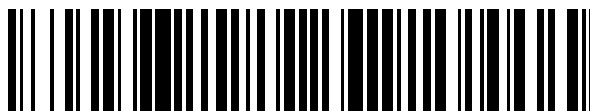


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 308**

51 Int. Cl.:

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2015** **E 15382272 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3095451**

54 Título: **Proceso para preparar un extracto de cerebro de un animal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2020

73 Titular/es:

BIOIBERICA, S.A. (100.0%)
7, plaza Francesc Macia
08029 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

ESCAICH FERRER, JOSEP;
MARTÍNEZ PUIG, DANIEL;
DALMAU CASTAÑARES, PERE;
RUHÍ ROURA, RAMÓN;
GUIX SALICHS, JOAQUIMA;
RIBAS MAYNOU, JOSEP;
ALFOCEA EGÜÉN, ARTUR;
GARCÍA PEDROSA, ANTONIO;
MORALES GARCÍA, PURIFICACIÓN;
LEÓN MARTÍN, PERE y
BADIAS EROLES, MARTA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 750 308 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

Proceso para preparar un extracto de cerebro de un animal

5 Campo de la técnica

La presente invención pertenece al campo de la preparación de extractos a partir de materiales biológicos y al uso de los mismos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sistema nervioso central.

10 Estado de la técnica

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de enfermedades de causa desconocida que afectan al sistema nervioso, y que tienen como característica común el curso progresivo de los síntomas, reflejo de la desintegración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso. Entre las enfermedades neurodegenerativas que afectan a las personas, se encuentran la enfermedad de Alzheimer, la ataxia de Friedreich, la epilepsia, la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, o el ictus.

Las enfermedades neurodegenerativas no tienen un tratamiento etiológico y las actuaciones terapéuticas son sintomáticas en algunos casos y paliativas en todos ellos. Generan discapacidad y un padecimiento físico y psíquico elevado entre quienes las padecen y entre sus familiares.

Las repercusiones socioeconómicas son muy importantes, pues al propio proceso de la enfermedad hay que sumar el impacto psíquico, la merma en la calidad de vida, la incapacidad laboral, la pérdida de habilidades sociales, la carga física y psíquica de los cuidadores de estos pacientes y el elevado gasto económico que conlleva la atención social y sanitaria de todas estas personas.

En el estado de la técnica se han descrito medicamentos para prevenir y/o tratar dichas enfermedades. Por ejemplo, para el tratamiento de los síntomas de grado leve a moderado de la enfermedad de Alzheimer se emplean inhibidores de colesterasa como galantamina, rivastigmina y donepezilo, y para el tratamiento de los síntomas de grado moderado a severo de la misma se emplea memantina, un antagonista del N-metil-D-aspartato. Dichos medicamentos pueden provocar efectos secundarios como mareo, dolores de cabeza, estreñimiento, náusea, vómitos, pérdida de peso, o debilidad muscular.

También se ha descrito el empleo de composiciones nutracéuticas y dietéticas que comprenden componentes neurológicos como adyuvantes para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, o como potenciadores de la salud del sistema nervioso. Entre los componentes neurológicos se encuentran, por ejemplo, glicerofosfolípidos como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI); esfingofosfolípidos como esfingomielinas y ceramidas; esfingoglicolípidos como gangliósidos, cerebrosidos, y sulfátidos.

En este sentido se han descrito diferentes procedimientos para obtener dichos componentes neurológicos con diferentes grados de pureza o como mezcla de los mismos a partir de materiales biológicos como, por ejemplo, órganos de diversos animales, leche, nueces, cereales, u hongos.

En la patente británica GB1256755 se describe un extracto de mitocondria de cerebro, que es apropiado para el tratamiento o la prevención de trastornos cerebrales, especialmente aquellos que afectan al grado de conciencia y el edema cerebral. El extracto se obtiene mediante una secuencia de centrifugaciones a diferentes velocidades de un cerebro homogeneizado en una solución acuosa que comprende manitol y EDTA, y que se encuentra ajustada a un pH de 7,4.

En la solicitud de patente japonesa JP-A-1016795 se describen extractos de cerebro bovino preparados a partir de la extracción con sulfato amónico acuoso. Con este procedimiento se obtienen fracciones de proteínas, de fosfolípidos y de esfingolípidos. En la solicitud de patente rusa RU-A-1994012010 se describe un procedimiento para extraer el cerebroso nervona de un cerebro porcino. La extracción se efectúa con acetona, el filtrado es precipitado con etanol, y el producto final se purifica por lavado con acetona.

En la solicitud de patente china CN-A-85102590 se describe un procedimiento para obtener un extracto de gangliósidos de cerebro, en el que se emplea una resina adsorbente para separar el producto activo. En la solicitud de patente china CN-A-1522752 se describe el uso de dicho extracto para el tratamiento de trastornos neurológicos del cerebro. En la solicitud de patente china CN-A-1596733 se describe un procedimiento para la preparación de un extracto de cerebro porcino o bovino, que comprende la trituración de los cerebros, el tratamiento de los mismos con una combinación de enzimas, hidrólisis con ácido clorhídrico, neutralización y liofilización. Según la descripción, dicho extracto es apropiado para mejorar el estado nutricional del cuerpo y la regulación del funcionamiento del cerebro.

En la solicitud de patente china CN-A-1771992 se describe un extracto de cerebro de un mamífero que comprende polipéptidos, lisina, ácido glutámico, y azúcar. Según la descripción, dicho extracto es apropiado para regular y mejorar el metabolismo cerebral, así como para el tratamiento de enfermedades vasculares.

En la patente española ES540861 se describe un método para extraer gangliósidos que comprende la homogeneización del cerebro de un animal porcino, bovino u ovino, en una solución de metanol y agua, en presencia de un tensioactivo, una purificación a través de una columna, y una desalinización final del extracto a través de una columna.

- 5 En la solicitud de patente internacional WO-A-2010/007620 se describe un extracto de cerebro porcino que incluye una mezcla de péptidos y proteínas con un peso molecular de al menos 5000 Da. También se describe el uso del mismo como protector de las células musculares y neuronas frente a la hipoxia y apoptosis.

10 En el artículo Jittiwat et al., Porcine Brain Extract Attenuates Memory Impairments Induced by Focal Cerebral Ischemia, Am. J. Applied, Sci., 2009, 6(9), 1662-1668, se describe un extracto de cerebro porcino que comprende una mezcla de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, y su uso como neuroprotector. En el artículo Thukham-Mee et al., Neuroprotective Effect against Alzheimer's Disease of Porcine Brain Extract, Am. J. Applied, Sci., 2012, 9(5), 700-708, se describe el uso del mismo extracto como suplemento dietético o adyuvante contra la enfermedad de Alzheimer y otras alteraciones cognitivas debidas al envejecimiento.

15 En la solicitud de patente internacional WO-A-2006/114790 se describen mezclas de lípidos polares obtenidas a partir de materiales diferentes del cerebro. Dichas mezclas contienen PC, PE, PS, PI, y esfingofosfolípidos como esfingomielina, y se describe el uso de las mismas como complemento alimentario.

20 En la solicitud de patente europea EP-A-2309854 se describe un procedimiento para preparar esfingomielina de alta pureza, que comprende la extracción de la fracción total de lípidos de un material biológico con una mezcla de un hidrocarburo alifático y una cetona hidrosoluble para obtener una fracción insoluble que contiene esfingomielina, que es purificada por tratamiento con una fosfolipasa.

25 También se encuentran disponibles comercialmente extractos lipídicos obtenidos a partir de diferentes fuentes naturales, tanto vegetales como animales.

La compañía Avanti Polar Lipids, Inc. comercializa, entre otros productos, diversos extractos naturales de huevo, corazón, cerebro, hígado, soja, levadura, y E. coli. Entre ellos se encuentra un extracto lipídico completo de cerebro, que es obtenido por extracción con una mezcla de cloroformo y metanol, y que contiene un 26% en peso de PC, un 10,6% en peso de PS, un 1,6% en peso de PI, un 16,7% en peso de PE, un 2,8% en peso de ácido fosfatídico, y un 58,7% en peso de compuestos no identificados. También un extracto de lípidos polares de cerebro que se obtiene a partir del extracto lipídico completo por precipitación con acetona, y extracción del precipitado obtenido con éter dimetilico. Según la información técnica, contiene un 12,6% en peso de PC, un 18,5% en peso de PS, un 33,1% en peso de PE, un 4,1% en peso de PI, un 0,8% en peso de ácido fosfatídico y un 30,9% en peso de compuestos no identificados.

40 A pesar de las soluciones descritas en el estado de la técnica, persiste la necesidad de disponer de nuevos procedimientos, fácilmente implementables a escala industrial, para preparar extractos con combinaciones específicas de componentes neurológicos para ser empleados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y como potenciadores de la salud del sistema nervioso.

Objeto de la invención

45 El objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar un extracto de cerebro de un animal.

Otro aspecto de la invención un extracto de cerebro obtenible de acuerdo con dicho procedimiento.

Otro aspecto de la invención una composición que comprende dicho extracto.

50 Otro aspecto de la invención dicho extracto para uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención el uso de dicho extracto para la preparación de composiciones.

Figuras

55

Figura 1

En la figura 1 se presenta un esquema de una forma de realización preferida del procedimiento de la invención.

Figura 2

60 En la figura 2.1 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de la alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y expuestos en la TABLA V del Ejemplo 3A. Con dicho ensayo se valora la memoria operativa espacial. En abscisas se encuentran los grupos de tratamiento, y en ordenadas se representa el valor medio de porcentaje de alternancia (** p < 0.001 vs. el grupo control tratado con vehículo y Sc.Aβ; ### p < 0.001 vs. el grupo tratado con vehículo y Aβ₂₅₋₃₅; test de Dunnett).

65

En la figura 2.2. se muestran los resultados correspondientes al ensayo de la alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y expuestos en la TABLA VI del ejemplo 3A. Con dicho ensayo se valora la memoria operativa espacial. En abscisas se encuentran los grupos de tratamiento, y en ordenadas se representa el valor medio de la diferencia respecto al grupo control tratado con vehículo y Sc.A β (grupo 1) del porcentaje de alternancia para el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅ (grupo 2), el grupo tratado con el extracto de la invención (grupo 3), el grupo tratado con un extracto que comprende DHA (grupo 8), y el grupo tratado con el extracto de la invención y el extracto que comprende DHA (grupo 11). Las diferencias entre los grupos 2 y 3 no son significativas, mientras que los grupos 8 y 11 son diferentes de forma significativa entre ellos y con respecto a los otros dos grupos (** p < 0.01 vs. el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅; ## p < 0.01 vs. el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅ y con el grupo 8; test de Tukey).

