

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 025**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/48** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2016** E 16382138 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** EP 3225245

54 Título: **Extracto bioactivo obtenido de vicia faba y su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2020**

73 Titular/es:

**EUROESPES, S.A. (100.0%)**  
**Centro de Investigación Biomédica EuroEspes,**  
**Sta. Marta de Babío S/N**  
**15165 Bergondo (A CORUÑA), ES**

72 Inventor/es:

**CACABELOS GARCIA, RAMON**

**ES 2 763 025 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

Extracto bioactivo obtenido de vicia faba y su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se encuadra en el campo de las Neurociencias, específicamente dentro de los extractos bioactivos obtenidos por procedimientos biotecnológicos a partir de fuentes vegetales, los cuales presentan actividad pro-dopaminérgica y neuroprotectora siendo así útiles para el tratamiento y/o prevención de aquellas patologías neurológicas asociadas a alteraciones en el sistema dopaminérgico, particularmente a una reducción en los niveles de dopamina, tales como la enfermedad de Parkinson u otros síndromes parkinsonianos.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno más frecuente dentro de la categoría de desórdenes del movimiento, así como la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente en la población, tan sólo superada por la enfermedad de Alzheimer. Se estima que 6,3 millones de personas la padecen en el mundo. Su incidencia y prevalencia aumentan con la edad afectando al 1-2% de los mayores de 60 años (edad media de comienzo de la patología) y se eleva al 4% en los mayores de 80 años. Se prevé que estas cifras se tripliquen en los próximos 50 años debido en gran parte al envejecimiento poblacional.

Principalmente, la EP aparece como consecuencia de una lenta y progresiva degeneración de neuronas dopaminérgicas en el área ventral de la *pars compacta* de la sustancia negra. Ello supone una reducción de señales nerviosas en el circuito córtico-estriato-talámico con los consiguientes síntomas motores característicos de esta enfermedad. Las manifestaciones clínicas comienzan cuando aproximadamente tres cuartas partes de las neuronas dopaminérgicas mueren en esta región. Asimismo suele producirse una pérdida neuronal en otros núcleos subcorticales (Núcleo Basal de Meynert, *Locus Coeruleus*, Nucleo de Rafe), y formaciones de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas residuales. Se ha postulado que esta neurodegeneración podría estar relacionada con mecanismos de estrés oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis, disfunción mitocondrial, inflamación y afectación del sistema ubiquitina-proteasoma.

La causa final de estas alteraciones neuropatológicas es desconocida, aunque actualmente la hipótesis que acumula mayor evidencia es la que sugiere una interacción de factores ambientales y genéticos. Tanto las formas de inicio temprano como el parkinsonismo juvenil son generalmente hereditarias y se deben a mutaciones genéticas. El resto de tipologías están sustentadas tanto en la presencia de ciertos polimorfismos genéticos asociados a una mayor vulnerabilidad a padecer la enfermedad (por ejemplo los genes que codifican la sinucleína  $\alpha$ , la parkina o la ubiquitina terminal-C hidrolasa terminal L1, entre otros), en genes que tienen un papel mediador en el proceso patológico o que están implicados en cascadas multifacéticas y diversas reacciones metabólicas, así como en la aparición de diversos mecanismos ambientales relacionados con la dieta, el consumo de tabaco, la exposición a sustancias tóxicas, traumatismos, episodios isquémicos, etc.

Aunque la enfermedad de Parkinson es un síndrome complejo con afectación de multitud de áreas, es la sintomatología motora la que se considera prototípica de esta enfermedad. El diagnóstico clínico sitúa como cardinales las siguientes manifestaciones: temblor de reposo, rigidez, inestabilidad postural y bradicinesia y acinesia. Para hacer un diagnóstico de parkinsonismo, al menos dos de los síntomas cardinales deben estar presentes y además uno de ellos debe ser el temblor o la rigidez. Estas manifestaciones suelen tener un comienzo unilateral, un curso progresivo y asimétrico en el que la mayor afectación coincide por el lado de inicio de los síntomas y suelen verse exacerbadas por situaciones de estrés y ansiedad. Además de los síntomas motores, los pacientes con EP pueden presentar disfunción del sistema nervioso autónomo, trastornos sensitivos, afectación cognitiva, alteraciones neuropsiquiátricas o alteraciones del sueño.

