulina y glutatión de KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.

40 Los ratones C57BL/6J fueron divididos en un grupo de operación simulada (Grupo 1) y un grupo de oclusión de las arterias carótidas comunes bilaterales, la cual se llevó a cabo bajo anestesia de halotano durante 20 minutos. Un día después de la reperusión, el grupo de oclusión de las arterias carótidas comunes bilaterales se dividió adicionalmente en un grupo tratado con agua destilada (Grupo 2), un grupo tratado con dosis baja de citrulina (40 mg/kg: Grupo 3), un grupo tratado con dosis baja de glutatión (40 mg/kg: Grupo 4), un grupo tratado con dosis alta de citrulina (100 mg/kg: Grupo 5), un grupo tratado con dosis alta de glutatión (100 mg/kg: Grupo 6) y un grupo de tratamiento de combinación de dosis baja de citrulina y dosis baja de glutatión (cada uno 40 mg/kg: Grupo 7). Cada muestra se administró por vía oral durante 12 días. Una semana después de iniciar la administración, se examinaron los efectos de mejora del aprendizaje de memoria mediante una prueba de laberinto en Y, una prueba de evitación pasiva y una prueba de reconocimiento de objetos nuevos. Tras evaluar las funciones de aprendizaje de memoria, se extirpó el hipocampo y se evaluó la viabilidad de las células nerviosas hipocámpicas.

Prueba de laberinto en Y

55 En la prueba del laberinto en Y, se utiliza un aparato de laberinto en Y con tres brazos (50x16x32 cm). Los ratones se introdujeron en uno cualquiera de los brazos del laberinto en Y y se dejó que explorasen libremente el laberinto durante 8 minutos. Se registró la secuencia de entradas en los brazos. Se contó el número de entradas a cada brazo durante el periodo de mediciones, que se definió como el número total de entradas. De ellas, se examinó la entrada sucesiva en los tres brazos diferentes, y se definió este número como el número de comportamiento de alternancia espontánea. El número de comportamiento de alternancia espontánea se dividió por (número total de entradas en brazo menos dos) y después se multiplicó por 100, que se definió como la tasa de comportamiento de alternancia espontánea (Alternancia) y se utilizó como índice del comportamiento de alternancia espontánea.

60 Tal como se muestra en la figura 1, se observó una alternancia significativamente baja en el Grupo 2 en comparación con el Grupo 1. En comparación con el Grupo 2, se observó una alternancia notablemente elevada en el Grupo 7, que es una combinación de Grupo 3 y Grupo 4, en cada uno de los cuales no podía mejorarse la alternancia. Se identificó un efecto notablemente mejorado de comportamiento de memoria en el Grupo 7,

equivalente a los del Grupo 5 y del Grupo 6.

Prueba de evitación pasiva

5 La prueba de evitación pasiva se llevó a cabo utilizando una caja que consistía en unos compartimientos oscuro (25x25x25 cm) e iluminado (14x10x25 cm) y estando provistos de un aparato de estimulación eléctrica en el fondo del compartimiento oscuro. Durante el entrenamiento, tan pronto como entraba el ratón en el compartimiento oscuro desde el compartimiento iluminado, se cerraba la puerta y se administraba una estimulación eléctrica (0.3 mA durante 2 segundos). Veinticuatro horas después del entrenamiento, se introdujo el ratón nuevamente en el
10 compartimiento iluminado y se registró el tiempo de latencia transcurrido en el compartimiento iluminado con una latencia máxima de 300 segundos.

Tal como se muestra en la figura 2, se observó un tiempo de latencia significativamente bajo en el Grupo 2 en comparación con el Grupo 1. En comparación con el Grupo 2, se observó un tiempo de latencia significativamente
15 alto en el Grupo 7, que es un grupo de combinación de Grupo 3 y Grupo 4, en cada uno de los cuales no pudo mejorarse el tiempo de latencia. Se identificó un efecto notablemente mejorado de comportamiento de memoria en el Grupo 7, equivalente a los del Grupo 5 y del Grupo 6.