Figura 3

En la figura 3 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de evitación pasiva expuestos en la TABLA VIII del Ejemplo 3A. Con este ensayo se valora la memoria a largo plazo contextual. En abscisas se encuentran los grupos de tratamiento, y en ordenadas el valor medio del tiempo de latencia de paso a través (figura 3.1) y el tiempo de latencia de escape (figura 3.2), ambos expresados en segundos (* p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. el grupo control tratado con vehículo y Sc. A β ; # p < 0.05, ### p < 0.001 vs. el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅; test de Dunnett).

Figura 4

En la figura 4 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de peroxidación de lípidos expuestos en la TABLA IX del ejemplo 3A. En ordenadas se representan los grupos de tratamiento, y en abscisas el valor medio de los equivalentes de CHP por peso de tejido húmedo (ECHP) (** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. el grupo control tratado con vehículo y Sc. A β ; ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅; test de Dunnett).

Figura 5

En la figura 5 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de citoquinas proinflamatorias expuestos en la TABLA XI del ejemplo 3B. En ordenadas se representan los grupos de tratamiento, y en abscisas el valor medio expresado en pg/ml para cada una de las citoquinas IL1 β (figura 5.1), IL6 (figura 5.2) y TNF α (figura 5.3) (** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. el grupo control tratado con vehículo y Sc. A β ; ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. el grupo tratado con vehículo y A β ₂₅₋₃₅; test de Dunnett). El resultado del grupo 1 de control se toma como base 100, y el resto de grupos se refieren al mismo.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar un extracto de cerebro de un animal donde el animal no es un humano que comprende:

- 1) someter cerebros triturados a una extracción con una mezcla de etanol:agua o con una mezcla de cloroformo:metanol y separar la fracción líquida, denominada L1,
- 2) destilar el disolvente de la fracción líquida L1, y precipitar con acetona para obtener la fracción sólida, denominada S2,
- 3) saponificar la fracción sólida S2, descartar los productos resultantes de la saponificación solubles en acetona, y obtener la fracción sólida, denominada S3.

Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo procedimiento para preparar un extracto de cerebro, en particular de un animal porcino, que destaca por su simplicidad y facilidad para su implementación industrial. Dicho extracto es apropiado para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sistema nervioso central, puesto que el mismo es capaz de prevenir los déficits de la memoria operativa y de la memoria a largo plazo, y también proporciona una actividad neuroprotectora al reducir los niveles de peroxidación lipídica y de citoquinas proinflamatorias.

En la presente descripción, así como en las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una”, y “el” o “la” incluyen la referencia plural al menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el contexto de la invención, el término “lípidos no polares” se refiere a compuestos lipídicos no solubles en agua y solubles en acetona, como, por ejemplo, colesterol.

En el contexto de la invención, el término “lípidos polares complejos” compuestos lipídicos que incluyen en su estructura un enlace amida con un resto de un ácido graso, como, por ejemplo, esfingomielinas, gangliósidos, ceramidas, y sulfátidos.

En el contexto de la invención, se entiende por “fosfolípidos” aquellos compuestos lipídicos que incluyen en su estructura la glicerina fosfatada y restos de ácidos grasos unidos mediante grupos éster, como, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina.

Procedimiento

El procedimiento de la invención para preparar el extracto de cerebro de un animal es un procedimiento simple que permite la obtención de un extracto con un perfil específico de lípidos polares complejos que le confiere unas notables características neuroprotectoras, tal como se expone más adelante.

En el procedimiento de la invención se emplean cerebros de animales mamíferos como materia prima, preferiblemente de origen porcino, bovino u ovino, y más preferiblemente de origen porcino.

5 En el procedimiento de la invención se emplean cerebros triturados. Los cerebros se pueden triturar mediante procedimientos bien conocidos por el experto.

Extracción de lípidos polares complejos y fosfolípidos

10 En el procedimiento de la invención se lleva a cabo una extracción de los cerebros triturados mediante el empleo de una mezcla de etanol:agua, generalmente en una proporción comprendida entre 80:20 y 60:40 expresada en (v/v), preferiblemente entre 75:25 y 65:35, y más preferiblemente 70:30. Alternativamente, la extracción se lleva a cabo mediante el empleo de una mezcla de cloroformo:metanol en una proporción comprendida entre 70:30 y 60:40, más preferiblemente entre 68:42 y 65:45, y más preferiblemente 66:33. Dicha extracción generalmente se efectúa bajo agitación a una temperatura comprendida entre 40° C y 70° C, preferiblemente entre 50° C y 65° C, y más preferiblemente entre 55° C y 60° C, durante un tiempo mínimo de 4 h, preferiblemente un mínimo de 6 h, y más
15 preferiblemente un mínimo de 8 h. En esta extracción se descarta el residuo sólido, y se continúa el procedimiento de la invención con la fracción líquida, que se denomina L1.

Dicho procedimiento de extracción con la mezcla de etanol:agua o cloroformo:metanol se puede repetir varias veces. En este caso, se reúnen los sobrenadantes de las diversas extracciones antes de continuar con el procedimiento.
20 Preferiblemente dicha extracción se efectúa al menos un total de dos veces.

El procedimiento de la invención continúa con la fracción líquida L1.

Extracción de lípidos no polares

25 En una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende una etapa previa de desengrasado de los cerebros mediante la extracción con un disolvente seleccionado de entre acetona, hexano, y un fluido supercrítico, como el anhídrido carbónico en condiciones supercríticas. Preferiblemente se emplea acetona.

30 En dicha etapa los cerebros son desengrasados antes de la extracción con una mezcla de etanol agua o cloroformo:metanol mediante una extracción de los cerebros triturados con uno de dichos disolventes. Dicha extracción permite la eliminación sustancial del colesterol y de lípidos no polares.

El procedimiento de la invención comprende preferiblemente una etapa que consiste en someter los cerebros triturados a una extracción con acetona. Tras dicha extracción se descarta la fracción líquida, que comprende sustancialmente
35 colesterol y lípidos no polares, y se continúa el procedimiento de la invención con la fracción sólida desengrasada. En el contexto de la invención se entiende por eliminación sustancial de colesterol que el contenido del mismo no excede del 10% en peso sobre el peso seco de los cerebros triturados y desengrasados, preferiblemente el 5%, y más preferiblemente el 1%.

40 Habitualmente la extracción de los cerebros triturados con el disolvente se repite varias veces hasta conseguir que el contenido de agua de la fase líquida sea inferior al 5% en peso.

Los cerebros triturados y desengrasados se escurren y se secan, generalmente bajo vacío a una temperatura comprendida entre 30° C y 80° C, preferiblemente entre 40° C y 70° C, más preferiblemente entre 50° C y 65° C, y aún
45 más preferiblemente a 60° C.

Así se obtiene la fracción sólida desengrasada en forma de un producto pulverulento que se incorpora al procedimiento de la invención.

50 Destilación del disolvente y precipitación con acetona

El procedimiento de la invención comprende destilar el disolvente o disolventes de la fracción líquida L1, y precipitar con acetona para obtener la fracción sólida S2.

El disolvente proviene de la extracción llevada a cabo en la etapa del procedimiento de la invención mediante el empleo de etanol:agua o cloroformo:metanol.
55

La destilación del disolvente o disolventes se puede llevar a cabo mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, bajo vacío y a una temperatura comprendida entre 50° C y 65° C, y preferiblemente a 60° C.

60 En la precipitación con acetona, generalmente se emplea un volumen de acetona comprendido entre 3 y 5 veces, y preferiblemente 4 veces.

La adición de acetona sobre la solución acuosa, obtenida tras la destilación del etanol, produce la precipitación de los lípidos polares complejos y fosfolípidos en forma de fracción sólida S4. Tras la decantación y eliminación de la fracción líquida, el sólido obtenido se puede lavar con acetona repetidas veces. Generalmente se emplean de 2-4 volúmenes de acetona sobre el sólido, preferiblemente 3 volúmenes, y se mantiene en agitación un tiempo aproximadamente
65

comprendido entre 20 min y 1 h, preferiblemente 30 min, a temperatura ambiente. En cada lavado con acetona, se desecha el sobrenadante y se conserva la fracción sólida que contiene los lípidos polares complejos y fosfolípidos. Preferiblemente dicha fracción sólida se seca bajo vacío a una temperatura comprendida entre 30° C y 80° C, preferiblemente entre 40° C y 70° C, más preferiblemente entre 50° C y 65° C, y aún más preferiblemente a 60° C. Así se obtiene un sólido en forma de un producto pulverulento, que se denomina fracción sólida S2, que se somete a la saponificación.

El procedimiento de la invención continua con la fracción sólida S2, preferiblemente seca.

Saponificación

La fracción sólida S2 se saponifica. Preferiblemente la saponificación se efectúa con dicha fracción suspendida en agua.

El resultado de la saponificación de la fracción sólida S2 es una mezcla que comprende los lípidos polares complejos, que constituyen sustancialmente el extracto de la invención, y además los compuestos procedentes de la saponificación de los fosfolípidos que se encuentran en dicha fracción sólida, entre ellos los ácidos grasos, eventualmente en forma de jabones.

La saponificación de dicha fracción sólida puede llevarse a cabo mediante procedimientos habituales bien conocidos, como, por ejemplo, la suspensión de la misma en una solución acuosa de un hidróxido alcalino, preferiblemente hidróxido sódico o hidróxido potásico, más preferiblemente hidróxido potásico, a una concentración comprendida entre 0,3 M y 3 M, más preferiblemente entre 0,4 M y 1 M, y más preferiblemente 0,5 M, a una temperatura comprendida entre 30° C y 80° C, preferiblemente entre 40° C y 70° C, más preferiblemente entre 50° C y 65° C, y aún más preferiblemente a 60° C, y durante un período de tiempo comprendido entre 3 h y 12 h, preferiblemente entre 5 h y 10 h, más preferiblemente entre 7 h y 9 h, y aún más preferiblemente 8 h. La saponificación de dicha fracción también puede llevarse a cabo mediante el empleo de enzimas, como las lipasas. En este caso, la saponificación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 50° C y 60° C, preferiblemente a 55° C, y a un pH comprendido entre 5,5 y 6,5, preferiblemente a pH 6.