Para caracterizar el cuadro clínico de una manera precisa de cara al tratamiento farmacológico, al seguimiento o a la investigación, es necesaria la aplicación de herramientas psicométricas que permitan tipificar y conocer la severidad de la afectación cognitiva y psicomotora, así como su subyacente repercusión funcional y los posibles síndromes psicológicos concomitantes. Es común que esta valoración se apoye en la administración de escalas multidimensionales que cuantifican en conjunto el grado de deterioro del paciente y aportan información de su funcionamiento en los dominios que prototípicamente están afectados en esta enfermedad. Entre los instrumentos más destacados podemos encontrar: *UPDRS* -United Parkinson's Disease Scales-, *ISAPD*- Intermediate Scale for Assessment of Parkinson Disease y *SCOPA*- Scale for Outcomes in Parkinson Disease. No obstante, especialmente en los casos dudosos o atípicos donde el diagnóstico diferencial es crucial, resulta importante que el examinador complemente estas baterías con escalas específicas que cubran de manera más profunda las funciones alteradas en esta enfermedad (fluencia verbal, habilidades visuoespaciales, funciones ejecutivas, procesos atencionales, memoria, motricidad, etc.) o abarquen un espectro neuropsicológico mayor.

Aunque el manejo de la EP requiere terapias complementarias centradas en la educación, ejercicio y nutrición, es la intervención farmacológica el tratamiento de elección para el abordaje de esta patología y según la Academia de Neurología Americana debe iniciarse una vez que se detecta en los pacientes una afectación significativa de la funcionalidad. El tratamiento clásico de la enfermedad de Parkinson consiste en corregir el déficit del neurotransmisor dopamina, deficitario en los ganglios de la base de pacientes con enfermedad de Parkinson y síndromes parkinsonianos, con el objetivo de aliviar los síntomas motores cardinales (Smith *et al.*, 2012, *Neuropsychopharmacology*, 37: 213-246). En este sentido, se busca una reposición de la dopamina a partir de la administración de su precursor L-DOPA o de principios activos que aumentan la actividad de ese neurotransmisor al estimular los receptores dopaminérgicos (agonistas dopaminérgicos).

En 1910-1911, Torquato Torquati aisló L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), el L-isómero del amino ácido D-dihidroxifenilalanina, en el haba de *Vicia faba* (Torquati T., 1913, *Arch Farmacol sper*, 15:213-223).

En 1913, Markus Guggenheim aisló la sustancia y definió su estructura química. En 1938, Peter Holtz descubrió la L-DOPAdeescarboxilasa, el enzima que transforma L-DOPA en dopamina. En 1957, Kathleen Montagu, y Weil-Malherbe y Bone demostraron la presencia de dopamina en diferentes tejidos de mamíferos, incluido cerebro. Al mismo tiempo, Holtz demostró el efecto estimulador de L-DOPA y postuló que la dopamina era el metabolito activo de la L-DOPA en cerebro. En 1957, Carlsson demostró que L-DOPA antagonizaba el efecto tranquilizante de reserpina, causante de un síndrome parkinsoniano en animales de experimentación. En 1957, Pletscher demostró que L-DOPA aumentaba los niveles cerebrales de catecolaminas, especialmente dopamina. En 1959, los grupos de Bertler y Rosengren y Sano demostraron que la dopamina se localizaba en el núcleo caudado y putamen, y postularon que la dopamina podría estar involucrada en el síndrome parkinsoniano causado por reserpina. En 1960, Hornykiewicz demostró que el déficit de dopamina en núcleo caudado y putamen era responsable de la enfermedad de Parkinson. En 1967, Cotzias introdujo el tratamiento crónico con L-DOPA como el tratamiento standard de la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 2010, *J. Neurol.*, Suppl. 2: S249-S252).