Prueba de reconocimiento de objetos nuevos

20 La prueba de reconocimiento de objetos nuevos se llevó a cabo después de aclimatar individualmente los ratones al aparato de campo abierto (35x25x35 cm) durante 2 días. Durante el entrenamiento, se permitió la exploración libre de los ratones durante 10 minutos en un aparato en el que se introdujeron simétricamente dos objetos idénticos. Tras 1 hora, se sustituyó un objeto por un objeto nuevo y se permitió la exploración libre de los ratones
25 durante 5 minutos. Se definió exploración de objeto como colocarse sobre los objetos, tocar el objeto con el hocico u olfatear el objeto desde una distancia de 1 cm del objeto. Se calculó una proporción de frecuencia de exploración del objeto familiar o nuevo respecto a la frecuencia de exploración total, y se utilizó como índice de memoria de reconocimiento visual.

30 Tal como se muestra en la figura 3, el incremento de la frecuencia de exploración del objeto nuevo observado en el Grupo 1 no se observó en el Grupo 2. Se observó un incremento significativo de la frecuencia de exploración del objeto nuevo en el Grupo 7, que es un grupo de combinación de Grupo 3 y Grupo 4, en cada uno de los cuales no podía incrementarse la frecuencia de exploración de objeto nuevo. Se identificó un efecto notablemente
35 mejorado de comportamiento de memoria en el Grupo 7, equivalente a los del Grupo 5 y del Grupo 6.

Evaluación de la viabilidad de las células nerviosas hipocámpicas

40 Doce días después de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes, se anestesiaron los ratones con pentobarbital sódico y se perfundieron con tampón de fosfato (PBS, pH 7.4) helado hasta extraer por completo la sangre en el cuerpo. Inmediatamente después se perfundieron los ratones con una solución fijadora que contenía paraformaldehído al 4%. Los tejidos cerebrales se fijaron a 4°C durante 24 horas y se prepararon secciones coronales de 50 µm de grosor. Se tiñeron secciones en serie que contenían el hipocampo con yoduro de propidio (PI, 5 µmoles/l) disuelto en PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las células nerviosas supervivientes y no supervivientes en la capa de células piramidales CA1 del hipocampo se contaron en la zona
45 1.4 a 1.8 mm posterior al bregma, y las células con núcleos positivos para PI y características morfológicas típicas se definieron como células nerviosas supervivientes. Se calculó la viabilidad celular a partir de la proporción entre el número medio de células nerviosas supervivientes en el Grupo 1.

50 Tal como se muestra en la figura 4, se observó una reducción significativa de la viabilidad de las neuronas hipocámpicas en el Grupo 2 en comparación con el Grupo 1. En comparación con el Grupo 2, se observó una viabilidad significativamente elevada de las células nerviosas hipocámpicas en el Grupo 7, que es una combinación de Grupo 3 y Grupo 4, en cada uno de los cuales no podía mejorarse la viabilidad de las células nerviosas hipocámpicas. Se identificó un efecto de protección de las células nerviosas en el Grupo 7, equivalente al del Grupo
55 5 y Grupo 6.

Globalmente se clarificó que el comportamiento de memoria puede mejorarse sinérgica y eficazmente mediante la utilización de citrulina en combinación con glutatión, sugiriendo que el agente de la presente invención resulta excelente en la prevención o la mejora del deterioro de la función cerebral.

60 A continuación, en la presente memoria, se describen los ejemplos de la presente invención.

[Ejemplo 1]

Preparación de comprimido que contiene citrulina y glutatión

65 Se granularon 120 kg de L-citrulina, 120 kg de glutatión reducido, 19 kg de oligosacárido cíclico, 57 kg de celulosa

y 1 kg de pululano utilizando un secador granulador de lecho fluido. El producto granulado obtenido de esta manera y 3 kg de estearato de calcio se mezclaron utilizando un mezclador cónico y se moldearon por compresión en un aparato de moldeo por compresión giratoria, proporcionando comprimidos.

5 **[Ejemplo 2]**

Preparación de comprimido entérico que contiene citrulina y glutatión

10 La superficie del comprimido preparado en el ejemplo 1 se recubrió con una solución de shellac, proporcionando comprimidos entéricos.