Preferiblemente la saponificación se lleva a cabo por tratamiento con una solución acuosa de un hidróxido alcalino.

Una vez saponificada la fracción sólida S2 se procede al aislamiento del extracto de la invención.

Aislamiento del extracto de cerebro

El aislamiento del extracto de cerebro de la invención de la mezcla de reacción de saponificación se puede llevar a cabo mediante procedimientos habituales bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede aislar mediante la acidificación de la mezcla de reacción obtenida tras la saponificación, precipitación con acetona, y separación del sólido obtenido, denominada fracción sólida S3, que es el extracto objeto de la invención.

La acidificación se puede llevar a cabo mediante el empleo de un ácido mineral como, por ejemplo, el ácido clorhídrico concentrado, hasta un valor de pH comprendido entre 1 y 3, preferiblemente 2.

La precipitación con acetona se efectúa sobre la suspensión ácida obtenida tras la acidificación. Habitualmente, se añade acetona para precipitar los lípidos polares complejos a razón de entre 3 y 5 volúmenes de acetona con respecto al volumen de la suspensión ácida, preferiblemente 4 volúmenes.

Tras la precipitación con acetona, se puede decantar y desechar el sobrenadante, que comprende los compuestos procedentes de la saponificación de los fosfolípidos, entre ellos los ácidos grasos. Tras la decantación y eliminación de la fracción líquida, el sólido obtenido se puede lavar con acetona repetidas veces. Generalmente se emplean de 2-4 volúmenes de acetona sobre el sólido, preferiblemente 3 volúmenes, y se mantiene en agitación un tiempo aproximadamente comprendido entre 20 minutos y 1 hora, preferiblemente 30 minutos, a temperatura ambiente. En cada lavado con acetona se desecha el sobrenadante y se conserva la fracción sólida que contiene los lípidos polares complejos, que constituyen sustancialmente el extracto de la invención.

El procedimiento de la invención comprende preferiblemente además una etapa de lavado para eliminar las sales que se encuentran en la fracción sólida S3, en el caso de que la saponificación se haya llevado a cabo con un hidróxido alcalino. Esta etapa no es necesaria en el caso de emplear una saponificación enzimática.

La eliminación de las sales de dicha fracción sólida se puede llevar a cabo mediante lavados de dicha fracción sólida con una mezcla de etanol:agua o acetona:agua en una proporción 80:20 (v/v) entre los dos disolventes, hasta que la concentración del anión procedente del ácido empleado en la acidificación sea inferior al 1%, en el caso de que se haya empleado ácido clorhídrico como agente acidificante en la etapa 5) el lavado se continuará hasta que la concentración de ion cloruro sea inferior al 1%.

Después de la eventual eliminación de las sales, el procedimiento de la invención incluye preferiblemente una etapa de secado de la fracción sólida lavada. En dicha etapa de secado se opera generalmente bajo vacío a una temperatura

comprendida entre 30° C y 80° C, preferiblemente entre 40° C y 70°C, más preferiblemente entre 50° C y 65° C, y aún más preferiblemente a 60° C.

De esta forma se obtiene un extracto de cerebro que presenta una composición con un contenido de fosfolípidos y triacilglicéridos inferior al 10%, preferiblemente inferior al 6%, y más preferiblemente inferior al 1%, y que está sustancialmente constituido por lípidos polares complejos como esfingomielinas, gangliósidos, ceramidas y sulfátidos.

El contenido de esfingomielinas está comprendido generalmente entre el 28% y el 43% en peso sobre el peso total del extracto. En el grupo de las esfingomielinas se incluyen también las dihidroesfingomielinas. El contenido de gangliósidos está comprendido generalmente entre el 34% y el 46% en peso sobre el peso total del extracto. En el grupo de los gangliósidos se incluyen los gangliósidos GM1 (monosialotetrahexosilgangliósido), GM2, GM3 (monosialohexosilgangliósido) y GD1. El contenido de ceramidas está comprendido generalmente entre el 12% y el 19% en peso sobre el peso total del extracto. En el grupo de las ceramidas se incluyen las ceramidas, las dihidroceramidas, las glucosilceramidas, y las lactosilceramidas. El contenido de sulfátidos está comprendido generalmente entre el 2% y el 8% en peso sobre el peso total del extracto. El extracto contiene un bajo porcentaje de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolinas, plasmalógenos de fosfatidilcolina, y plasmalógenos de lisofosfaetanol) y triacilglicéridos que habitualmente es inferior al 10%, preferiblemente inferior al 6%, y más preferiblemente inferior al 1% en peso sobre el peso total del extracto. La suma de los porcentajes de los componentes del extracto es igual al 100%.

En una realización preferida, el extracto de la invención se obtiene por un procedimiento que comprende una etapa de saponificación que se lleva a cabo por tratamiento con una solución acuosa de un hidróxido alcalino. En esta realización preferida, el extracto tiene un contenido de esfingomielinas comprendido entre el 30% y el 43% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 32% y el 40%, y más preferiblemente entre el 33% y el 39%. En el grupo de las esfingomielinas se incluyen también las dihidroesfingomielinas. El contenido de gangliósidos está comprendido entre el 36% y el 46% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 38% y el 44%, y más preferiblemente entre el 39% y el 43%. En el grupo de los gangliósidos se incluyen los gangliósidos GM1 (monosialotetrahexosilgangliósido), GM2, GM3 (monosialohexosilgangliósido) y GD1. El contenido de ceramidas está comprendido generalmente entre el 13% y el 19% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 14% y el 18%, y más preferiblemente entre el 15 y el 17%. En el grupo de las ceramidas se incluyen las ceramidas, las dihidroceramidas, las glucosilceramidas, y las lactosilceramidas. El contenido de sulfátidos está comprendido generalmente entre el 2% y el 8% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 3% y el 7%, y más preferiblemente entre el 4% y el 6,5%. El extracto contiene un bajo porcentaje de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolinas, plasmalógenos de fosfatidilcolina, y plasmalógenos de lisofosfaetanol) y triacilglicéridos que es inferior al 3%, preferiblemente inferior al 2%, y más preferiblemente inferior al 1% en peso sobre el peso total del extracto. La suma de los porcentajes de los componentes del extracto es igual al 100%.

En otra realización, el extracto de la invención se obtiene por un procedimiento que comprende una etapa de saponificación que se lleva a cabo por tratamiento enzimático. En esta realización preferida, el extracto tiene un contenido de esfingomielinas comprendido entre el 28% y el 41% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 32% y el 39%, y más preferiblemente entre el 33% y el 37%. En el grupo de las esfingomielinas se incluyen también las dihidroesfingomielinas. El contenido de gangliósidos está comprendido entre el 34% y el 44% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 36% y el 42%, y más preferiblemente entre el 39% y el 41%. En el grupo de los gangliósidos se incluyen los gangliósidos GM1 (monosialotetrahexosilgangliósido), GM2, GM3 (monosialohexosilgangliósido) y GD1. El contenido de ceramidas está comprendido generalmente entre el 12% y el 18% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 14% y el 17%, y más preferiblemente entre el 15 y el 16%. En el grupo de las ceramidas se incluyen las ceramidas, las dihidroceramidas, las glucosilceramidas, y las lactosilceramidas. El contenido de sulfátidos está comprendido generalmente entre el 2% y el 7% en peso sobre el peso total del extracto, preferiblemente entre el 3% y el 6%, y más preferiblemente entre el 4% y el 5%. El extracto contiene un porcentaje reducido de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolinas, plasmalógenos de fosfatidilcolina, y plasmalógenos de lisofosfaetanol) y triacilglicéridos que es inferior al 10%, preferiblemente inferior al 8%, y más preferiblemente inferior al 6% en peso sobre el peso total del extracto. La suma de los porcentajes de los componentes del extracto es igual al 100%.

Otro aspecto de la invención, un extracto de cerebro obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención. Preferiblemente el extracto es obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención que incluye una etapa de saponificación con un hidróxido alcalino.

Composición

Otro aspecto de la invención una composición que comprende el extracto de la invención y al menos un vehículo o excipiente.

La composición de la invención puede ser una composición farmacéutica, un preparado alimenticio, un preparado alimenticio funcional, o un complemento alimenticio.

Una composición farmacéutica es una composición que comprende un principio activo con actividad farmacológica, en este caso el extracto de la invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un preparado alimenticio es una composición destinada al consumo humano que está formada por una matriz como, por ejemplo, leche, preparados lácteos, yogur, queso, zumos, sopas, cereales, pastas, panes, bebidas, o snacks.

Un preparado alimenticio funcional es una composición destinada al consumo humano que comprende componentes que aportan beneficios para la salud como, por ejemplo, ácidos omega-3, estanoles, esteroides, prebióticos, probióticos, antioxidantes, vitaminas o minerales. Dentro de este grupo también se incluyen los alimentos para usos médicos especiales, esto es, alimentos especialmente elaborados o formulados y destinados al manejo dietético de pacientes, incluidos los lactantes, bajo supervisión médica, es decir destinados a satisfacer total o parcialmente las necesidades alimenticias de los pacientes cuya capacidad para ingerir, digerir, absorber, metabolizar o excretar alimentos normales o determinados nutrientes o metabolitos de los mismos sea limitada, o deficiente, o esté alterada, o bien que necesiten otros nutrientes determinados clínicamente, cuyo manejo dietético no pueda efectuarse únicamente modificando la dieta normal.

Un complemento alimenticio es una composición alimenticia cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras, y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias; en donde entre los nutrientes figuran las sustancias siguientes: vitaminas, minerales, extractos botánicos, o extractos de origen animal (terrestre o marino).

El vehículo o excipiente que se incluye en la composición depende del tipo de composición.

En el caso de que sea una composición farmacéutica o un complemento dietético, la composición incluye un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede seleccionarse de entre los que se describen, por ejemplo, en el manual R.C. Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4ª edición, Pharmaceutical Press, Londres, 2003 [ISBN: 0-85369-472-9]. La selección de los mismos depende del tipo de composición farmacéutica a preparar. La preparación de los diferentes tipos de formas farmacéuticas es bien conocida por el experto en la materia y se puede encontrar descrita en, por ejemplo, en el manual Remington The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2000 [ISBN: 0-683-306472].