Estudios previos con *Vicia faba* en enfermedad de Parkinson divulgan la presencia de L-DOPA en el haba de esta leguminosa (Rabey *et al.*, 1992, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 55(8): 725-727; Apaydin *et al.*, 2000, *Mov. Disord.*, 15(1): 164-166), aunque los procedimientos desarrollados para extraer dicha molécula a partir de esta fuente natural han resultado en bajos rendimientos, ya que el contenido en L-DOPA alcanzado al final del proceso está alrededor de 5 mg/g.

Por otro lado, existen otros fármacos que tratan de obtener el mismo efecto mediante la inhibición de enzimas que destruyen la dopamina como la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoamino-oxidasa tipo B (MAOB) (Chávez-León, Ontiveros-Uribe y Carrillo-Ruiz, 2013, *Salud Ment.*, 36: 315-324).

Dentro de esta estrategia farmacoterapéutica, la levodopa es el tratamiento más efectivo y el que consigue mejoras más importantes en la funcionalidad del paciente (Gazewood, Richards y Clebak, 2013, *Am. Fam. Physicia.*, 87: 267-273); sin embargo, el mantenimiento de este tratamiento implica la aparición de fluctuaciones motoras y discinesias en un plazo de 3 a 5 años (o incluso antes si el tratamiento se inicia de forma temprana o a dosis demasiado altas). Los agonistas dopaminérgicos, mientras que son menos proclives a generar estos efectos, tienen importantes reacciones adversas no motoras (náuseas y vómitos, alucinaciones, confusión, somnolencia o ataques de sueño, hipotensión, trastornos del control de impulsos) (Fernández, 2012, *Cleve. Clin. J. Med.*, 79: 28-35). En el caso de los medicamentos inhibidores de la MAO-B, encontramos el perfil opuesto: sus efectos secundarios son más reducidos, pero también lo es su efectividad. Además, el uso de estos fármacos requiere tener precaución con otros medicamentos (como las anfetaminas) y alimentos. Por otro lado, existe cierta evidencia de que el uso de inhibidores de la COMT como la tolcapona aumenta la toxicidad en el hígado y que la entacapona supone un mayor riesgo cardiovascular y para el cáncer de próstata.

Además de los agentes dopaminérgicos, se vienen utilizando fármacos anticolinérgicos para relajar la musculatura lisa y así reducir el temblor, la sialorrea y la distonía. No obstante, tienen escasa eficacia en el resto de los síntomas (rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural), pueden alterar la capacidad de aprendizaje y agravar el deterioro cognitivo, y presentan sustanciales efectos secundarios (estreñimiento, retención urinaria, sequedad ocular y de boca, visión borrosa).

Por tanto, el desarrollo de importantes efectos secundarios tanto motores como no motores en respuesta a todos los tipos de terapia antiparkinsoniana disponibles en la actualidad, así como la evidencia de que ninguno de estos medicamentos ha demostrado tener un efecto neuroprotector, pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos productos que permitan una potenciación de la dopamina sin suponer graves efectos nocivos en otros sistemas corporales, y por tanto puedan ser empleados de forma prolongada tanto a nivel sintomático como preventivo. Se requieren, por tanto, nuevas formas de intervención terapéutica en pacientes con daño cerebral en el sistema dopaminérgico, que conduce a la expresión clínica de la enfermedad de Parkinson y/o diversas presentaciones de trastornos del movimiento cuyo denominador común es un síndrome parkinsoniano.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un bioproducto o extracto bioactivo obtenido a partir de la vaina de *Vicia faba*, denominado por los inventores E-PodoFavalin-15999 o Atremorine, que presenta actividad pro-dopaminérgica, antiinflamatoria, antioxidante y neuroprotectora, mejorando así la supervivencia de neuronas dopaminérgicas. Por ello, este bioproducto se propone en esta invención para el tratamiento y/o prevención de trastornos neurológicos asociados a una reducción en los niveles de dopamina, tales como enfermedad de Parkinson y otros síndromes parkinsonianos de diversa naturaleza.