[Ejemplo 3]

Preparación de cápsula entérica que contiene citrulina y glutatión

15 Se mezclaron 120 kg de L-citrulina, 120 kg de glutatión reducido, 19 kg de oligosacárido cíclico, 57 kg de celulosa, 3 kg de estearato de calcio y 1 kg de pululano utilizando un mezclador cónico. Se mezclaron 20 kg de la mezcla obtenida y 0.2 kg de dióxido de silicio y se agitaron. La mezcla obtenida se alimentó a un aparato rellenedor de cápsulas y se utilizó para rellenar cápsulas duras, proporcionando cápsulas duras. La superficie de las cápsulas duras obtenidas se recubrió con una solución de zeína, proporcionando cápsulas entéricas.

[Ejemplo 4]

Preparación de bebida que contiene citrulina y glutatión (1)

25 Se disolvieron 1.28 kg de L-citrulina, 1.28 kg de glutatión oxidado, 3 kg de eritritol, 0.05 kg de ácido cítrico, 3 g de edulcorante artificial y 0.06 kg de saborizante en 50 l de agua a 70°C bajo agitación, y se ajustó el pH de la solución a pH 3.3 con ácido cítrico. La mezcla se esterilizó mediante esterilización de placas y se utilizó para llenar una botella. A continuación, se esterilizó la botella en un pasteurizador, proporcionando una bebida.

30

[Ejemplo 5]

Preparación de bebida que contiene citrulina y glutatión (2)

35 Se mezclaron 20 mg de L-citrulina, 20 mg de glutatión oxidado, 20 mg de L-arginina, una cantidad apropiada de jarabe de fructosa-glucosa, sal, ácido cítrico, saborizante, citrato de Na, lactato de Ca, pirofosfato férrico, gluconato de Ca, cloruro de K, cloruro de Mg y un edulcorante, proporcionando 555 ml de bebida.

[Ejemplo 6]

40

Preparación de bebida que contiene citrulina y glutatión (3)

45 Se mezclaron 100 mg de L-citrulina, 100 mg de glutatión oxidado, 100 mg de L-arginina, 2.5 mg de L-alanina, 2.5 mg de L-glicina, 2.5 mg de L-leucina, 1.3 mg de L-isoleucina, 1.3 mg de L-valina y una cantidad apropiada de un saborizante y un edulcorante, proporcionando 300 ml de bebida.

50 La presente solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa nº 2010-290444, presentada el 30 de octubre de 2012, cuyo contenido en su totalidad se incorpora en la presente memoria como referencia. Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan en su totalidad.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se proporciona un agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral, tal como la capacidad de percepción disminuida, la capacidad de aprendizaje de memoria disminuida, la capacidad de pensamiento disminuida, la concentración disminuida, la atención disminuida, la capacidad de juicio disminuida, la depresión y el rendimiento de ejercicio disminuido así causado, que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo como principios activos. Según el agente de la presente invención, el comportamiento de memoria puede mejorarse sinérgica y eficazmente mediante la utilización de citrulina o una sal de la misma en combinación con glutatión o una sal del mismo, y puede obtenerse un efecto excelente como el agente para prevenir o mejorar el deterioro de la función cerebral.

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente para la utilización en la protección de las células neuronales cerebrales de la muerte celular, que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo como principios activos.
- 10 2. Agente para la utilización en la prevención o la mejora del deterioro de la función cerebral, que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo como principios activos, en el que el deterioro de la función cerebral es uno o más seleccionados de entre el grupo que consiste en capacidad de percepción disminuida, capacidad de aprendizaje de memoria disminuida, capacidad de pensamiento disminuida, concentración disminuida, atención disminuida, capacidad de juicio disminuida, depresión y rendimiento de ejercicio disminuido así causado.
- 15 3. Agente para la utilización según la reivindicación 2, en el que la utilización comprende ingerir oralmente citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo.
- 20 4. Agente para la utilización según la reivindicación 2, en el que la utilización comprende ingerir una preparación oral que comprende citrulina o una sal de la misma y glutatión o una sal del mismo.
- 25 5. Citrulina o sal de la misma y glutatión o sal del mismo para la utilización en la protección de las células neuronales cerebrales de la muerte celular.
6. Citrulina o sal de la misma y glutatión o sal del mismo para la utilización en la prevención o la mejora del deterioro de la función cerebral, en los que el deterioro de la función cerebral es uno o más seleccionados de entre el grupo que consiste en capacidad de percepción disminuida, capacidad de aprendizaje de memoria disminuida, capacidad de pensamiento disminuida, concentración disminuida, atención disminuida, capacidad de juicio disminuida, depresión y rendimiento de ejercicio disminuido así causado.