Preferiblemente la composición de la invención comprende al menos un componente activo adicional apropiado para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o del sistema nervioso central, o potenciadores de la salud del sistema nervioso. Los componentes activos adicionales se pueden seleccionar, por ejemplo, entre el grupo formado por ácidos omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), extractos que los contienen, y sus mezclas, en forma de ácidos o en forma de triglicéridos, selenio, genisteína, vitamina C, vitamina E, vitaminas del grupo B, folato, o ácidos grasos de cadena media.

Más preferiblemente, la composición de la invención comprende un extracto de ácidos omega-3 en forma de triglicéridos que comprende DHA y EPA. Más preferiblemente dicho extracto comprende entre un 40% y un 60% en peso de DHA, aún más preferiblemente un 50% en peso de DHA. En una realización particularmente preferida, la composición comprende extracto de ácidos omega-3 en forma de triglicéridos que comprende un 50% en peso de DHA, un 20 % de EPA, y los ácidos ácido linoléico (C18:3n3), ácido estearidónico (C18:4n3), C20:4n3, C21:5n3 y ácido docosapentaenoico n3 (C22:5n3).

Otro aspecto de la invención el uso del extracto de cerebro para la preparación de una composición seleccionada de entre el grupo formado por una composición farmacéutica, un complemento dietético, un preparado alimenticio, y un preparado alimenticio funcional.

Uso del extracto de cerebro

Otro aspecto de la invención el extracto de cerebro obtenible de acuerdo con el procedimiento de la invención para uso como medicamento, preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o del sistema nervioso central, y como potenciador de la salud del sistema nervioso. Entre las enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente se encuentran la demencia, la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular, la ataxia de Friedreich, la epilepsia, la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, o el ictus, más preferiblemente la enfermedad de Alzheimer.

El extracto de cerebro de la invención se puede administrar por vía oral o parenteral. La dosis a administrar depende del peso del paciente, si bien, generalmente, la dosis diaria se encuentra comprendida entre 500 mg y 5 g.

El extracto de cerebro de la invención se obtiene mediante un procedimiento que se puede implementar fácilmente a escala industrial, sin necesidad de purificaciones largas y tediosas, y además posee unas propiedades neuroprotectoras significativas.

Los ensayos efectuados con un modelo murino con el extracto de cerebro de la invención, y que se exponen en el apartado de Ejemplos, permiten concluir que, sorprendentemente, la administración oral dicho extracto previene los déficits de memoria operativa espacial, así como los déficits de memoria a largo plazo, y presenta además una actividad neuroprotectora al reducir los niveles de peroxidación de lípidos en tejidos del hipocampo, una consecuencia del estrés oxidativo, y una reducción en los niveles de las citoquinas inflamatorias. También se observó que los diferentes tratamientos no produjeron efectos sobre la ganancia de peso en los animales. También se observa que la combinación del extracto de la invención con un extracto que comprende DHA y EPA presenta un efecto sinérgico en los ensayos de alternancia espontánea, por lo que dicha combinación puede resultar apropiada para prevenir déficits de memoria operativa espacial.

A continuación, se incluyen algunos ejemplos para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento para preparar el extracto con saponificación alcalina

Se trituraron cerebros porcinos congelados y se transfirieron al reactor de desengrasado. Se añadió la cantidad de acetona necesaria para conseguir un porcentaje de acetona superior al 90%. Después de una hora de agitación a temperatura ambiente se dejó la suspensión en reposo para su decantación. Se succionó el sobrenadante y se eliminó. Esta operación se repitió hasta que el contenido en agua de la fase líquida fuese inferior al 5%. El producto se escurrió y se secó bajo vacío a una temperatura de 60° C. Se obtuvo un producto pulverulento (Fracción sólida desengrasada).

El producto pulverulento obtenido de la fase anterior se resuspendió en una solución de etanol:agua en una proporción 70:30 en (v/v) y en una proporción 7:1 con respecto al peso de sólido. Se dejó en agitación a una temperatura comprendida entre 55° C y 60° C durante un tiempo mínimo de 8 h. A continuación, se paró la agitación y se dejó en reposo para su decantación. Se separó el líquido sobrenadante por decantación enviándolo a otro reactor.

Se hizo una segunda resuspensión al sólido remanente en el reactor inicial en la misma proporción y se dejó nuevamente en agitación un mínimo de 4 h a una temperatura comprendida entre 55° C y 60° C. A continuación, se paró la agitación y se dejó en reposo para su decantación. Se separó el líquido sobrenadante por decantación enviándolo al reactor que contenía el sobrenadante de la primera extracción. El conjunto de sobrenadantes constituyó la fracción líquida L1.

La solución acuosa después de destilar el etanol se precipitó añadiendo, en agitación, 4 volúmenes de acetona respecto al volumen inicial.

Se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante. Sobre el sólido obtenido se añadieron aproximadamente 3 volúmenes de acetona sobre el sólido y se agitó durante un mínimo de 30 min. Se dejó decantar y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Se escurrió el producto y se secó bajo vacío a una temperatura de 60° C. Así se obtuvo la fracción sólida S2.

El producto sólido obtenido se resuspendió en una solución acuosa de hidróxido potásico 0,5 M a una temperatura de 60° C durante 8 h. Se neutralizó la suspensión con ácido clorhídrico concentrado hasta un valor de pH 2.

El producto se precipitó sobre 4 volúmenes de acetona respecto el volumen inicial. Se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante, que contenía los ácidos grasos procedentes de la saponificación del extracto. Se añadieron aproximadamente 3 volúmenes de acetona sobre el sólido y se agitó durante un mínimo de 30 min. Se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante. Se obtuvo la fracción sólida S3.

Se efectuaron lavados con una solución de etanol:agua en una proporción 80:20 (v/v) hasta que la concentración en cloruros del sobrenadante fue inferior al 1%.

El producto se escurrió y se secó bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 60° C.

Se analizó el producto mediante HPLC, empleando un método basado en el método descrito en Castro-Perez et al., Comprehensive LC-MS E lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients, J. Proteome Res., 2010, 9(5), 2377-89 (doi:10.1021/pr901094j). Erratum in: J. Proteome Res. 2011, 10(7), 3303-8.

La composición del extracto obtenido en diversos lotes expresada en % en peso se muestra en la Tabla I:

TABLA I

Componente	Lote 1	Lote 2
Ceramidas	3,9	3,5

Dihidroceramidas	0,3	0,4
Glucosilceramidas	11,5	12,9
Lactosilceramidas	0,8	0,5
Esfingomielinas	36,6	30,7
Dihidroesfingomielinas	2,3	2,6
Gangliósido (GM3)	1,2	0,6
Gangliósido (GM1)	5,0	12,1
Gangliósido (GM2)	0,4	0
Gangliósido (GD1)	33,4	29,6
Sulfátidos	4,0	6,4
Fosfolípidos y triacilglicéridos	0,6	0,7
Total	100,0	100,0

El extracto obtenido con el procedimiento de la invención presenta el contenido por grupos de productos que se muestra en la Tabla II:

TABLA II

5

Componente	%
Esfingomielinas y dihidroesfingomielinas	30 - 43
Gangliósidos	36 - 46
Ceramidas totales	13 - 19
Sulfátidos	2 - 8
Fosfolípidos y triacilglicéridos	< 1

Se puede observar que el extracto de la invención tiene un contenido elevado en esfingomielinas, gangliósidos y ceramidas, y un contenido bajo de sulfátidos. La presencia de fosfolípidos y triacilglicéridos es significativamente baja.

10 Ejemplo 2: Procedimiento para preparar el extracto con saponificación enzimática

Se repitió substancialmente el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, si bien la etapa de saponificación se llevó a cabo mediante el empleo del enzima Lecitase Ultra (Novozymes), en lugar de emplear hidróxido potásico.

15 La fracción sólida S2 se resuspendió en agua en una proporción 1/60 (p/v) sólido/agua. Se reajustó el pH a 6 y se calentó a 55° C, con lo que se obtuvo una suspensión homogénea. Se añadió a dicha suspensión, bajo agitación, el enzima Lecitase Ultra a la suspensión a razón de 0,2L de enzima por cada kg de la fracción sólida S2.

La suspensión se mantuvo bajo agitación y a la temperatura de 55° C durante 6 h. Se controló el pH a fin de mantenerlo a un valor de 6.

20 Pasadas las 6 h se calentó la suspensión a 75° C y se mantuvo a esta temperatura durante una hora. Posteriormente se bajó el pH a 2 mediante la adición de ácido clorhídrico.

25 El producto se precipitó sobre 4 volúmenes de acetona respecto el volumen inicial. Se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante, que contenía los ácidos grasos procedentes de la saponificación del extracto.

Se añadieron aproximadamente 3 volúmenes de acetona sobre el sólido y se agitó durante un mínimo de 30 min. Se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante. Se obtuvo la fracción sólida S3.

El producto se escurrió y se secó bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 60° C.

Se obtuvo un extracto con una composición sustancialmente análoga a la del Ejemplo 1, con excepción de que el contenido de fosfolípidos y triacilglicéridos es superior, tal como se muestra en la TABLA III:

TABLA III

Componente	%
Esfingomielinas y dihidroesfingomielinas	28 - 41
Gangliósidos	34 - 44
Ceramidas totales	12 - 18
Sulfátidos	2 - 7
Fosfolípidos y triacilglicéridos	< 6

Ejemplo 3: Ensayo del extracto de cerebro en un modelo murino

Se efectuaron ensayos en un modelo murino con el extracto de cerebro de la invención a fin de determinar el efecto protector del mismo en relación con enfermedades neurodegenerativas, empleando para ello respuestas derivadas del comportamiento de los animales y del análisis de marcadores bioquímicos derivados de la toxicidad del péptido β -amiloide (peroxidación de lípidos y niveles de citoquinas proinflamatorias).

A) Estudio de variaciones en el comportamiento y actividad neuroprotectora frente a la peroxidación de lípidos

Compuestos y extractos

En el estudio se empleó un extracto de cerebro obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, solubilizado en agua bidestilada.

