

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 061**

51 Int. Cl.:

A61K 31/202 (2006.01)
A61K 31/355 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2016 PCT/FR2016/051001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16722319 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3288551**

54 Título: **Composición que contiene norbixina para la protección de las células del epitelio pigmentario retiniano**

30 Prioridad:
30.04.2015 FR 1553957

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2020

73 Titular/es:
**BIOPHYTIS (50.0%)
14 avenue de l'Opéra
75001 Paris, FR y
SORBONNE UNIVERSITÉ (50.0%)**

72 Inventor/es:
**LAFONT, RENÉ;
VEILLET, STANISLAS;
SAHEL, JOSÉ-ALAIN;
FONTAINE, VALÉRIE y
ELENA, PIERRE-PAUL**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 752 061 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que contiene norbixina para la protección de las células del epitelio pigmentario retiniano

Campo de la invención

La presente invención está dirigida al campo de los tratamientos de las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR).

- 5 Más particularmente, la presente invención está dirigida a la utilización de una composición para la protección de las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR), principalmente para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o también de la enfermedad de Stargardt y la retinitis pigmentaria en los mamíferos.

10 La invención tiene por objeto mejorar la visión de los individuos que padecen estas enfermedades o al menos estabilizar la evolución de la enfermedad. La presente invención, se refiere a una composición que contiene más del 90 % en peso de Norbixina obtenida por purificación a partir de un extracto de granos de Bixa orellana, para su utilización para la fotoprotección de las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR) en el mamífero por la administración de dicha composición a dicho mamífero, por día, en una cantidad comprendida entre 0,48 mg/kg de peso corporal y 48 mg/kg de peso corporal.

Estado de la técnica

- 15 La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una causa de ceguera irreversible en las poblaciones de personas de edad avanzada, en particular, en Europa y en América del Norte. La DMAE afecta a la parte central de la retina, denominada mácula, lo que conlleva una grave deficiencia visual y la pérdida irreversible de la visión central.

20 La función macular es el origen de la visión central y de la agudeza visual cuya alta resolución está ligada a su fuerte concentración de fotorreceptores de los conos. El estadio precoz de la DMAE está marcado por depósitos denominados drusas, que no afectan la visión más que de forma marginal. Las fases posteriores comprenden dos formas de DMAE, la atrofia geográfica (forma seca) o exudativa (forma húmeda o neovascular), siendo la primera mucho más frecuente que la segunda. Las últimas etapas de estas dos formas dan lugar a la destrucción de la retina neurosensorial macular, pero la evolución de la DMAE seca es generalmente lenta, mientras que la DMAE húmeda puede dar lugar a la ceguera completa en algunas semanas.

- 25 El envejecimiento es la acumulación progresiva con el tiempo de cambios que están asociados a (o son responsables de) una susceptibilidad creciente de la enfermedad. En la retina, un determinado número de enfermedades degenerativas, incluido el glaucoma, la retinitis pigmentaria y la DMAE, pueden sobrevenir como consecuencia del envejecimiento. La retinitis pigmentaria reagrupa a un conjunto heterogéneo de degeneraciones retinianas genéticas, que implican a los fotorreceptores y al EPR, y dan lugar a una pérdida de la visión nocturna, y más tardíamente de la
30 visión central. Aunque los mecanismos específicos implicados en el inicio de los diferentes tipos de enfermedades asociadas al envejecimiento retiniano son diferentes, se piensa que el estrés oxidativo y la inflamación que se producen son elementos importantes que contribuyen a la patogénesis.

35 Las teorías de la etiología de la DMAE incluyen modificaciones hidrodinámicas en la membrana de Bruch causadas por una acumulación progresiva de material extracelular que contiene lípidos, y la senescencia del EPR, cuya actividad es indispensable para la supervivencia de los fotorreceptores. Las células del EPR tienen varias funciones diferentes en los ojos: establecen la barrera hemato-retiniana por sus uniones estrechas, y son así responsables de la situación inmuno-privilegiada de la parte interior del bulbo del ojo; mantienen con vida los fotorreceptores aportándoles nutrientes y participan en el ciclo visual. La comprensión actual es que una deficiencia de la función de las células del EPR es el origen del desarrollo de la DMAE. El envejecimiento provoca una disfunción de las células del EPR y una
40 insuficiencia de su metabolismo, así como de su actividad fagocitaria. Una digestión incompleta de los segmentos externos de los fotorreceptores puede dar lugar a la formación de drusas reduciendo la difusión a través de la membrana de Bruch, lo que provoca en un primer momento una deformación de la retina y de las imágenes percibidas.

45 Con la edad, el EPR almacena una cantidad creciente de lipofuscinas. Estas están compuestas por lípidos y proteínas, que provienen de los fagolisosomas, de los lisosomas y de los fotorreceptores. Las lipofuscinas contienen igualmente N-retinil-N-retiniliden etanolamina (A2E), que se forma por la condensación de dos moléculas de retinaldehído con etanolamina.

50 El envejecimiento está acompañado de una acumulación aguda de A2E en la retina (Bhosale et al., 2009). Bajo la acción de la luz azul y en presencia de oxígeno, la A2E genera especies reactivas que provocan daños en las proteínas, en los lípidos y en el ADN, y, por lo tanto, un estrés oxidativo importante en las células envejecidas del EPR (Sparrow y Cai, 2001). Estos daños perturban la actividad lisosomal de las células del EPR y provocan una acumulación de desechos, lo que termina por generar, aquí y allá, la muerte de las células del EPR que está seguida de la de los fotorreceptores a los que estaban asociadas.

55 No existe ningún medicamento en el mercado para el tratamiento de la DMAE seca, mientras que están comercializados medicamentos por inyección intravítrea de anticuerpos anti-VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) que permiten bloquear parcialmente la formación de neovasos y ofrecen así una alternativa de tratamiento

de la DMAE húmeda. Se han formulado complementos alimenticios con compuestos antioxidantes genéricos, a saber, minerales y vitaminas con propiedades antioxidantes, por ejemplo, cinc, vitaminas A, C, E, con una eficacia terapéutica real, pero limitada. La fórmula nutracéutica AREDS 1 (en inglés « *Age-Related Eye Disease Study* », AREDS 2001) se considera como la norma de cuidado en los Estados Unidos para el tratamiento de la DMAE seca, reduciendo el riesgo de DMAE avanzada un 25 % y la pérdida de la visión un 19 % en cinco años.

Numerosos productos proponen una base de formulación común: cinc y vitaminas C y E, a la que se añaden diversos ingredientes: luteína, resvaratrol, ácidos grasos Omega 3, sin disponer, sin embargo, de datos de eficacia convincentes acerca de estos ingredientes adicionales, ni acerca de las categorías de pacientes susceptibles de responder favorablemente a estas diferentes moléculas (Elliot y Williams, 2012). En particular, la técnica anterior conoce la solicitud internacional WO 2005110375 que se refiere a un complemento alimenticio destinado a limitar o prevenir la pérdida de agudeza visual como consecuencia de una enfermedad ocular.

Los carotenoides (moléculas aportadas exclusivamente por la alimentación), se han estudiado más particularmente, porque algunas de ellas (luteína, zeaxantina = xantofilas) están presentes naturalmente en la mácula (Subczynski et al., 2010), y se sabe que estos compuestos poseen un fuerte poder antioxidante. Por lo tanto, es lógico que estos compuestos se hayan ensayado (solos o en combinación) en la fórmula AREDS, pero los resultados obtenidos han sido limitados, la suplementación no se ha mostrado eficaz más que para un subconjunto de pacientes que carecen de estos compuestos (Pinazo-Durán et al., 2014). Estas moléculas son eficaces *in vitro* para proteger las células del EPR (D407 humanas) frente a los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno (Pintea et al., 2011).

La solicitud de patente japonesa JP 2010285364 destaca una mezcla compuesta por crocetina y otro carotenoide que puede ser una xantofila u otro diapocarotenoide, es decir, la bixina o la norbixina. Esta mezcla, debido a sus propiedades antioxidantes, se propone para mitigar o prevenir las enfermedades en las que está implicado un fenómeno oxidativo.

Otras xantofilas han sido igualmente objeto de estudios por suplementación oral, solas o en combinación con la luteína y/o la zeaxantina (ej. astaxantina - Parisi et al., 2008). Recientemente, se han ensayado diapocarotenoides (= carotenoides truncados en los dos extremos - nomenclatura química de la IUPAC) *in vitro* e *in vivo*, en particular, la crocetina (= 8,8'-diapocaroteno-8,8'-dioato) y sus glicósidos (las crocinas). Las crocinas presentan un efecto fotoprotector *in vitro* sobre cultivos primarios de fotorreceptores de bovinos o de primates (Laabich et al., 2006), y la crocetina protege a las células neuroganglionares frente a un estrés oxidativo (Yamauchi et al., 2011). El azafrán (una especia rica en crocinas/crocetina) administrado por vía oral se ha mostrado activo *in vivo* sobre la calidad de la retina (Maccarone et al., 2008; Falsini et al., 2010; Boisti et al., 2014). Sin embargo, el azafrán que contiene otras moléculas susceptibles de ser activadas en la retina, como otros carotenoides, así como el safranal formado al mismo tiempo que la crocetina (Verma y Middha, 2010; Fernández-Sánchez et al., 2012), es difícil concluir en cuanto al efecto de la crocetina sola.