Fig. 1

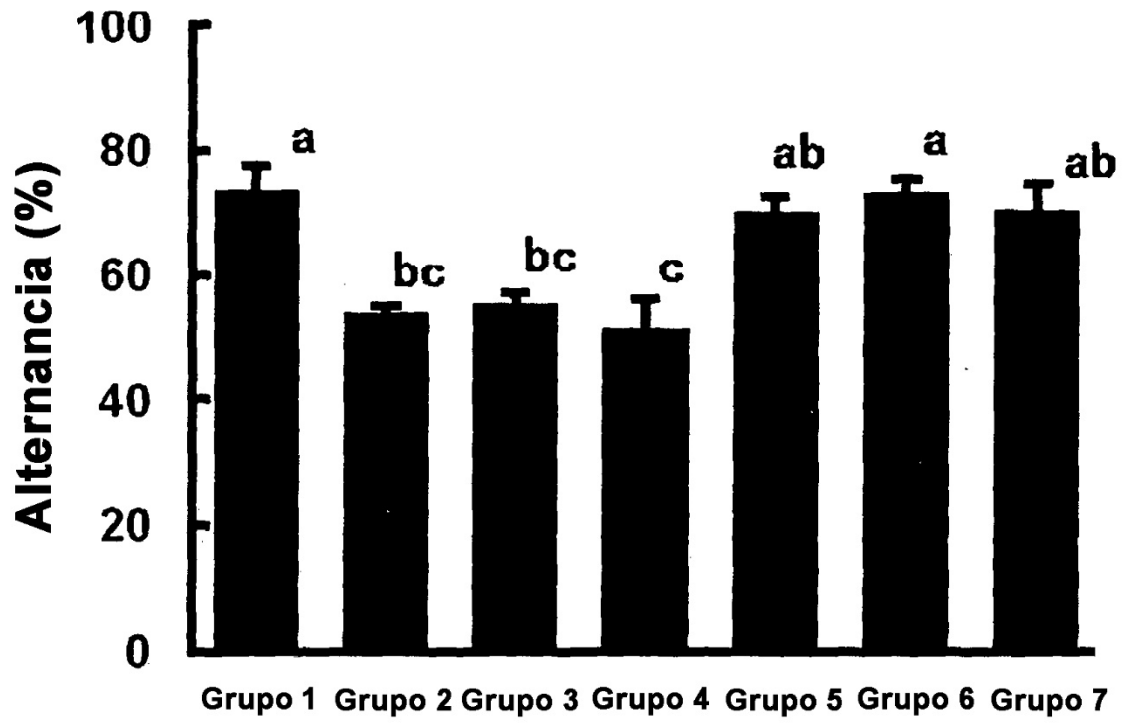


Fig. 2

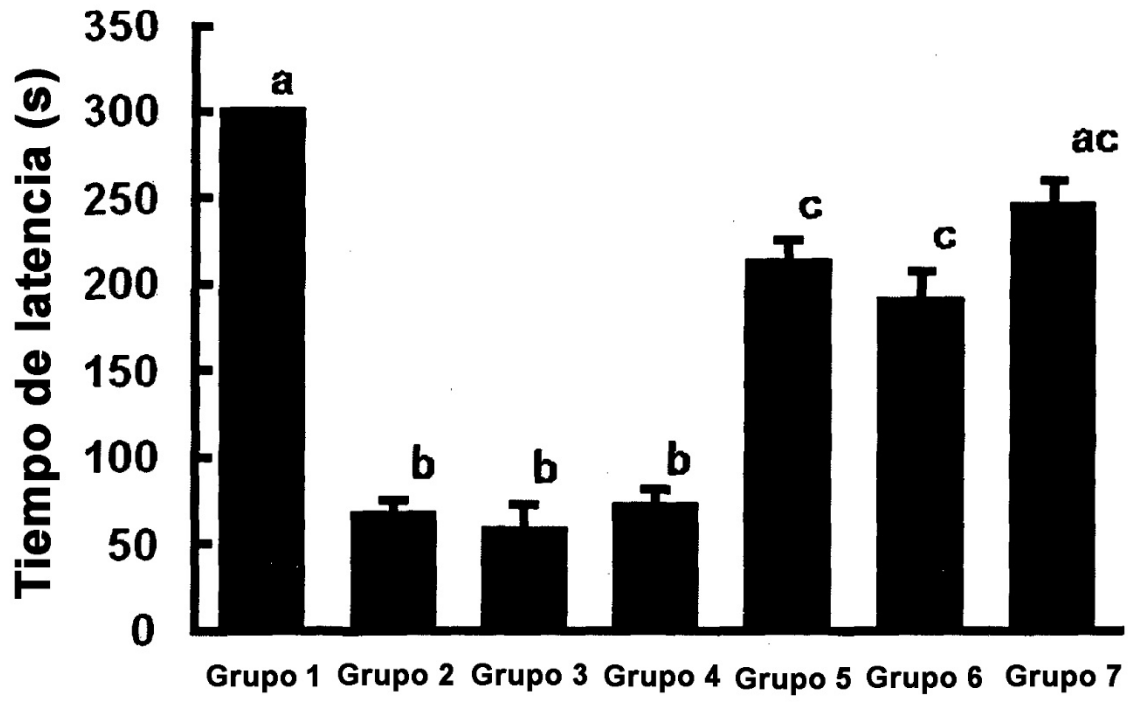