También se empleó un extracto concentrado de DHA y EPA, que contenía un 50% en peso de DHA y un 20% en peso de EPA en forma de triglicéridos, solubilizado en aceite de sésamo.

En los grupos control se empleó aceite de sésamo como vehículo.

El péptido β -amiloide, $A\beta_{25-35}$, n° de registro CAS 131602-53-4, y el péptido *scrambled*- β -amiloide, Sc. $A\beta$, se obtuvieron de la compañía Polypeptides (Francia).

Animales

Se utilizaron 116 ratones suizos machos de 5 semanas de edad con un peso comprendido entre 30 y 35 g obtenidos a través de la compañía Janvier (Francia). Los animales de cada grupo se mantuvieron en cajas separadas con acceso libre a comida y a agua, excepto durante los experimentos del comportamiento.

Grupos de tratamiento

Con los 116 animales se constituyeron 11 grupos tal como se muestra en la TABLA IV:

TABLA IV

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	N° de animales
1	Sc. $A\beta$ + vehículo	-	12
2	$A\beta_{25-35}$ + vehículo	-	12
3	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1	100	4

4	A β ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	200	12
5	A β ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	500	12
6	A β ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	1000	4
7	A β ₂₅₋₃₅ + extracto DHA/EPA	300	12
8	A β ₂₅₋₃₅ + extracto DHA/EPA	450	12
9	A β ₂₅₋₃₅ + extracto DHA/EPA	600	12
10	A β ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 300	12
11	A β ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 450	12
Total			116

Entre los días 1 y 17 se administraron los extractos por vía oral mediante un tubo gástrico una vez al día.

5 Al 8º día se inyectó el péptido amiloide Sc.A β o el péptido amiloide A β ₂₅₋₃₅ oligomérico por vía intracerebroventricular (ICV), para provocar la toxicidad asociada con el péptido β -amiloide. La preparación de los péptidos y la inyección de los mismos se efectuaron de acuerdo con el procedimiento descrito en Maurice et al., Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction, Brain Res., 1996, 706(2), 181-93.

10 Al 15º día (7 día después de la inyección del péptido) se llevó a cabo un ensayo de alternancia espontánea en un laberinto en forma de Y, para valorar la memoria operativa especial.

Al 17º día se llevó a cabo un ensayo de evitación pasiva, para valorar la memoria a largo plazo contextual, con un entrenamiento al 16º día y una sesión de retención al 17º día.

15 Al 17º día, tras la sesión del ensayo de evitación pasiva, los animales fueron sacrificados. Se recogieron muestras de sangre de cada animal. Se extrajeron el hipocampo y el córtex frontal, que fueron congelados con nitrógeno líquido y mantenidos a una temperatura de -80º C.

20 Los hipocampos se emplearon para determinar los niveles de peroxidación de lípidos por medio de un método colorimétrico, empleando entre 2 y 6 animales por grupo.

Las otras estructuras del cerebro se mantuvieron a -80º C durante 3 meses para eventuales ensayos bioquímicos adicionales.

25 Ensayo de alternancia espontánea

Al 7º día, todos los animales fueron ensayados en el laberinto en forma de Y para valorar la alternancia espontánea, que es un índice de la memoria operativa espacial.

30 El laberinto en forma de Y era de PVC de color gris. Cada brazo tenía una longitud de 40 cm, una altura de 13 cm y una anchura de 3 cm en la base y de 10 cm en la parte superior, y convergían con un mismo ángulo. Cada animal fue colocado en el extremo de uno de los brazos y se le permitió moverse libremente en el laberinto durante 8 min. Las entradas en los brazos, incluyendo los posibles retornos a un mismo brazo, fueron controladas visualmente. Una alternancia se definió como una entrada a los tres brazos en ocasiones consecutivas. El número máximo de alternancias es, por tanto, el número total de entradas en los brazos menos 2, y el porcentaje de alternancia fue calculado como (nº de alternancias reales/nº máximo de alternancias) x 100. Los parámetros incluían el porcentaje de alternancia (índice de memoria) y el número total de entradas en los brazos (índice de exploración), tal como se describe en Maurice et al., op. cit., y en Meunier et al., The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor, Br. J. Pharmacol., 2006, 149(8), 998-1012.

Los animales que mostraron un comportamiento extremo (porcentaje de alternancia < 20% o > 90% o un número de entradas en los brazos < 10) fueron descartados en los cálculos. Solamente se descartó un animal.

Ensayo de evitación pasiva

El montaje empleado para efectuar este ensayo consistió en una caja con dos compartimentos (15 × 20 × 15 cm de altura), uno iluminado con paredes de PVC blanco, y el otro oscurecido con paredes de PVC negro y un suelo enrejado. Una puerta de guillotina separaba los dos compartimentos. En el suelo enrejado se efectuaron descargas eléctricas (0,3 mA durante 3 s) empleando para ello un generador de descargas (Lafayette Instruments, USA). La puerta de guillotina permaneció inicialmente cerrada durante la sesión de entrenamiento. Durante dicha sesión, cada animal fue colocado en el compartimento blanco. Después de 5 s, se abrió la puerta. Cuando el animal entró en el compartimento negro y colocó sus patas en el suelo enrejado, se cerró la puerta y se efectuó una descarga eléctrica durante 3 s. Se registraron la latencia del paso a través, esto es, la latencia para entrar en el compartimento oscuro, y el número de vocalizaciones. El ensayo de retención se efectuó 24 h después del entrenamiento. Cada animal fue colocado en el compartimento blanco. La puerta fue abierta tras 5 s. Las latencias del paso a través y de escape (que corresponde a la re-entrada desde el compartimento oscuro) fueron registradas hasta los 300 s, según se describe en Meunier et al., op. cit.

En este tipo de ensayos, los animales que muestran latencias por debajo de 10 s durante la sesión de entrenamiento y durante la sesión de retención, son considerados no aptos para responder al ensayo y se descartan en los cálculos. En el estudio efectuado, no se descartó ningún animal.

Determinación de la peroxidación de lípidos

Al 17º día, todos los animales de cada grupo fueron sacrificados y se extirparon rápidamente ambos hipocampos. Se pesaron y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento del ensayo. Después de la descongelación, fue homogeneizado un hipocampo por animal en metanol frío (1/10 p/v), centrifugado a 1000g durante 5 min y el sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf. A cada tubo se añadió FeSO_4 1 mM, H_2SO_4 0,25 M, naranja de xilenol 1 mM, y fue incubado durante 30 min a temperatura ambiente. Después de registrar la absorbancia a 580 nm (A580_1), se añadieron 10 µl de hidroperóxido de cumeno (CHP) 1 mM a la muestra, y fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente, para determinar el nivel máximo de oxidación. La absorbancia fue registrada a 580 nm (A580_2). El nivel de la peroxidación de lípidos fue calculado como equivalentes CHP según la ecuación:

$$\text{CHPE} = (\text{A580}_1/\text{A580}_2) \times [\text{CHP}], \text{ expresada en nmol,}$$

y expresada como equivalentes de CHP por mg de tejido y como porcentaje de los datos del grupo de control (animales tratados con Sc.Aβ y vehículo).

Análisis estadístico

Todos los valores, exceptuando las latencias de evitación pasiva, se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis se efectuaron separadamente para cada compuesto empleando ANOVA de una vía (valor F), seguida del test de comparación múltiple post-hoc de Dunnett. Las latencias de evitación pasiva no siguen una distribución de Gauss, y fueron analizadas mediante la ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida del test de comparación múltiple de Dunn.

Resultados

En la TABLA V (figura 2.1) se presentan los resultados correspondientes al ensayo de la alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y, expresados como valor medio de porcentaje de alternancia y error estándar de la media:

TABLA V

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	Alternancia (%)
1	Sc.Aβ + vehículo	-	71,8 (1,7)
2	Aβ ₂₅₋₃₅ + vehículo	-	53,2 (2,9)
3	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	100	55,7 (2,1)
4	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	200	73,2 (2,6)
5	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	500	72,3 (1,8)
6	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto Ejemplo 1	1000	73,1 (1,9)
7	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto DHA/EPA	300	51,5 (2,4)
8	Aβ ₂₅₋₃₅ + extracto DHA/EPA	450	64,9 (1,7)

9	A β_{25-35} + extracto DHA/EPA	600	75,0 (1,8)
10	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 300	52,0 (1,9)
11	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 450	76,6 (1,3)

Se puede observar que:

- 5 - El extracto de la invención previene efectivamente los déficits de memoria operativa espacial inducidos por la toxicidad del péptido A β_{25-35} , a partir de una dosis de 200 mg/kg (Grupos 4-6).

En la TABLA VI (figura 2.2) se presentan los resultados correspondientes al ensayo de la alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y, expresados como media de los grupos 2, 3, 8 y 11 con respecto al grupo control (grupo 1):

TABLA VI

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	Diferencia con respect al grupo 1
1	Sc.A β + vehículo	-	0
2	A β_{25-35} + vehículo	-	-18,6
3	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	-16,1
8	A β_{25-35} + extracto DHA/EPA	450	-6,9
11	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 450	<u>+5,2</u>

Los resultados de los grupos 2, 3, 8 y 11 se pueden visualizar como un diseño factorial 2² de acuerdo con la TABLA VII de factores (Extracto de la invención y Extracto DHA/EPA) y resultados:

TABLA VII

Ensayo	Extracto de la invención (mg/kg)	Extracto DHA/EPA (mg/kg)	Diferencia con respect al grupo 1
2	No	No	-18,6
3	Sí (100)	No	-16,1
8	No	Sí (450)	-6,9
11	Sí (100)	Sí (450)	<u>+5,2</u>

Los efectos calculados a partir de los resultados de la TABLA VI para cada uno de los factores y su interacción son los siguientes:

- Efecto del extracto de la invención: +7,3
- Efecto del extracto DHA/EPA: +16,5
- Efecto de la interacción: **+4,8**

La interacción entre los dos extractos es estadísticamente significativa e implica que el efecto de la combinación de ambos no es aditiva, sino que presenta un claro efecto sinérgico.

Así pues, se puede observar que la combinación de la dosis más baja del extracto de la invención (100 mg/kg) con la dosis alta (450 mg/kg) del extracto que comprende DPA y EPA presenta un efecto sinérgico, que es significativamente superior a la suma de los efectos de los componentes administrados separadamente.