Se han realizado igualmente experimentos con otro apocarotenoide, la bixina (= 6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato de metilhidrógeno) o algunos de sus derivados, *in vitro* sobre las células neuroganglionares e *in vivo* por inyecciones intravítreas para contrarrestar los efectos de un estrés del retículo endoplásmico (Tsuruma et al., 2012). Los ensayos así realizados evalúan lo más frecuentemente una actividad antioxidante y, por lo tanto, protectora de los compuestos frente a diversos tipos celulares de la retina sometidos a la presencia de un agente oxidante (ej. peróxido de hidrógeno), y, por lo tanto, no están situados directamente en el contexto de la DMAE.

Un extracto de granos de Urucum (*Bixaorellana*) desarrollado anteriormente (Bixilia®) ha mostrado un efecto fotoprotector sobre la piel humana expuesta a UV (FR 2947173, Veillet et al., 2009) y sobre las células de EPR sometidas a un estrés fotooxidativo (Fontaine et al., 2011). El extracto Bixilia® es un extracto natural de Urucum que ha sido enriquecido con Bixina. Bixilia® contiene otros compuestos fotoprotectores de naturaleza fenólica, cuya presencia podría explicar la actividad fotoprotectora superior del extracto bruto respecto a la Bixina sola. En la patente FR 11 54172 (Fontaine et al., 2011, publicada como FR 2 975 008), se analiza el efecto protector de las células de EPR de algunos de los compuestos del extracto Bixilia®. Los resultados de los ensayos que utilizan la Bixina o Norbixina a las concentraciones 0,1 micromolar (μM), 1 μM y 10 μM no tienen actividad fotoprotectora y hacen incluso pensar que cuanto mayor es la concentración de Bixina o Norbixina, menos sobreviven las células de EPR y, por lo tanto, menor es el efecto fotoprotector. Se remarca que, entre otras, las sustancias tales como la cianidina y el ácido elálgico a concentraciones de 10 μM y 20 μM tienen un efecto fotoprotector ventajoso sobre las células de EPR.

Un estudio en profundidad ha dado lugar a la identificación de moléculas activas presentes en el extracto Bixilia® y a precisar su mecanismo de acción y a demostrar su eficacia *in vivo* en ratón y rata. Este estudio ha sido el origen de la presente invención. La invención prevé encontrar así un tratamiento alternativo a los ya existentes para la protección de las células de EPR.

55 Objeto de la invención

Los inventores han descubierto que la Norbixina, en particular su forma 9'-*cis*, permitía disminuir fuertemente la muerte celular provocada por una iluminación con radiación azul de las células del EPR pretratadas con la N-retinil-N-retiniliden etanolamina (A2E).

Según un primer aspecto, la presente invención está dirigida a una composición que contiene más del 90 % en peso de Norbixina obtenida por purificación a partir de un extracto de granos de *Bixa orellana*, para su utilización para la fotoprotección de las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR) en mamíferos por la administración de dicha composición a dicho mamífero, por día, en una cantidad comprendida entre 0,48 mg/kg de peso corporal y 48 mg/kg de peso corporal.

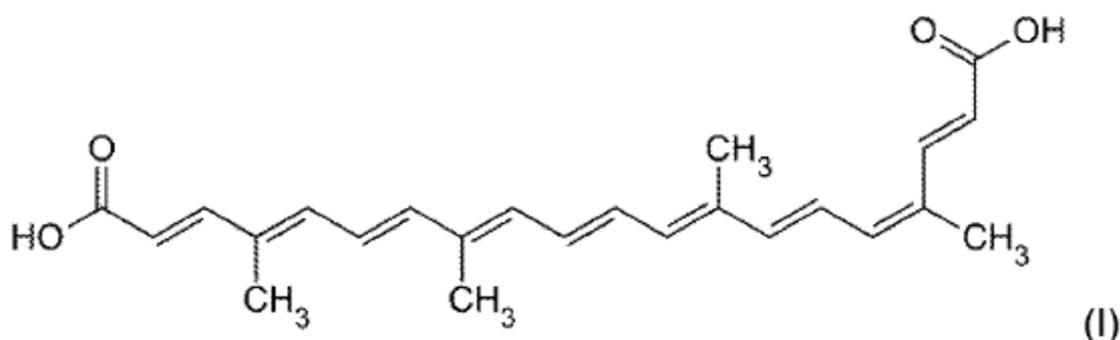
En el marco de la invención, se entiende por « extracto de granos de *Bixa orellana* » un extracto preparado a partir de la parte externa de los granos, es decir, de la sustancia cerosa que recubre los granos de *Bixa orellana*. Esta sustancia cerosa se conoce por ser rica en bixina y en otros carotenoides menores, así como por su utilización como colorante alimenticio.

La Norbixina, biodisponible en los mamíferos después de la administración oral, se absorbe mejor que la Bixina y se encuentra en el ojo, en particular, en la retina.

En modos de realización de la invención, la composición contiene más del 90 % en peso de Norbixina.

En modos de realización particulares de la invención, la composición contiene más del 95 % en peso de Norbixina.

En modos de realización particulares de la invención, la composición contiene más del 90 % en peso de Norbixina en su forma 9'-*cis* de fórmula (I):



En modos de realización particulares, la composición contiene al menos un elemento elegido entre el cinc, la vitamina C y la vitamina E.

En modos de realización particulares, la composición puede utilizarse en forma de un complemento alimenticio o de un medicamento.

Por complemento alimenticio se entiende un producto que contiene dicha composición que tiene por objeto completar la alimentación aportando nutrientes beneficiosos para la salud según la definición proporcionada por la directiva europea 2002/46/EC. Por ejemplo, un complemento alimenticio puede ser una cápsula o un comprimido para tragar o un polvo o pequeña ampolla para mezclar con un alimento y que presenta efectos beneficiosos sobre las células de EPR.

Por medicamento, se entiende un producto que contiene una dosis precisa de dicho compuesto o de dicho extracto según la definición proporcionada por la directiva europea 65/65/CE, a saber, cualquier sustancia o composición presentada como que posee propiedades curativas o preventivas respecto a enfermedades humanas o animales. Por ejemplo, el medicamento que contiene el compuesto a las dosis terapéuticas puede administrarse por vía oral en forma de cápsula o comprimido o inyectarse por vía intravítrea o cualquier otra vía que permita conferir efectos beneficiosos sobre la retina.

En modos de realización particulares, la composición comprende un soporte aceptable para ser ingerido, inyectado en el ojo, inyectado por vía sistémica o inyectado en la sangre.

En modos de realización, la composición se administra a un mamífero, por día, en una cantidad comprendida entre 0,48 mg/kg de peso corporal y 48 mg/kg de peso corporal, preferentemente comprendida entre 0,6 mg/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal.

Según otros modos de realización particulares de la invención, la composición está destinada a prevenir los daños en la retina susceptibles de estar causados por la exposición a radiación azul. Por radiación azul, se entiende la radiación correspondiente a la banda azul del espectro de la luz visible, con una longitud de onda comprendida entre 435 nm y 490 nm.

En modos de realización particulares de la invención, la composición está destinada al tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en el mamífero.

En otros modos de realización particulares, la composición está destinada a tratar la enfermedad de Stargardt y/o la retinitis pigmentaria en el mamífero. La enfermedad de Stargardt, o síndrome de Stargardt, es una patología hereditaria, que asocia una baja agudeza visual bilateral a una atrofia de la mácula, que reproduce, a una edad precoz, los síntomas de la forma seca de la DMAE.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el porcentaje de células de EPR supervivientes en presencia de N-retinil-N-retiniliden etanolamina (A2E) y del extracto Bixilia® o de Bixina (20 µM) o de Norbixina (20 µM) después de haber sido sometidas a una iluminación.

10 La Figura 2 ilustra la actividad fotoprotectora de los extractos sucesivos de los granos de Urucum (C = ciclohexano; D = diclorometano; M = metanol) sobre las células del EPR que se han puesto en presencia de A2E y sometidas a una iluminación.

La Figura 3a ilustra las concentraciones plasmáticas después de la ingestión de Bixina (a la izquierda) o de Norbixina (a la derecha) en el ratón C57Bl/6.

La Figura 3b ilustra el análisis farmacocinético de la Norbixina en el ratón C57Bl/6.

15 La Figura 4 ilustra el análisis por HPLC-MS/MS de la Norbixina en los ojos de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) después de inyección intraperitoneal (10 mg/kg). (3: la Norbixina inyectada, 1 y 2: monoglucuronidos de este compuesto).

La Figura 5 ilustra la cinética de la acumulación de A2E en el ojo de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) en función de la edad, en comparación con ratones normales.

20 La Figura 6 ilustra los electroretinogramas (Ondas A a la izquierda y Ondas B a la derecha) de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) que han recibido inyecciones intravítreas unilaterales de Norbixina (con el fin de obtener una concentración final en el vítreo de 130 µM), puestas durante 24 h en oscuridad y después expuestas a la luz azul (4.000 lux, 1 h). Los electroretinogramas se realizan 7 días después de la iluminación.