La presente invención supone por tanto una solución a la necesidad de disponer de una forma nueva de intervención terapéutica en pacientes con daño cerebral en el sistema dopaminérgico, que conduce a la expresión clínica de enfermedad de Parkinson y/o diversas presentaciones de trastornos del movimiento cuyo denominador común es un síndrome parkinsoniano.

Este bioproducto se obtiene mediante un proceso biotecnológico no desnaturalizante de la vaina de diferentes especies de *Vicia faba*, y como muestran los ejemplos de la presente invención presenta las siguientes propiedades: (i) actividad neurotrófica cerebral sobre diferentes perfiles neuronales; (ii) actividad neuroprotectora selectiva sobre neuronas dopaminérgicas; (iii) actividad antioxidante neuronal; (iv) actividad anti-degenerativa neuronal; (v) actividad anti-degenerativa y regeneradora en modelos animales de enfermedad de Parkinson; (vi) mejoría psicomotriz (locomoción, coordinación de movimientos, agilidad motora) en modelos animales de enfermedad de Parkinson; (vii) incremento de la síntesis de dopamina (actividad pro-dopaminérgica) en más del 98% de los pacientes con enfermedad de Parkinson o con síndromes parkinsonianos de diferente naturaleza (tóxica, traumática, degenerativa, isquémica); (viii) regulación hormonal (hipotálamo-hipofisaria) dependiente de la neuromodulación dopaminérgica; (ix) regulación específica de noradrenalina, prolactina, hormona de crecimiento y cortisol, y (x) efectos terapéuticos personalizados en función del perfil farmacogenético de los pacientes. Estas propiedades se demuestran en la presente invención mediante 3 tipos de estudios: (a) estudios *in vitro*, (b) estudios *in vivo* (modelos animales), y (c) estudios clínicos en pacientes con enfermedad de Parkinson y con diversos síndromes parkinsonianos. Además, es destacable que dicho bioproducto no ha presentado efectos adversos en los pacientes durante el desarrollo de los ensayos *in vivo*.

Por todas estas propiedades, el bioproducto E-PodoFavalin-15999 está indicado en patologías como: (i) enfermedad de Parkinson, (ii) síndromes parkinsonianos, (iii) síndromes extrapiramidales, (iv) enfermedades que cursen con déficit de dopamina o noradrenalina, (v) otras enfermedades neurodegenerativas (como enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Huntington), (vi) trastornos psicomotrices, (vii) enfermedades que cursen con incremento en la secreción de prolactina (PRL); (viii) enfermedades que cursen con incremento en la producción de hormona de crecimiento (GH); (ix) síndromes estresantes con incremento de la producción de cortisol; y (x) cualquier condición fisiológica y/o patológica que altere la producción de dopamina, noradrenalina, PRL, GH o cortisol.

Mientras que los trabajos realizados y divulgados con anterioridad se centran en el estudio químico del haba de *Vicia faba*, los inventores de la presente invención han desarrollado un procedimiento a partir de la vaina, cuyas propiedades no habían sido estudiadas hasta la fecha. Este procedimiento conduce a un bioproducto que presenta las propiedades mejoradas descritas más arriba y que además presenta la característica ventajosa de que comprende al menos 20 mg/g de L-DOPA, en comparación con los 5 mg/g que se habían obtenido hasta la fecha mediante otros procedimientos que parten del haba. Así, se demuestra por primera vez el alto contenido en L-DOPA de la vaina de *Vicia faba* antes de la fase madurativa, así como sus propiedades biomédicas en modelos animales y en pacientes con enfermedad de Parkinson. Como ya se ha comentado, los estudios previos con *Vicia faba* en enfermedad de Parkinson se refieren a las propiedades del haba, pero no contemplan las propiedades de la vaina. Además, dichos estudios previos generalmente se realizan con el haba cocinada, con lo cual se alteran las propiedades del producto (Osman *et al.*, 2014, J. Food Sci. Technol., 51(8): 1554-1560). En el caso de la presente invención, todo el proceso de elaboración de E-PodoFavalin-15999 se realiza en frío, con lo cual el producto final conserva todas las propiedades naturales y biomédicas de la vaina de *Vicia faba*, sustrato exclusivo de E-PodoFavalin-15999.