Si bien el grupo tratado con la dosis más baja del extracto de la invención presenta un efecto comparable al del grupo tratado con el vehículo y el péptido β - amiloide, $A\beta_{25-35}$, el grupo tratado con la combinación del extracto de la invención se combina con un extracto que comprende DHA, se obtiene un efecto que no es simplemente la adición de los efectos de ambos extractos, sino que se obtiene un efecto superior.

En la TABLA VIII (figuras 3.1 y 3.2) se presentan los resultados correspondientes al ensayo de evitación pasiva, expresados en segundos, como valor medio y error estándar de la media de la latencia de paso a través y la latencia de escape:

TABLA VIII

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	Latencia de paso a través (s)	Latencia de escape (s)
1	Sc. $A\beta$ + vehículo	-	229,8 (20,0)	25,8 (4,6)
2	$A\beta_{25-35}$ + vehículo	-	105,8 (14,2)	62,3 (7,1)
3	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1	100	151,7 (17,8)	51,0 (3,8)
4	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1	200	195,2 (19,9)	34,3 (5,2)
5	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1	500	250,3 (15,8)	22,1 (3,0)
6	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1	1000	253,4 (10,9)	22,1 (2,0)
7	$A\beta_{25-35}$ + extracto DHA/EPA	300	88,8 (8,9)	57,0 (5,6)
8	$A\beta_{25-35}$ + extracto DHA/EPA	450	193,3 (13,6)	29,5 (3,8)
9	$A\beta_{25-35}$ + extracto DHA/EPA	600	249,8 (15,2)	14,5 (2,5)
10	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 300	117,3 (9,7)	51,9 (4,1)
11	$A\beta_{25-35}$ + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 450	263,7 (12,5)	18,2 (2,0)

Se puede observar que el extracto de la invención previene efectivamente los déficits de memoria a largo plazo inducidos por la toxicidad del péptido $A\beta_{25-35}$, a partir de una dosis de 200 mg/kg (Grupos 4-6), y particularmente a partir de 500 mg/kg.

En la TABLA IX (figura 4) se presentan los resultados correspondientes al ensayo peroxidación de lípidos expresados como el valor medio y error estándar de la media de los equivalentes de CHP por peso de tejido húmedo (EHP):

TABLA IX

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	EHP
1	Sc.A β + vehículo	-	1926 (75)
2	A β_{25-35} + vehículo	-	3626 (147)
3	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	2772 (182)
4	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	200	2787 (152)
5	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	500	1993 (80)
6	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	1000	2002 (98)
7	A β_{25-35} + extracto DHA/EPA	300	3536 (146)
8	A β_{25-35} + extracto DHA/EPA	450	2886 (203)
9	A β_{25-35} + extracto DHA/EPA	600	2201 (146)
10	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 300	2763 (143)
11	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1 + extracto DHA/EPA	100 + 450	1960 (102)

Se puede observar que el extracto de la invención presenta una actividad neuroprotectora en cuanto a la reducción de los niveles de peroxidación de lípidos, una consecuencia del estrés oxidativo, a partir de una dosis de 100 mg/kg. Un bloqueo completo se observa a partir de una dosis de 500 mg/kg (Grupos 5 y 6).

B) Estudio de la actividad neuroprotectora relacionada con citoquinas proinflamatorias

Compuestos y extractos

En el estudio se empleó el extracto de cerebro obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, solubilizado en agua bidestilada.

En los grupos control se empleó aceite de sésamo como vehículo.

El péptido β -amiloide, A β_{25-35} , n° de registro CAS 131602-53-4, y el péptido *scrambled*- β -amiloide, Sc.A β , se obtuvieron de la compañía Polypeptides (Francia).

Animales

Se utilizaron 72 ratones suizos machos de 5 semanas de edad con un peso comprendido entre 30 y 35 g obtenidos a través de la compañía Janvier (Francia). Los animales de cada grupo se mantuvieron en cajas separadas con acceso libre a comida y a agua, excepto durante los experimentos del comportamiento.

Grupos de tratamiento

Con los 72 animales se constituyeron 6 grupos de 12 animales cada uno, tal como se muestra en la TABLA X:

TABLA X

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	Semanas de tratamiento
1	Sc.A β + vehículo	-	-

2	A β_{25-35} + vehículo	-	-
3	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	2
4	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	1000	2
5	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	4
6	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	1000	4

Entre los días 1 y 31 (para los grupos 1, 2, 5 y 6) o entre los días 15 y 31 (para los grupos 3 y 4) se administraron los extractos por vía oral mediante un tubo gástrico una vez al día.

- 5 Al 22º día se inyectaron el péptido amiloide Sc.A β o el péptido amiloide A β_{25-35} oligomérico por vía intracerebroventricular (ICV), para provocar la toxicidad asociada con el péptido β -amiloide. La preparación de los péptidos y la inyección de los mismos se efectuaron de acuerdo con el procedimiento descrito en Maurice et al., op. cit.

- 10 Los animales fueron sacrificados el día 31. Se recogieron muestras de sangre de cada animal. Se extrajeron el hipocampo y el córtex frontal, que fueron congelados con nitrógeno líquido y mantenidos a una temperatura de -80º C. En 6 animales por grupo se emplearon los hipocampos para determinar mediante ELISA los niveles de las citoquinas proinflamatorias interleucina-1 β (IL1 β), interleucina-6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α).

Ensayos ELISA

- 15 Se emplearon los siguientes kits comerciales:

- IL1 β : referencia SEA563Mu (USCN Life Science)
- IL6: referencia SEA079Mu (USCN Life Science)
- TNF α : referencia EMTNFA01 (ThermoScientific)

- 20 Los hipocampos se prepararon y ensayaron por duplicado de acuerdo con el siguiente procedimiento: los hipocampos fueron homogeneizados después de ser descongelados en una solución de tampón 50 mM Tris y 150 mM NaCl, a pH 7,5, y sonicados durante 10 s. Después de la centrifugación a 5000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4º C, los sobrenadantes se emplearon para los ensayos ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada ensayo se registró la absorbancia a 450 nm, y la concentración de la muestra fue calculada a partir de una curva de calibración. Los resultados se expresaron como pg de marcador por ml de sobrenadante.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los análisis se efectuaron para cada tratamiento empleando ANOVA de una vía (valor F), seguida del test de comparación múltiple post-hoc de Dunnett.

Resultados

En la TABLA XI (figura 5) se muestran los resultados obtenidos para las tres citoquinas proinflamatorias, expresados en pg/ml (valor medio y error estándar de la media):

TABLA XI

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg vía oral)	Semanas	IL1 β (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	TNF α (pg/ml)
1	Sc.A β + vehículo	-	-	69,5 (1,7)	109,1 (1,2)	436,8 (9,0)
2	A β_{25-35} + vehículo	-	-	93,7 (1,1)	127,8 (1,7)	633,6 (24,0)
3	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	2	86,1 (2,3)	129,2 (1,8)	560,6 (29,9)
4	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	1000	2	79,4 (3,6)	109,7 (1,3)	457,5 (18,0)

5	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	100	4	78,5 (3,4)	110,3 (1,3)	436,3 (16,4)
6	A β_{25-35} + extracto Ejemplo 1	1000	4	74,8 (3,4)	110,3 (1,7)	450,3 (13,8)

En la figura 5 se presentan los resultados de modo que el valor del grupo control 1 se asigna a 100, y el resto de grupos se refieren a dicho valor.

5

Se puede observar que:

- La inyección del péptido A β_{25-35} incrementó de forma altamente significativa la inflamación en el hipocampo de los animales, en comparación con los animales tratados con el péptido scrambled- β - amiloide, Sc.A β .
- El extracto de la invención presenta un efecto antiinflamatorio, que puede estar relacionado con una actividad neuroprotectora, contra las citoquinas inflamatorias inducidas por el péptido A β_{25-35} . En particular, el efecto es más significativo cuando la dosis es de 100 mg/kg durante 4 semanas, o bien de 1000 mg/kg durante 2 semanas.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un extracto de cerebro de un animal, donde el animal no es humano, caracterizado porque comprende:
 - 5 1) someter cerebros triturados a una extracción con una mezcla de etanol:agua o con una mezcla de cloroformo:metanol y separar la fracción líquida, denominada L1,
 - 2) destilar el disolvente de la fracción líquida L1, y precipitar con acetona para obtener la fracción sólida, denominada S2,
 - 10 3) saponificar la fracción sólida S2, descartar los productos resultantes de la saponificación solubles en acetona, y obtener la fracción sólida, denominada S3.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el cerebro es de origen porcino.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la mezcla etanol:agua tiene una
15 proporción comprendida entre 80:20 y 60:40 expresada en (v/v).
4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la mezcla cloroformo:metanol tiene una proporción comprendida entre 70:30 y 60:40 expresada en (v/v).
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende una etapa previa de desengrasado de los cerebros mediante la extracción con un disolvente seleccionado de entre acetona, hexano y anhídrido carbónico en condiciones supercríticas.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la saponificación se
25 lleva a cabo por tratamiento con una solución acuosa de un hidróxido alcalino.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende además una etapa de lavado de la fracción sólida S3.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende además
30 una etapa de secado de la fracción sólida S3.
9. Extracto de cerebro obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. Extracto según la reivindicación 9, caracterizado porque el contenido de esfingomielinas está comprendido entre el 28% y el 43% en peso sobre el peso total del extracto, el contenido de gangliósidos está comprendido entre el 34% y el 46% en peso sobre el peso total del extracto, el contenido de ceramidas está comprendido entre el 12% y el 19% en peso sobre el peso total del extracto, el contenido de sulfátidos
40 está comprendido entre el 2% y el 8% en peso sobre el peso total del extracto y el contenido de fosfolípidos y triacilglicéridos es inferior al 10%, y la suma de los porcentajes de los componentes del extracto es igual al 100%.
11. Composición caracterizada porque comprende el extracto de la reivindicación 9 ó 10 y al menos un
45 vehículo o excipiente.
12. Composición según la reivindicación 11, caracterizada porque comprende al menos un componente activo adicional apropiado para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o del sistema nervioso central, o potenciadores de la salud del sistema nervioso.
- 50 13. Composición según la reivindicación 12, caracterizada porque el componente activo adicional comprende un extracto de ácidos omega-3 en forma de triglicéridos.
14. Extracto de cerebro de la reivindicación 9 ó 10 para uso como medicamento.
- 55 15. Uso del extracto de cerebro de la reivindicación 9 ó 10 para la preparación de una composición farmacéutica, un preparado alimenticio, un preparado alimenticio funcional, o un complemento alimenticio.