25 La Figura 7 ilustra el número de capas de núcleos de fotorreceptores en función de la distancia a partir del nervio óptico en los ojos de ratones tratados como en la figura 6.

La Figura 8A ilustra el protocolo experimental de la creación del modelo « rat blue light ».

30 La Figura 8B ilustra los resultados de los electroretinogramas de ratas a las que se inyectó norbixina (100 mg/kg, 4 inyecciones por rata de una disolución 50 mM en NaCl al 9 ‰, 4 ratas/serie) utilizando PBN (fenil-N-terc-butilnitrona, 50 mg/kg, disolución de 20 mg/mL en NaCl al 9 ‰) como control positivo. Los electroretinogramas se realizan 7 días después del tratamiento.

La Figura 9A ilustra el número de capas de núcleos de fotorreceptores en función de la distancia a partir del nervio óptico en los ojos de ratas después de inyecciones intraperitoneales de alfa-fenil-N-terc-butilnitrona (PBN) o de Norbixina e iluminación con una luz azul. Los análisis histológicos se realizan 7 días después del tratamiento.

La Figura 9B ilustra el área bajo cada curva de la Figura 9A.

35 La Figura 10 ilustra la cantidad de A2E acumulada en el ojo de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) que habían ingerido o no alimento complementado con norbixina durante 3 meses.

La Figura 11 ilustra los electroretinogramas de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) que habían sido alimentados o no con el alimento que contenía 0,3 mg/g de norbixina pura durante 3 meses.

40 La Figura 12 ilustra la relación entre la amplitud del electroretinograma (onda A) y la cantidad de A2E acumulada en los ojos de ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}).

La Figura 13 ilustra los resultados del análisis por HPLC en fase inversa de la norbixina purificada a partir del extracto de *Bixa orellana* (la identificación de los isómeros se realizó según Scotter et al., 1998 y Polar-Cabrera et al., 2010).

Descripción detallada de ejemplos de realización de la invención

45 A diferencia de la mayor parte de los estudios publicados anteriormente, los modelos utilizados en la presente invención (tanto *in vitro* como *in vivo*) ponen de relieve el papel de la N-retinil-N-retiniliden etanolamina (A2E) y de su fototoxicidad, y en este sentido, están más cercanos a la patología humana. Los ensayos utilizados *in vitro* se relacionan en su principio con los utilizados con otras sustancias naturales sobre una línea de células de EPR humana (células ARPE-19 - Young et al., 2005).

Protocolos y Resultados

1- Preparación de la Bixina y de la Norbixina

La Bixina pura al 95 % en peso se prepara a partir de un producto comercial (Annatto B) que proviene de una extracción orgánica de los granos de Urucum y con una concentración de Bixina superior al 85 % en peso. La purificación se realiza por recristalizaciones sucesivas.

La Norbixina pura al 95 % en peso se obtiene después de una hidrólisis alcalina de la Bixina purificada (KOH al 5 %, 60 °C, 3 horas). La disolución obtenida se acidifica con ácido clorhídrico concentrado y la Norbixina se recupera por centrifugación. El sedimento se lava dos veces con agua para eliminar las sales, y el sedimento final se liofiliza.

La pureza de los compuestos se aprecia por espectrofotometría UV-Vis y HPLC en fase inversa: los compuestos contienen esencialmente los isómeros 9'-*cis* (concentración superior al 90 % en peso, figura 13).

2- Ensayos *in vitro*

Se utilizó un ensayo *in vitro* destinado a estudiar el efecto fotoprotector de diversas sustancias naturales sobre las células del EPR en presencia de A2E. El efecto fotoprotector de las moléculas se evalúa en un modelo celular de fototoxicidad inducida por tratamiento con A2E seguido de una iluminación con luz azul. Por radiación azul, se entiende la radiación correspondiente a la banda azul del espectro de la luz visible, o sea, con una longitud de onda comprendida entre 435 y 490 nm.

Este modelo utiliza cultivos primarios de EPR de cerdo adulto. La supervivencia celular se cuantifica gracias a un ensayo de viabilidad celular. Se añaden a -48h los compuestos a ensayar (en disolución 5 mM en DMSO) para obtener concentraciones finales de 1 a 20 μM , después a -19h la A2E (concentración final 30 μM) y se irradian las células (tiempo 0h). Se mide 24h después la supervivencia de las células. La adquisición de las imágenes, así como su tratamiento, se realizan mediante un microscopio de fluorescencia guiado por el software Metamorph y por un programa de cuantificación especializado. Los experimentos se realizan en microplacas de 96 pocillos en cuádruplicado y el experimento se reproduce un mínimo de cuatro veces. Los resultados se expresan en forma de una relación que representa el número de células vivas en los pocillos tratados con las moléculas a ensayar, dividido por el número de células vivas en los pocillos control (tratados con el medio de dilución sin A2E).

Este ensayo ha permitido poner de manifiesto anteriormente la muy buena actividad fotoprotectora de un extracto etanólico de granos de Annatto (Bixilia® - véase, Fontaine et al., 2011). En el trabajo anterior, aunque se demostró la actividad del extracto de Annatto, no se identificó la naturaleza de la (o las) sustancia(s) fotoprotectora(s), y el componente principal de este extracto (la bixina) se mostró ineficaz a las concentraciones de 0,1 μM , 1 μM y 10 μM . Por lo tanto, se ha emprendido un trabajo complementario con el fin de identificar el (o los) compuesto(s) activo(s).

a. La Bixina (no reivindicada) es responsable de una gran parte de la actividad fotoprotectora de Bixilia®

La Figura 1 muestra que la Bixina y la Norbixina (20 μM) protegen eficazmente las células del EPR frente a la fototoxicidad inducida en presencia de A2E respecto al control con A2E. Un extracto bruto de granos de Urucum diluido para aportar 20 μM de bixina posee una actividad fotoprotectora elevada. La utilización de bixina muy pura y a la concentración de 20 μM ha permitido mostrar que este componente poseía de hecho una actividad fotoprotectora importante (Figura 1) y que esto explicaría una parte importante de la actividad del extracto Bixilia® diluido de forma que aporte la misma cantidad de bixina. Igualmente, se ha encontrado una actividad comparable para la Norbixina, que representa el metabolito circulante principal de la Bixina (Lévy et al., 1997). Estos resultados están de acuerdo con la actividad fotoprotectora de estos mismos compuestos, demostrada anteriormente para la fotoprotección de la piel humana (Veillet et al., 2009).

b. Bixilia® contiene otros compuestos fotoprotectores (no reivindicados)

Bixilia® contiene otros compuestos fotoprotectores de naturaleza fenólica, cuya presencia podría explicar la actividad superior del extracto bruto respecto a la bixina sola (para una misma concentración de bixina). Se realizó una extracción secuencial de la cubierta de los granos de Urucum sucesivamente con ciclohexano, diclorometano y metanol (1 L de cada uno / 100 g de granos). Después de la extracción con ciclohexano, se obtiene una fracción con una concentración de Bixina de 0,65 μM , después de la extracción con diclorometano se obtiene una fracción que posee una concentración de Bixina de 1.485 μM , y después de la extracción con metanol una fracción que posee una concentración de Bixina de 45 μM .

Se reprodujo entonces el ensayo *in vitro* anterior.

Según la Figura 2, la fracción de diclorometano, que contiene el 97 % de la Bixina, es muy activa, pero se observa igualmente que el extracto metanólico rico en compuestos fenólicos posee una actividad significativa (C = ciclohexano; D = diclorometano; M = metanol).

3- Biodisponibilidad de la Bixina y de la Norbixina

Se realizaron estudios de la biodisponibilidad de la Bixina y de la Norbixina en ratones C57Bl/6. Los compuestos se administraron por vía oral (50 mg/kg). Se efectuaron tomas sanguíneas después de 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 8 y 24 h y se analizaron por HPLC-DAD (UV 460 nm)-MS/MS. La tabla 1 y la Figura 3a revelan que la Bixina ingerida se transforma rápidamente en Norbixina y que los dos compuestos circulan a concentraciones comparables, no son detectables después de 8 horas. Por otra parte, se observa que la Norbixina ingerida está claramente más biodisponible que la Bixina.

Tabla 1:

Ingestión de bixina (50 mg/kg)			Ingestión de norbixina (50 mg/kg)		
T _{máx} (h)	C _{máx} (ng/mL)	AUC 0-24 h (ng.h/mL)	T _{máx} (h)	C _{máx} (ng/mL)	AUC 0-24 h (ng.h/mL)
Bixina 0,5	833	1.666	Norbixina 0,5	12.400	41.609
Norbixina 0,5	649	1.343			

La comparación de los análisis plasmáticos (figura 3b) después de la inyección intraperitoneal (5 mg/kg) y de la administración oral (50 mg/kg) muestra que la biodisponibilidad de la Norbixina es del 55 %.

La presencia de Norbixina en los ojos se ha investigado en ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) 3 horas después de la inyección intraperitoneal de Norbixina (10 mg/kg). Se diseccionaron los ojos de 6 animales y las muestras se extrajeron con acetonitrilo, se combinaron y se analizaron por HPLC-MS/MS (Figura 4), lo que ha permitido detectar específicamente la presencia de la Norbixina en el EPR y la retina (Tabla 2).