Fig. 3

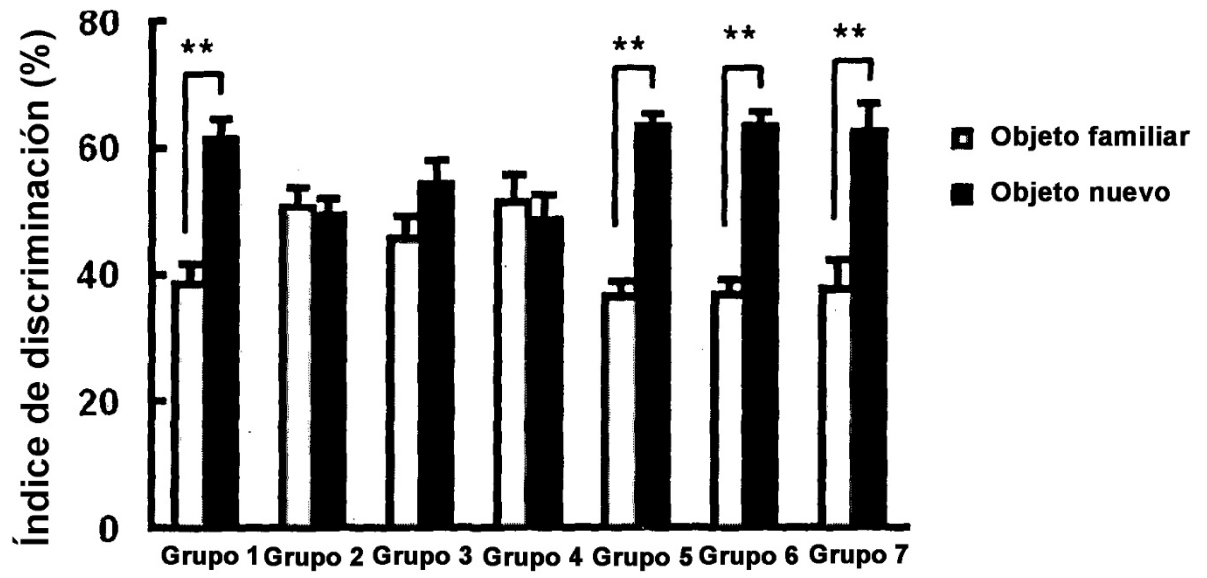


Fig. 4