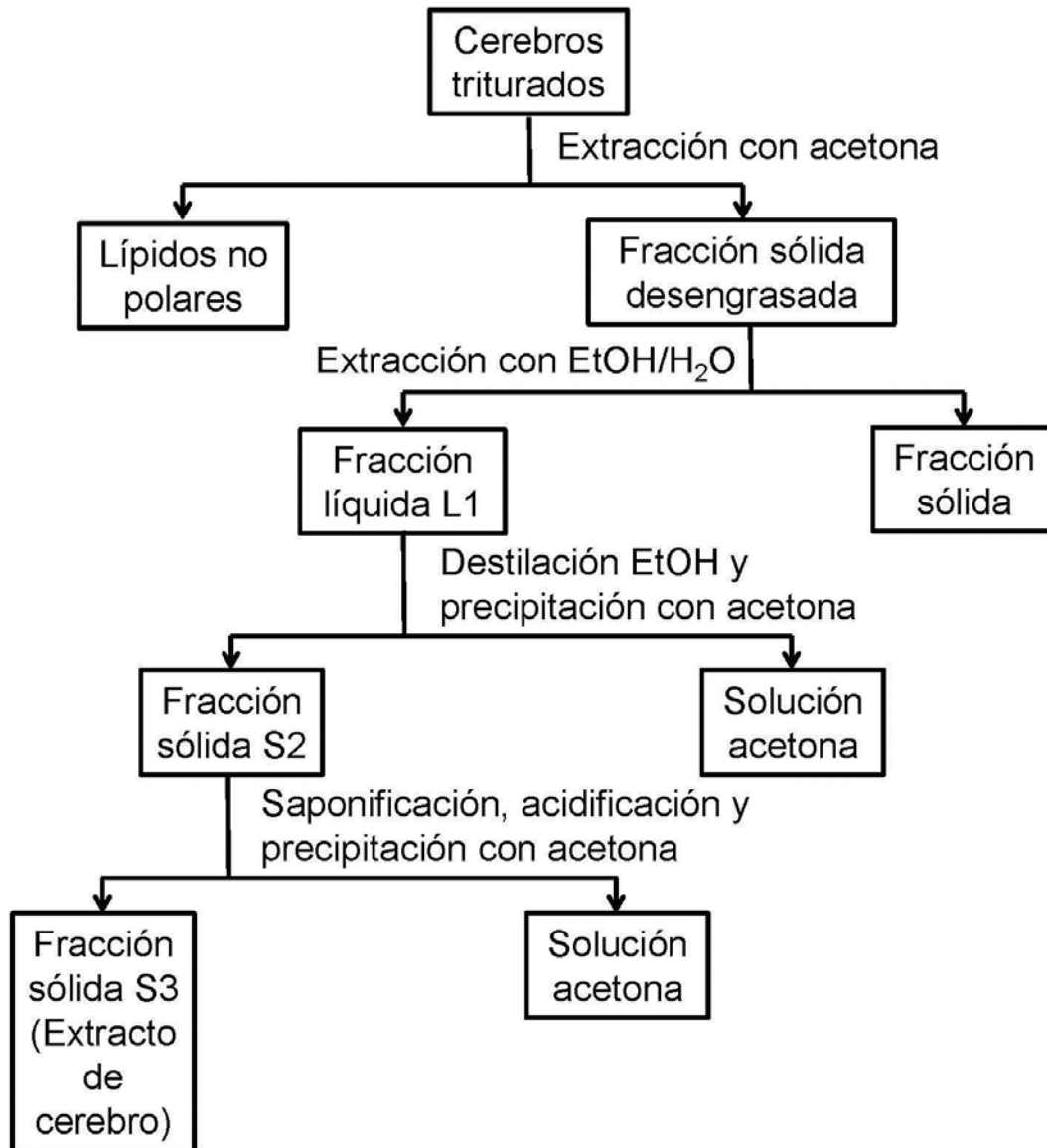


Figura 1

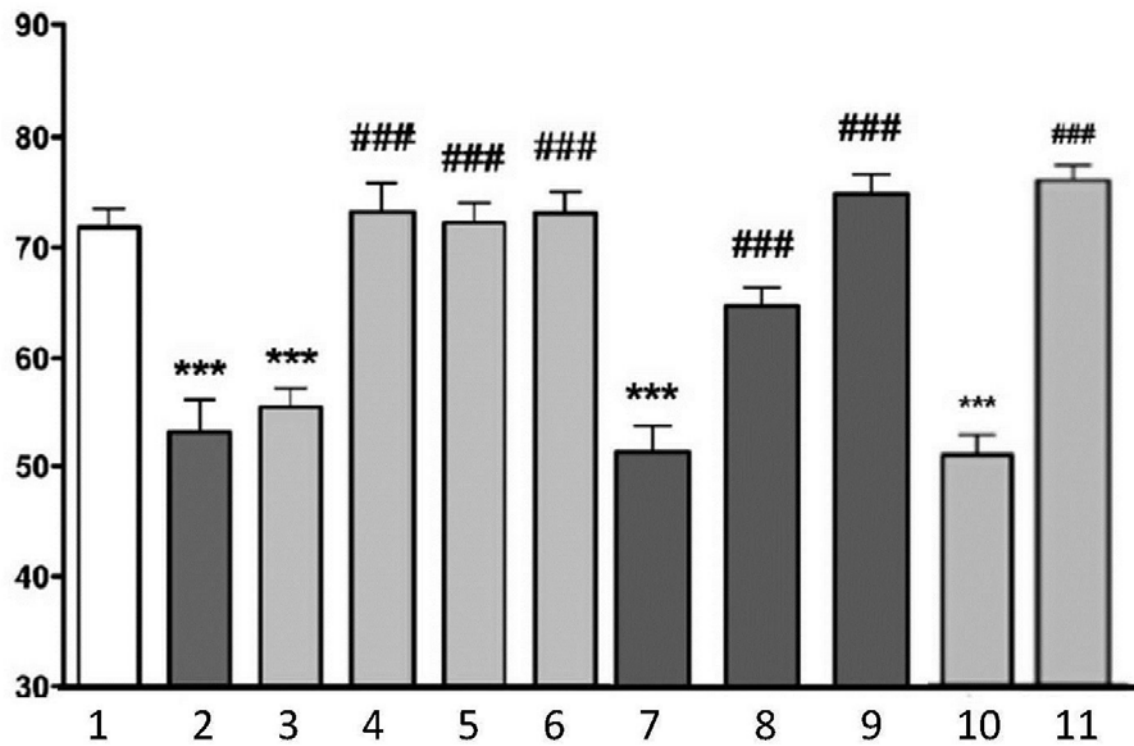


Figura 2.1

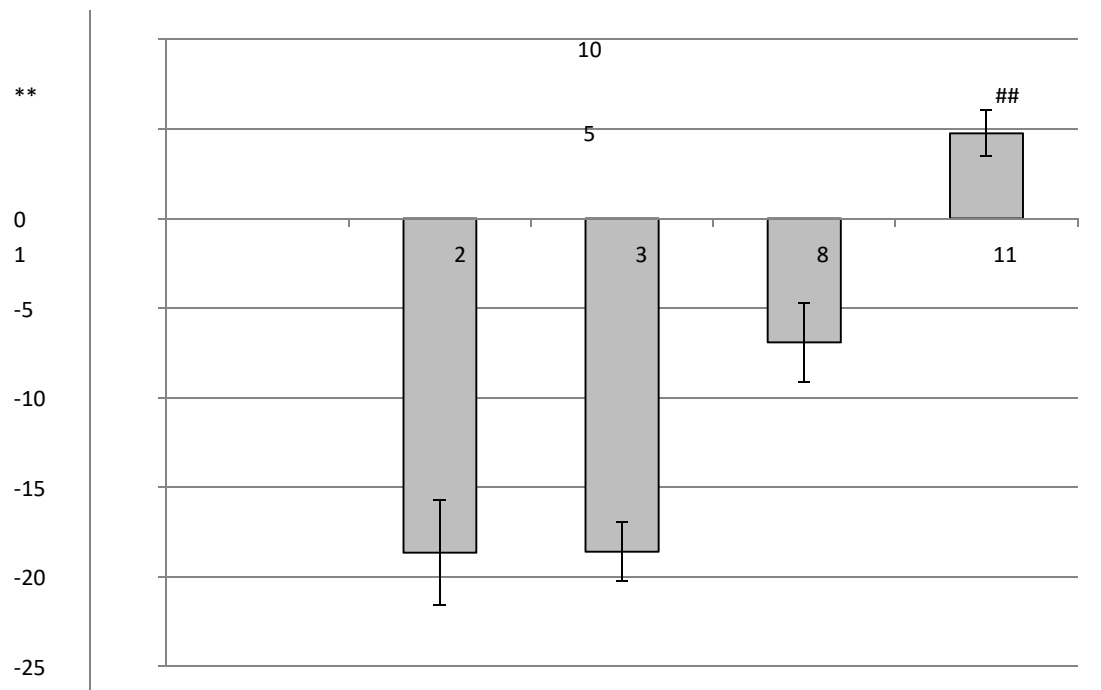


Figura 2.2

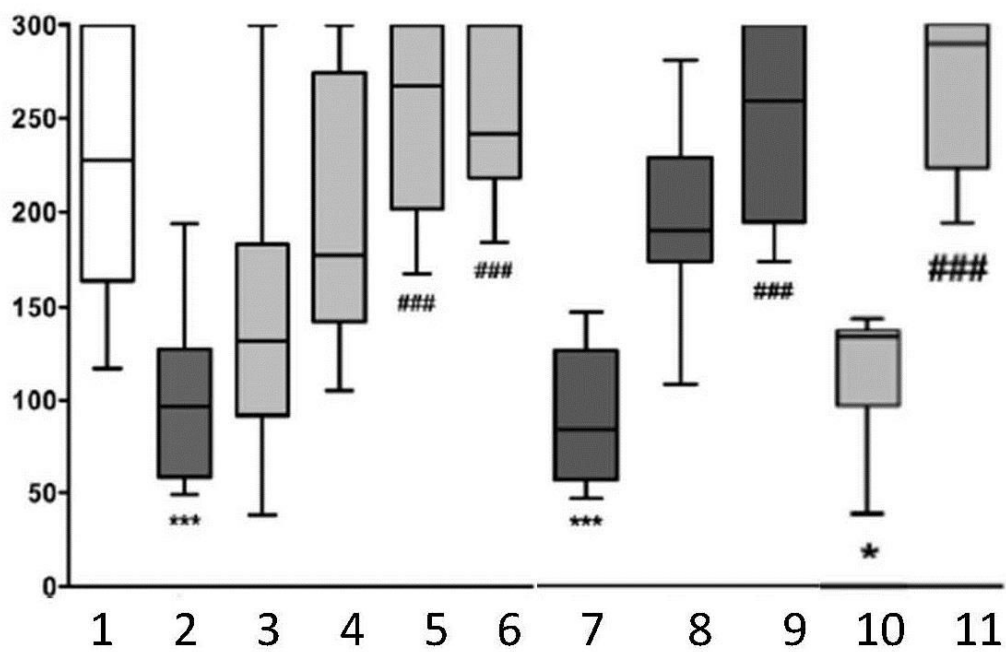


Figura 3.1

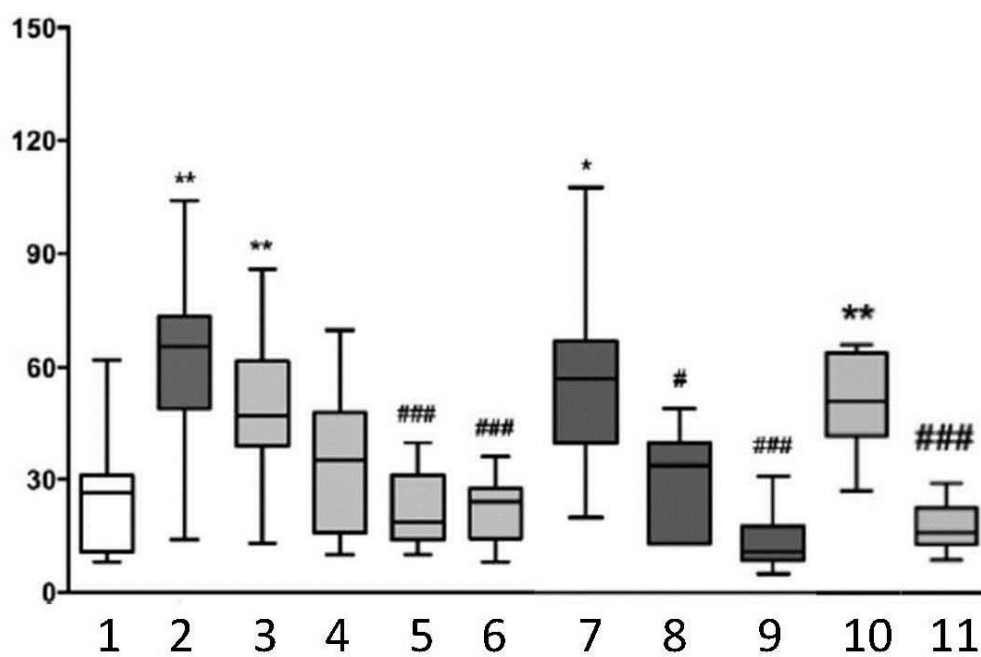