Tabla 2:

Muestra	Norbixina (ng/órgano)
EPR	5,15
Retina	2,40
Cristalino	< LOQ
Humor vítreo	< LOQ
Total	7,55

Según la Figura 4, se observa que, en el plasma, pero también en los ojos, la Norbixina está presente igualmente en forma conjugada: el compuesto inicial proporciona en efecto dos mono-glucuronidos que son eluidos antes del compuesto original y presentan una fragmentación similar, sin duda debido a la descomposición de los glucuronidos en la fuente del espectrómetro de masa. La glucuronidación se había descrito igualmente en el caso de la crocetina (Asai et al., 2005).

Igualmente, se puede observar una isomerización *cis-trans* de la Norbixina, cuya importancia varía según la duración de los experimentos. Este es un fenómeno clásico en los compuestos (poli)-insaturados, que corresponde a isomerizaciones *cis-trans* de uno o varios dobles enlaces y se ha observado en el ser humano en el caso de la norbixina por Lévy et al. (1997). El compuesto utilizado aquí se purifica a partir de compuestos comerciales (Annatto B); contiene muy mayoritariamente la forma 9-*cis* y muy poca cantidad de la forma *todo-trans* y de otras formas *cis* o *di-cis* (figura 13).

4- Actividad fotoprotectora por inyección intravítrea en ratones

Se utilizó un modelo de ratones modificados genéticamente desarrollado por Maeda et al. (2008) para ensayar la actividad fotoprotectora de la Norbixina. En este modelo de ratones, se inactivan dos genes implicados en el ciclo del pigmento visual (ABCA4 y RDH8), lo que ese traduce en una acumulación precoz de A2E en los ojos (Figura 5). Este modelo animal está relacionado por ello con la patología humana, por supuesto con sus limitaciones, asociadas con las diferencias de la organización de los ojos entre los roedores y los primates.

Se utilizaron, por lo tanto, ratones de 7 semanas de edad para realizar inyecciones intravítreas unilaterales de Norbixina (con el fin de obtener una concentración final en el vítreo de 130 µM). Después de 24 h en oscuridad, los ratones se sometieron a una exposición a la luz azul (4.000 lux, 1 h). Los electroretinogramas realizados 7 días más

tarde, mostraron un efecto protector de la Norbixina, cuya presencia permitió mantener una actividad eléctrica significativa como se expone en la Figura 6.

Un estudio histológico del espesor de la capa de núcleos externos puso de manifiesto el efecto protector de la Norbixina sobre los fotorreceptores (figura 7). Debe indicarse que la Norbixina fue eliminada prácticamente 24 h después de la inyección intravítrea y, por lo tanto, está presente en niveles muy bajos en los ojos en el momento de la iluminación.

5- Actividad fotoprotectora por inyección sistémica (intraperitoneal) en la rata

El modelo "rat blue light" consiste en someter a los animales a una luz azul intensa durante 6 horas con el fin de provocar daños oculares que se aprecian 7 días más tarde por la realización de electroretinogramas y por análisis histológicos. Se utiliza un compuesto antioxidante, la PBN (fenil-N-terc-butilnitrona) como control positivo (Ranchon et al., 2001; Tomita et al., 2005). Los compuestos para los que se busca determinar la actividad fotoprotectora se inyectan (por vía intraperitoneal) antes y durante la fase de iluminación. Esta se realiza con tubos de neón Philips azul (4,2 mW/cm²) durante 6 horas. El protocolo experimental se presenta en la Figura 8A.

Se realizaron tres series de experimentos con la Norbixina (100 mg/kg, Cuatro inyecciones por rata de una disolución 50 mM en NaCl al 9 %, 4 ratas/serie) utilizando PBN (fenil-N-terc-butilnitrona, 50 mg/kg, disolución de 20 mg/mL en NaCl al 9 %) como control positivo. El análisis de los electroretinogramas (ondas A y B) se presenta en la Figura 8B.

Este ensayo permitió poner de manifiesto una eficacia significativa de la Norbixina, que es cercana a la de la PBN. Los datos histológicos correspondientes (figura 9A y 9B) confirman la acción fotoprotectora de la Norbixina sobre la supervivencia de los fotorreceptores.

6- Actividad fotoprotectora por administración oral crónica en ratones

Se preparó un alimento que contenía 0,3 mg/g de Norbixina pura y se proporcionó a ratones con doble inactivación (ABCA4^{-/-}, RDH8^{-/-}) durante un periodo de 3 meses.

Los animales que habían recibido el alimento suplementado con la Norbixina mostraron una reducción de la acumulación de A2E en los ojos (figura 10); la diferencia entre los dos grupos es muy significativa (p = 0,0109).

El alimento complementado con Norbixina presenta igualmente un efecto positivo sobre la amplitud del electroretinograma (ERG) (figura 11).

Estos análisis han mostrado igualmente que existe una relación inversa entre la cantidad de A2E acumulada en los ojos y la amplitud del ERG (figura 12), lo que confirma el papel de la acumulación de A2E en el desarrollo de la patología (Wu et al., 2014), y el interés de moléculas cuya administración reduce la acumulación de A2E en los ojos.

Sin embargo, no se observa acumulación significativa de Norbixina en los ojos a lo largo de este tratamiento crónico, lo que lleva a concluir que, a diferencia de las xantofilas, esta molécula sería degradada. La ausencia de acumulación de esta sustancia activa puede considerarse como una ventaja, porque la acumulación de determinados carotenoides (ej. cantaxantina) es susceptible de dar lugar a la formación de depósitos en las células del EPR (Goralczyk et al., 1997). Igualmente, es indicadora de una acción modificadora de la actividad de las células del EPR en lugar de un papel de filtro o de antioxidante, como se ha postulado para la luteína y la zeaxantina. Este resultado coincide con el observado durante las inyecciones intravítreas (a saber, la desaparición de la Norbixina en el momento de la iluminación).

La dosis diaria que permite ralentizar significativamente la degeneración retiniana en ratones después de la administración oral es 48 mg/kg de peso corporal. La transposición al ser humano conduce a proponer una dosis diaria activa de 4,8 mg/kg. Por otra parte, se sabe que la dosis diaria admisible o DJA (en inglés: *Acceptable Daily Intake* o ADI) de la Norbixina es como máximo 0,6 mg/kg/día de peso corporal (JECFA/67/FC). Este valor se ha establecido sobre la base de una dosis sin efecto o DES (en inglés: *No Observable Adverse Effect Level* o NOAEL) en la rata de 69 mg/kg/día de peso corporal, equivalente a una dosis diaria sin efecto en el ser humano de 11 mg/kg, sabiendo que no se ha observado ninguna toxicidad hasta 20 mg/kg/día (Hagiwara et al., 2003). La posología propuesta está comprendida entre 0,48 mg/kg/día y 48 mg/kg/día, idealmente entre 0,6 mg/kg/día y 20 mg/kg/día.

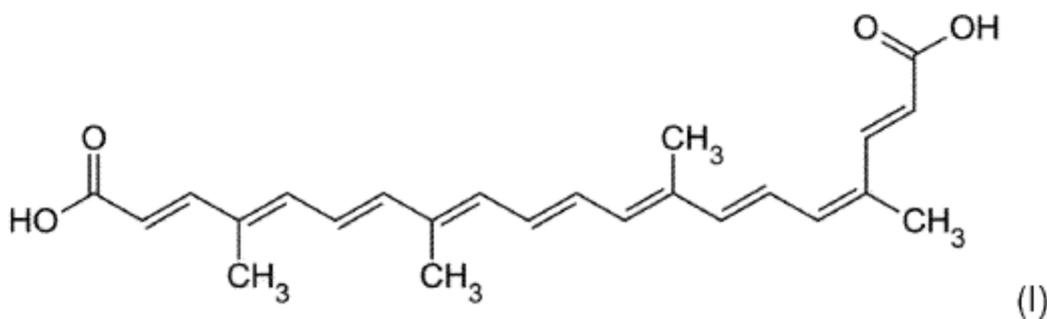
Referencias

- AREDS Informe No. 8. 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high- dose supplementation with vitamins C and E, beta carotène, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. *Arch Ophthalmol*, 119: 1417-1436.
- 5 Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. 2005. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem*, 53: 7302-7306.
- Bhosale P, Serban B, Bernstein PS. 2009. Retinal carotenoids can attenuate formation of A2E in the retinal pigment epithelium. *Arch BiochemBiophys*, 483: 175-181.
- 10 Bisti S, Maccarone R, Falsini B. 2014. Saffron and retina: neuroprotection and pharmaco-kinetics. *Visual Neurosci*, 1-7. doi:10.1017/S0952523814000108.
- Châbera P, Fuciman M, Hribek P, Polivka T. 2009. Effect of carotenoid structure on excited-state dynamics of carbonyl carotenoids. *PhysChemChemPhys*, 11: 8795-8803.
- Elliott JG, Williams NS. 2012. Nutrients in the battle against age-related eye diseases. *American Optometric Association*. doi:10.1016/j.optm.2011.11.006
- 15 Falsini B, Piccardi M, Minnella A, Savastano C, Capoluongo E, Fadda A, Balestratti E, Maccarone R, Bisti S. 2010. Influence of saffron supplementation on retinal flicker sensitivity in early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 6118-6124.
- Fernández-Sánchez L, Lax P, Esquivá G, Martín-Nieto J, Pinilla I, Cuenca N. 2012. Safranal, a saffron constituent, attenuatesretinaldegeneration in P23H rats. *PLoS ONE*, 7(8): e43074.
- 20 Fontaine V, Lafont R, Sahel JA, Veillet S. 2011. Utilisation de composés et composition pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMAE). Solicitud FR 25506 (depositada el 14 de mayo de 2011).
- Goralczyk R, Buser S, Bausch J, Bee W, Zuhlke U, Barker FM. 1997. Occurrence of birefringent retinal inclusions in cynomolgus monkeys after high doses of canthaxanthin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38: 741-752.
- 25 Hagiwara A, Imai N, Ichihara T, Sano M, Tamano S, Aoki H, Yasuhara K, Koda T, Nakamura M, Shirai T. 2003. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed of annatto (*Bixaorellana* L.), in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*, 41: 1157-1164.
- Laabich A, Vissvesvaran GP, Lieu KL, Murata K, McGinn TE, Manmoto CC, Sinclair JR, Karliga I, Leung DW, Fawzi A, Kubota R. 2006. Protective effect of crocin against blue light- and white light-mediated photoreceptor cell death in bovine and primate retinal primary cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 3156-3163.
- 30 Lévy LW, Regalado E, Navarette S, Watkins RH. 1997. Bixin and norbixin in human plasma: Determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color. *Analyst*, 122: 977-980.
- Liu X, Osawa T. 2007. Cisastaxanthin and especially 9-cisastaxanthin exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-trans isomer. *BiochemBiophys Res Comm*, 357: 187-193.
- 35 Maccarone R, Di Marco S, Bisli S. 2008. Saffron supplementation maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: 1254-1261.
- Maeda T, Maeda A, Golczak M, Palczewski K. 2008. Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J BiolChem*, 283: 26684-26693.
- Maeda T, Maeda A, Matosky M, Okano K, Roos S, Tang J, Palczewski K. 2009. Evaluation of potential therapies for a mouse model of human age-related macular degeneration caused by delayed all-trans-retinal clearance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 4917-1925.
- 40 Melendez-Martinez AJ, Stinco CM, Liu C, Wang XD. 2013. A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies. *Food Chem*, 138: 1341-1350.
- Monténégro MA, De O Rios A, Mercadante AZ, Nazareno MA, Borsarelli CD. 2004. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J Agric Food Chem*, 52: 367-373.
- 45 Parisi V, Tedeschi M, Gallinaro G, Varano M, Saviano S, Piermarocchi S. 2008. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy Italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. *Ophthalmology*, 115(2): 324-333.

- Phan-Thi H, Waché Y. Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker. *Food Chem*, 156: 58-63.
- 5 Pinazo-Durán MD, Gómez-Ulla F, Arias L, Araiz J, Casaroli-Marano R, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, López-Gálvez MA, Manzanaga L, Salas A, Zapara M, Diaz-Llopis M, García-Layana A. 2014. Do nutritional supplements have a role in age macular degeneration prevention? *J Ophthalmology*, ID del artículo 901686.
- Pintea A, Rugina DO, Pop R, Bunea A, Socaciu C. 2011. Xanthophylls protect against induced oxidation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Food Compos Anal*, 24(6): 830-836.
- 10 Rios ADO, Borsarelli CD, Mercadante AZ. 2005. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model System. *J Agric Food Chem*, 53: 2307-2311.
- Sparrow JR, Cai B. 2001. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by *Bcl-2*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1356-1362.
- Subczynski WK, Wisniewska A, Widomska J. 2010. Location of macular pigments in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Arch BiochemBiophys*, 504: 61-66.
- 15 Tsuruma K, Shimazaki H, Nakashima K, Yamauchi M, Sugitani S, Shimazawa M, Iinuma M, Hara H. 2012. Anatto prevents retinal degeneration induced by endoplasmic reticulum stress *in vitro* and *in vivo*. *Mol Nutr Food Res*, 56: 713-724.
- Veillet S, Lafont R, Dìoh W. 2009. Cosmetic composition for protection from the sun containing urucumextract. Solicitud de Prioridad FR2009-54354 A (25 de junio de 2009), Solicitud no. FR 2009-54354, WO 2010-FR51323.
- 20 Verma RS, Middha D. 2010. Analysis of saffron (*Crocus sativus*L.) stigma components by LC-MS-MS. *Chromatographia*, 71: 117-123.
- Widomska J, Subczynski WK. 2014. Why has nature chosen lutein and zeaxanthin to protect the retina? *J ClinExpOphthalmol*, 5(1): 326, doi:10:4172/2155-9570.1000326.
- 25 Wu L, Ueda K, Nagasaki T, Sparrow JT. 2014. Light damage in *Abca4* and *Rpe65^{rd12}* mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55: 1910-1918.
- Yamauchi M, Tsuruma K, Imai S, Nakanishi T, Umigai N, Shimazawa M, Hara H. 2011. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative stress and endoplasmic reticulum stress via inhibition of caspase activity. *Mol Cell Pharmacol*, 650: 110-119.
- 30 Young JP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JN. 2005. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *PhotochemPhotobiol*, 81: 529-536.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene más del 90 % en peso de Norbixina obtenida por purificación a partir de un extracto de granos de *Bixa orellana*, para su utilización para la fotoprotección de las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR) en el mamífero por administración de dicha composición a dicho mamífero, por día, en una cantidad comprendida entre 0,48 mg/kg de peso corporal y 48 mg/kg de peso corporal.
2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, administrándose al mamífero, por día, en una cantidad comprendida entre 0,6 mg/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal.
3. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que contiene más del 95 % en peso de Norbixina.
4. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene más del 90 % en peso de Norbixina en su forma 9'-*cis* de fórmula (I):



5. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene al menos un elemento elegido entre el cinc, la vitamina C y la vitamina E.
6. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, que se presenta en la forma de un complemento alimenticio o de un medicamento.
7. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un soporte aceptable para ser ingerido, inyectado en el ojo, inyectado por vía sistémica o inyectado en la sangre.
8. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su aplicación en la prevención de los daños en la retina causados por la exposición a radiación azul correspondiente a la banda azul del espectro de la luz visible, con una longitud de onda comprendida entre 435 nm y 490 nm.
9. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su aplicación en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) en los mamíferos.
10. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, para su aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Stargardt y/o la retinitis pigmentaria en los mamíferos.