Figura 3.2

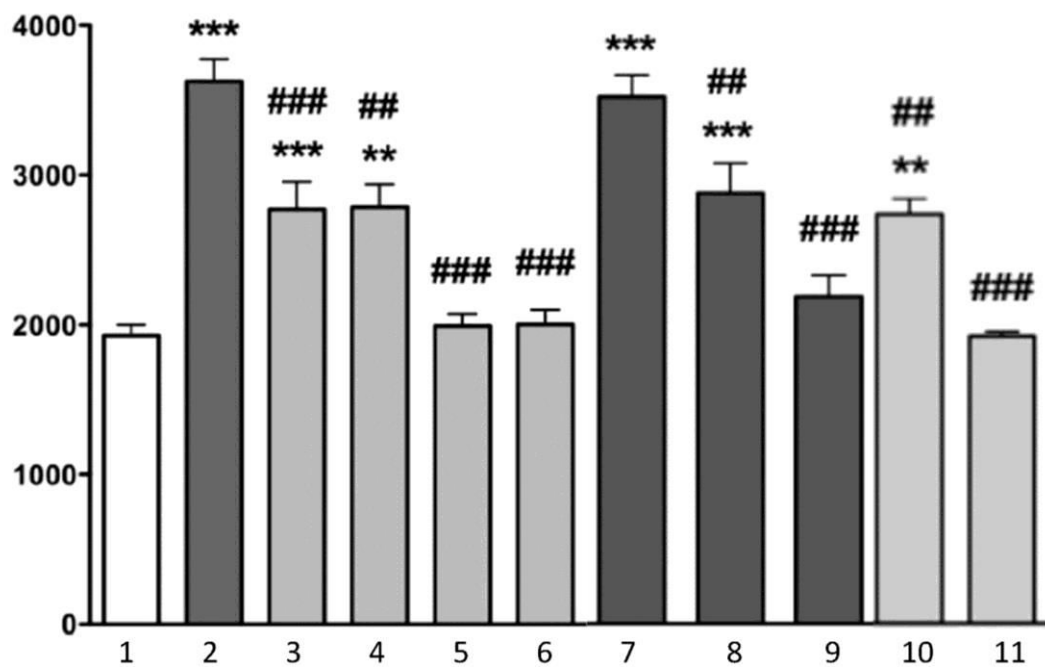


Figura 4

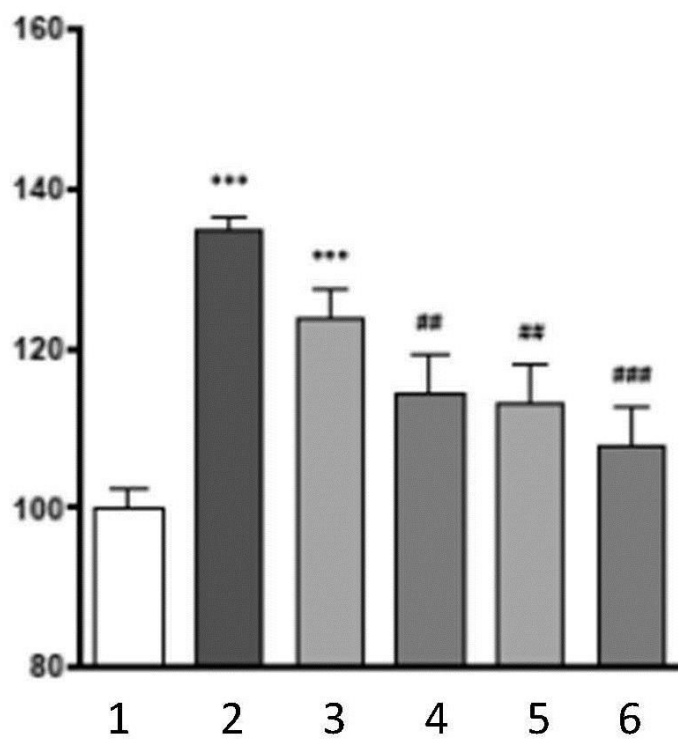


Figura 5.1

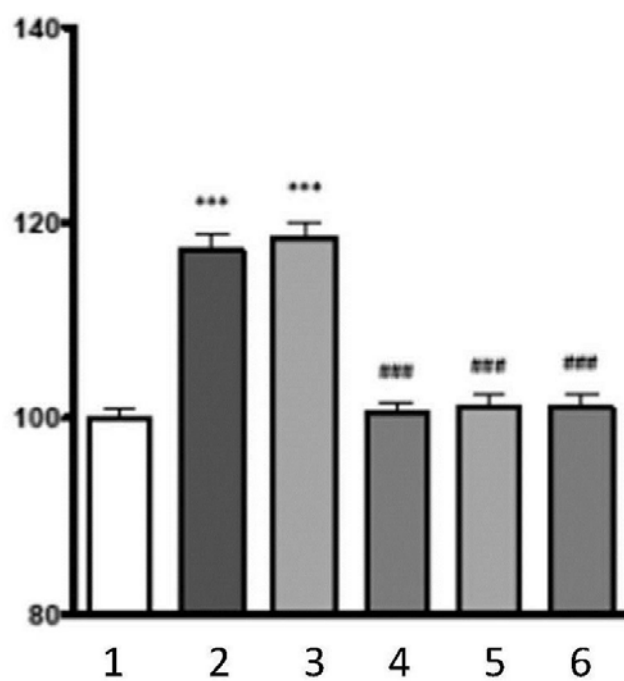


Figura 5.2

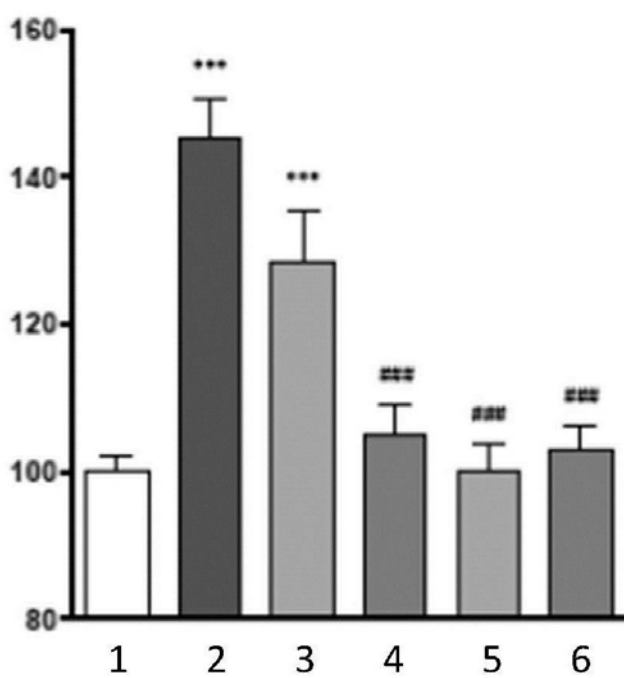


Figura 5.3