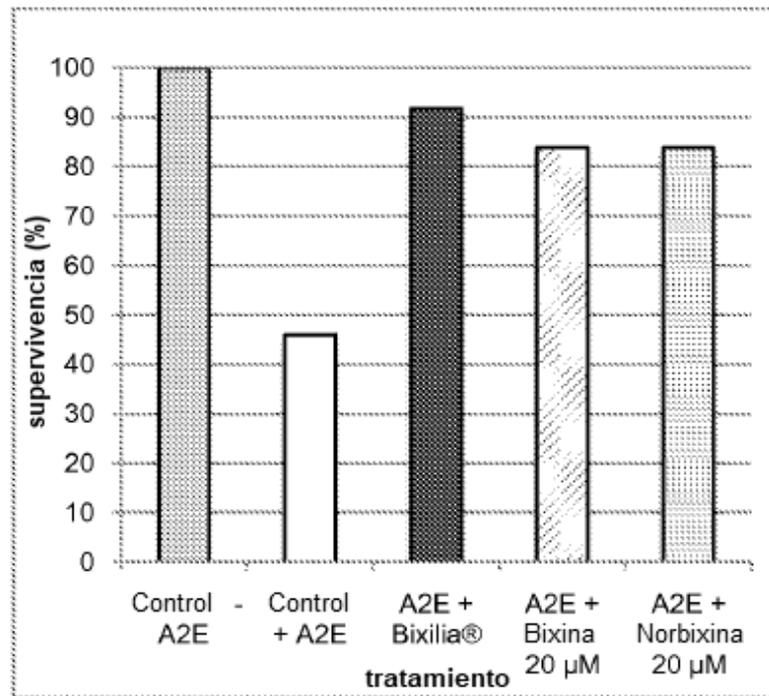


Fig. 1

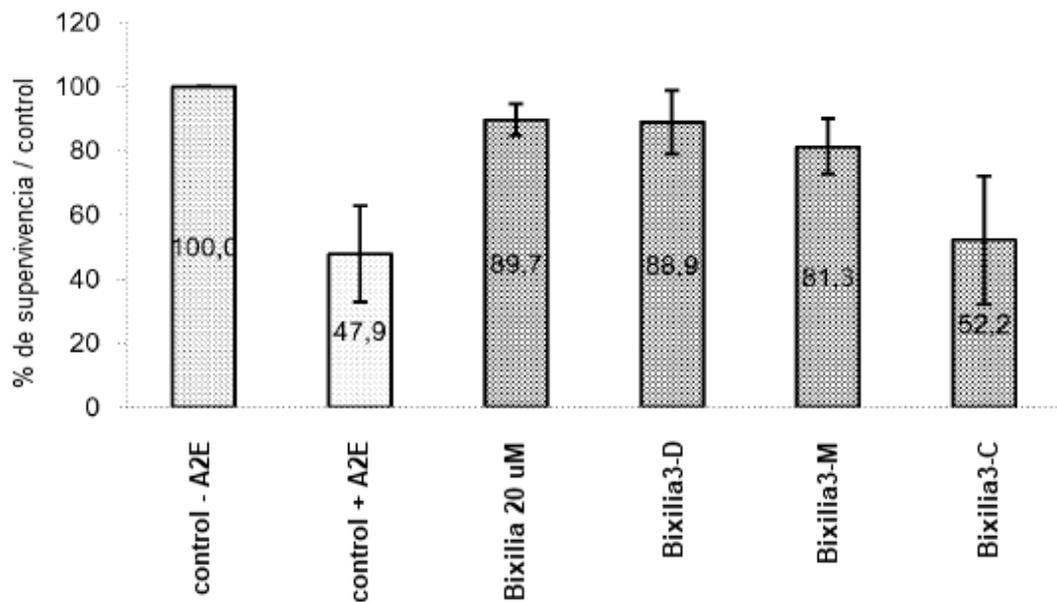


Fig. 2

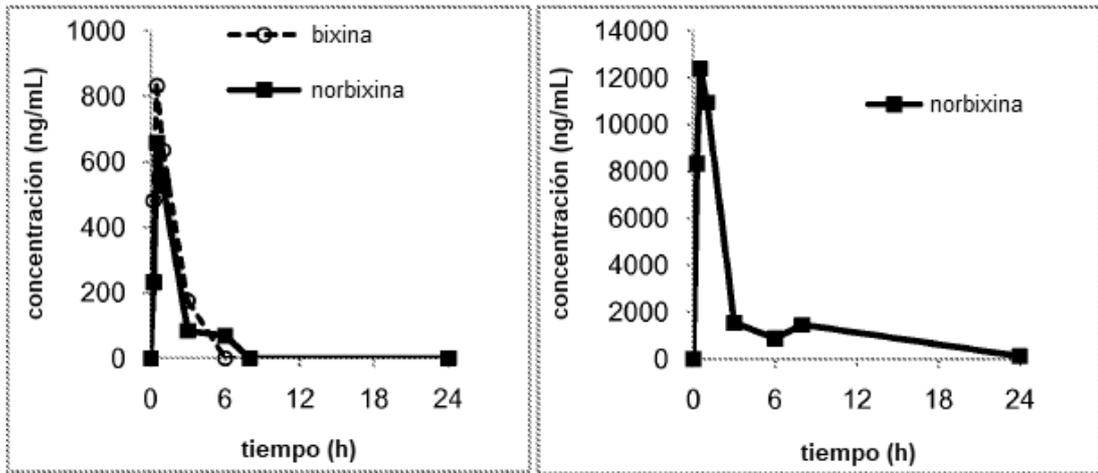


Fig. 3a

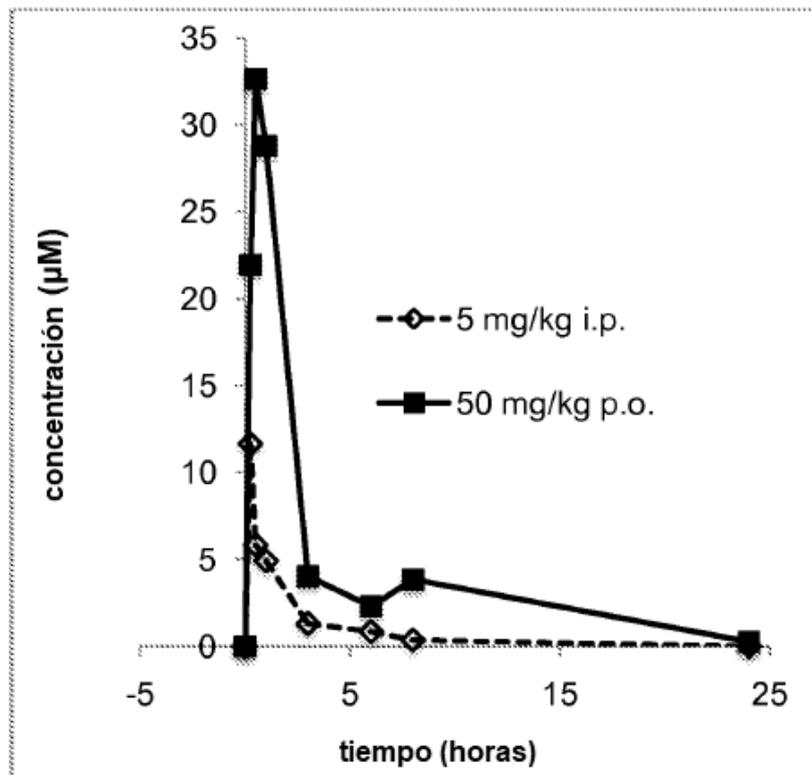


Fig. 3b

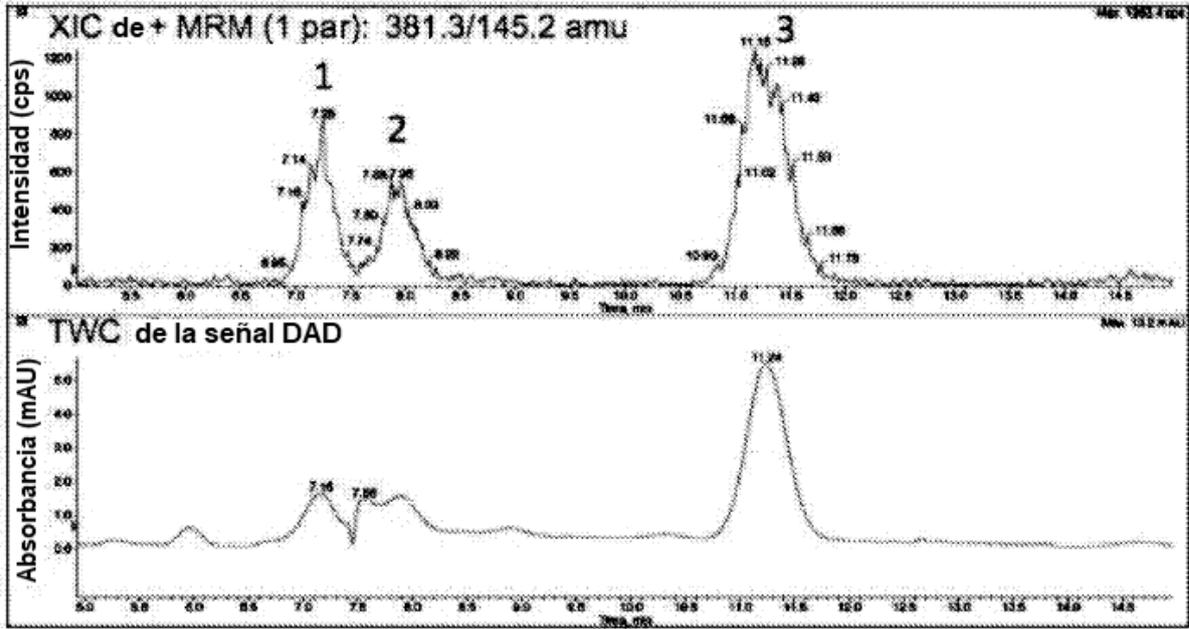


Fig. 4

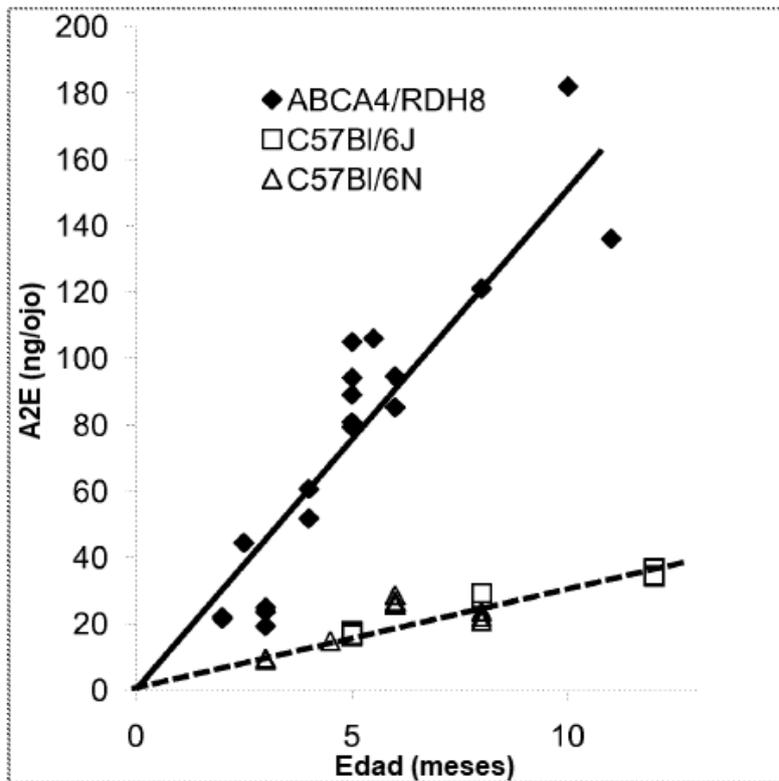


Fig. 5

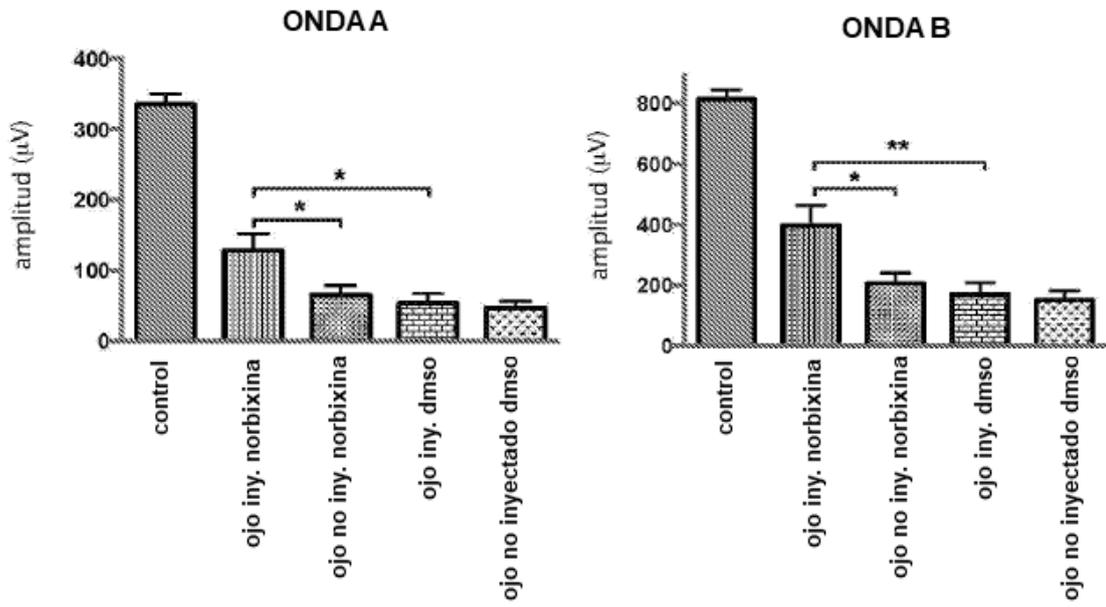


Fig. 6

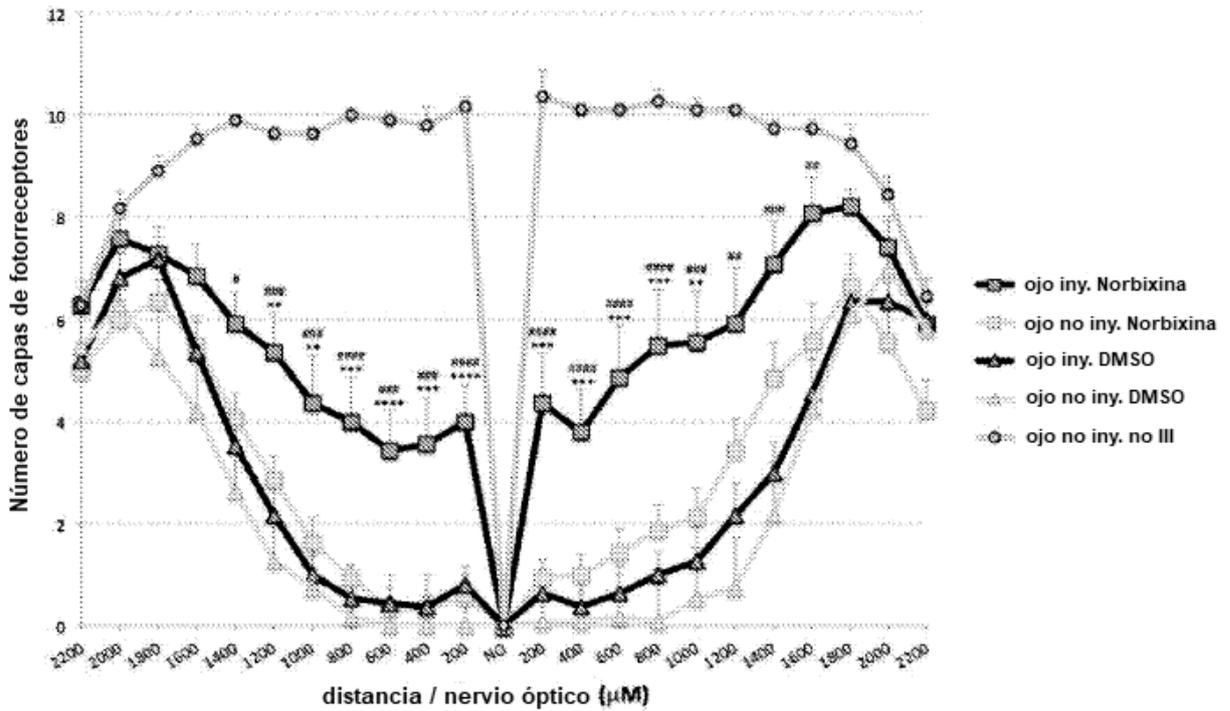


Fig. 7

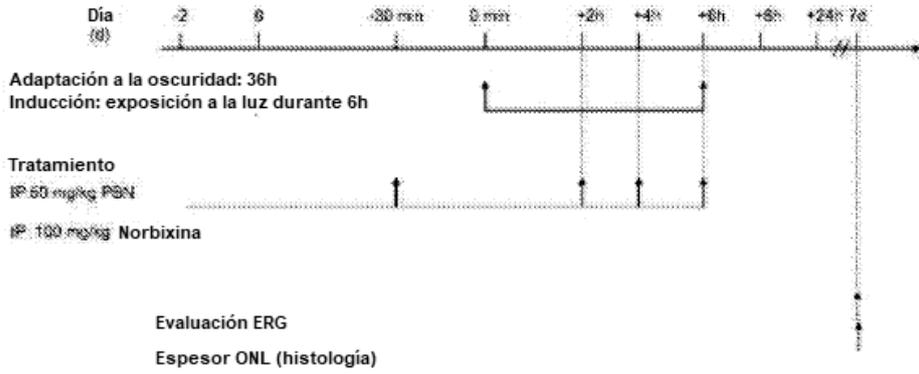


Fig. 8A

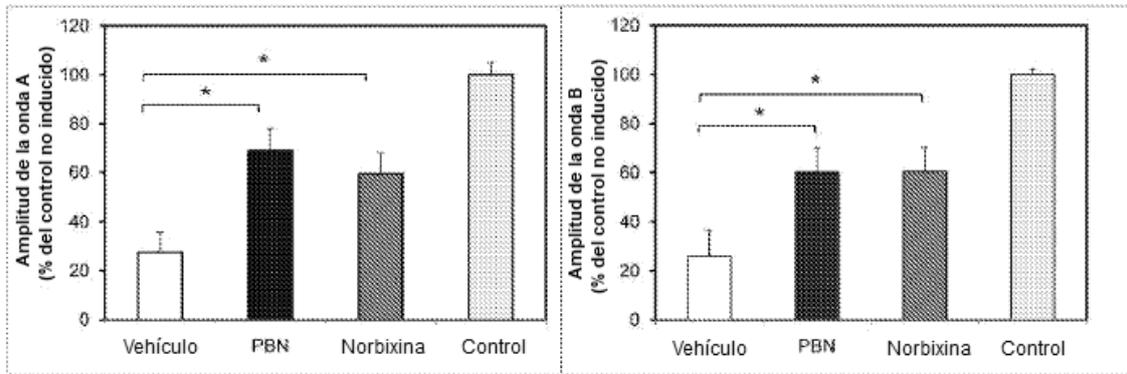


Fig. 8B

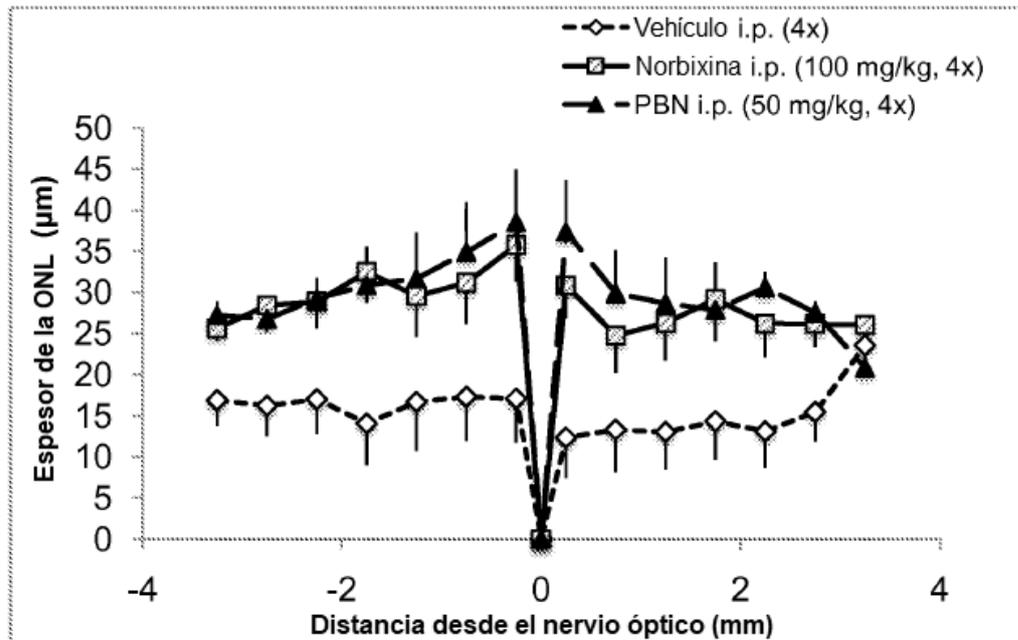


Fig. 9A

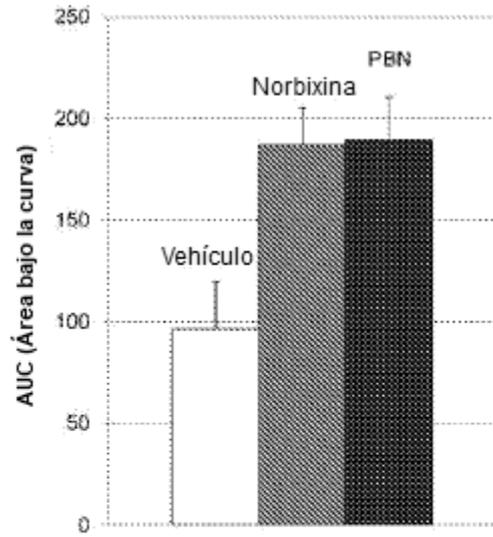


Fig. 9B

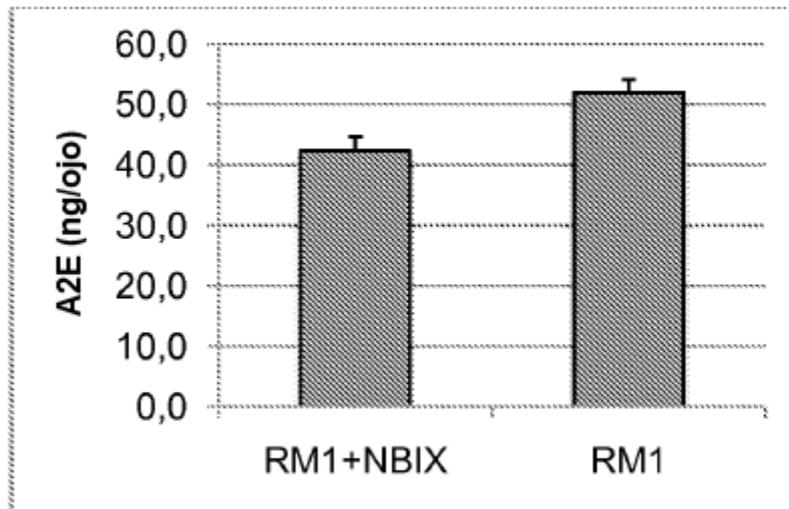


Fig. 10

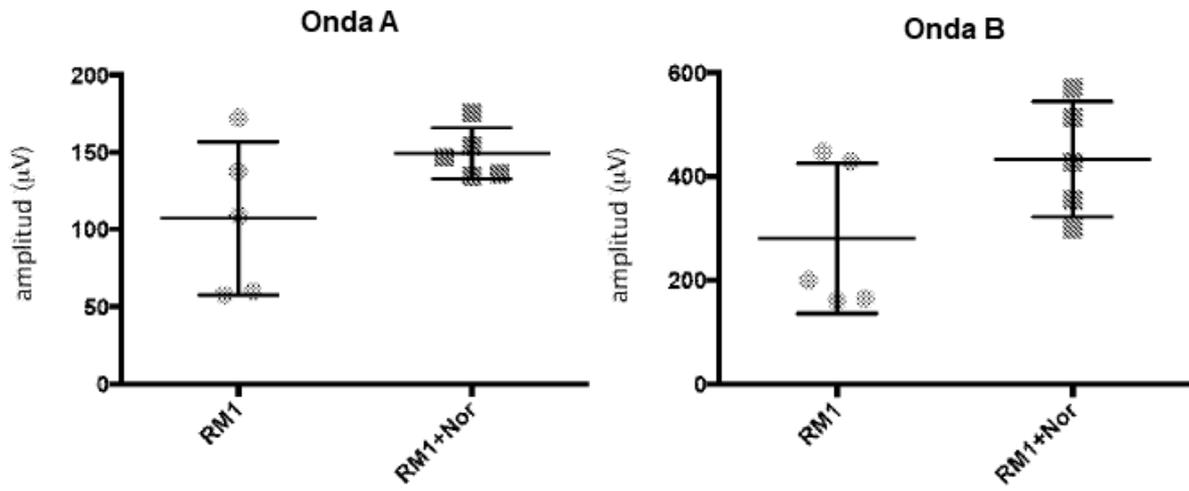


Fig. 11

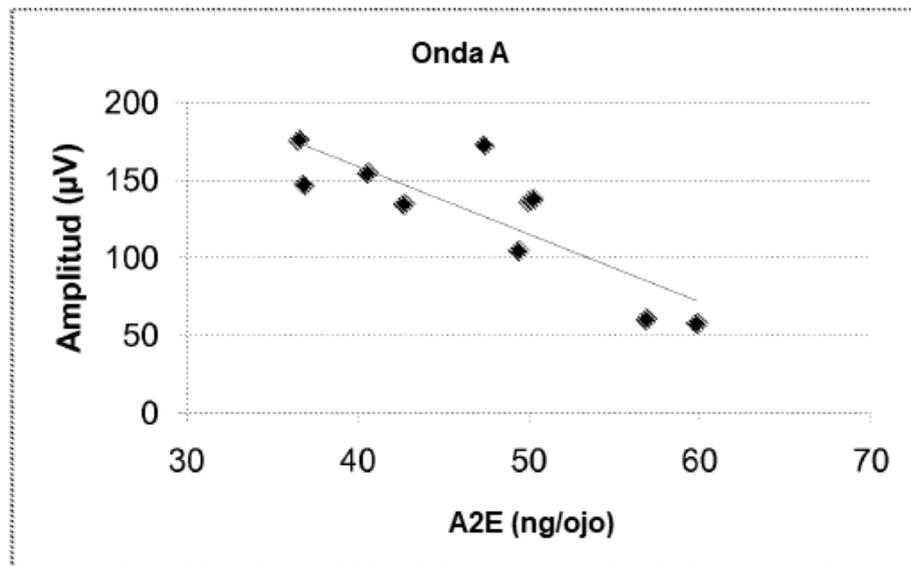


Fig. 12

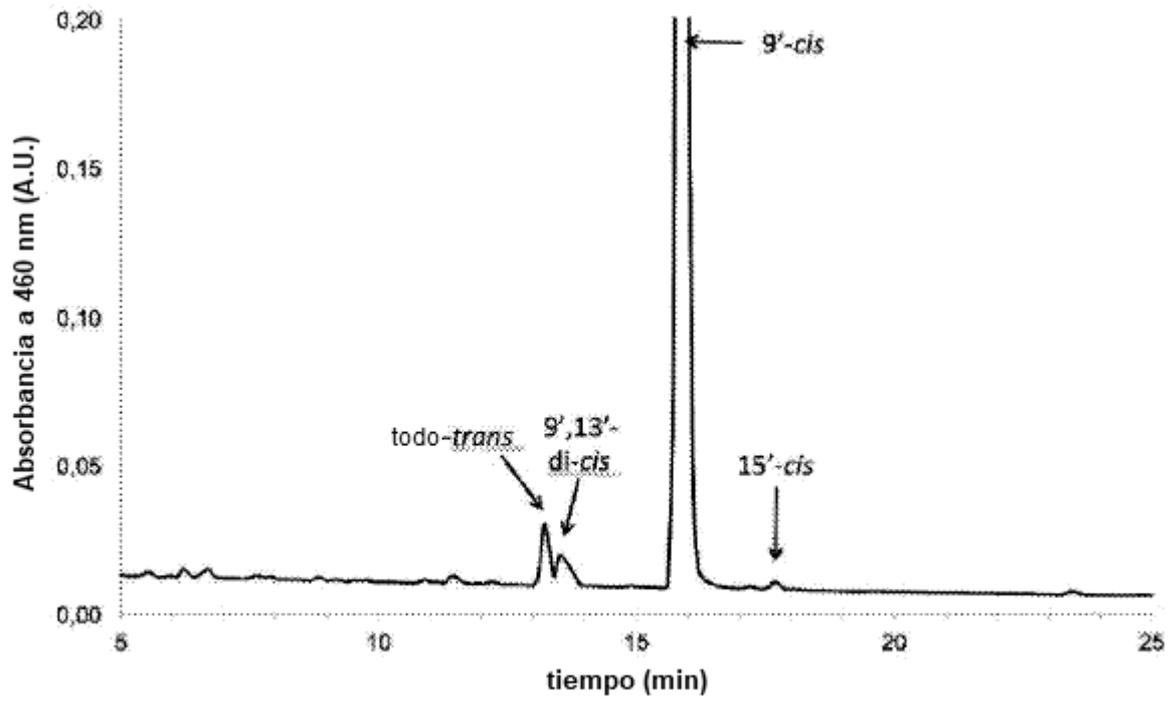


Fig. 13