Como muestran los ejemplos de la presente invención, E-PodoFavalin-15999 es un poderoso inductor de la síntesis de dopamina debido al alto contenido que el producto tiene en L-DOPA (al menos 20 mg/g), a diferencia del haba, cuyo contenido en L-DOPA está alrededor de 5 mg/g. Por otro lado, el efecto neurotrófico, antioxidante y anti-inflamatorio de E-PodoFavalin-15999 es atribuible a otros metabolitos primarios y secundarios presentes en este extracto, como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, alcaloides, terpenoides, jasmonatos y polifenoles. La vaina de *Vicia faba* tiene además un alto contenido en flavonoides y actividad anti-oxidante. Otros componentes de E-PodoFavalin-15999 con propiedades biomédicas podrían ser el ácido abscísico o las betalainas, pigmentos hidrosolubles cuyo principal componente estructural, el ácido betalámico, se forma a partir del aminoácido 4,5-dihidroxifenilalanina por acción del enzima 4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa. La vicina [2,6-diamino-4,5-dihidroxipirimidine-5-( $\beta$ -D-glucopiranosido)] y la convicina [2,4,5-trihidroxi-6-aminopiridina-5-( $\beta$ -D-glucopiranosido)] son compuestos fenólicos de taninos condensados que están presentes en *Vicia faba*, comportándose como compuestos antinutricionales. Los aglucones (divicina e isouramilo) de estos dos glucósidos pirimidínicos son los

agentes responsables del fabismo, una enfermedad genética que causa anemia hemolítica en varones deficientes en glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (EC.1.1.49, G6PD) eritrocitaria. E-PodoFavalin-15999 contiene niveles residuales de vicina y convicina, por debajo de 1-2 mg/g. Por lo tanto, otra de las ventajas del bioproducto de la invención es que la ausencia de vicina y convicina en el mismo elimina todo riesgo de fabismo en las personas que consuman este producto aunque sean deficientes en G6PD.

Por todo lo indicado más arriba, la presente invención representa una mejora frente a las estrategias terapéuticas empleadas hasta la fecha para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, particularmente frente a otros bioproductos similares obtenidos a partir del haba de *Vicia faba* que también contienen L-DOPA.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento, de ahora en adelante "procedimiento de la invención", para obtener un extracto bioactivo de la vaina de *Vicia faba* que comprende las siguientes etapas:

- a. recolectar el fruto de un cultivo de *Vicia faba* en fase de crecimiento,
- b. eliminar las habas del fruto recolectado en la etapa (a) y tratar la vaina mediante un tratamiento que comprende los pasos de higienización, aseptización y eliminación de elementos contaminantes,
- c. conservar el producto obtenido en la etapa (b) a una temperatura de entre 0°C y 5 °C durante entre 24 y 48h,
- d. ultracongelar el producto obtenido tras la etapa (c) a entre -50°C y -30 °C, preferiblemente a -40°C, durante entre 1 y 3 horas,
- e. almacenar el producto obtenido tras la etapa (d) a una temperatura inferior a -18°C, durante un periodo inferior a 3 meses,
- f. liofilizar el producto obtenido tras la etapa (e) preferiblemente durante entre 3 y 5 días, y
- g. estandarizar el contenido en L-DOPA del producto obtenido tras la etapa (f) de manera que presente un contenido final de L-DOPA de al menos 20 mg/g.

El cultivo al que se refiere la etapa (a) del procedimiento de la presente invención se siembra, preferiblemente, en primavera-verano y la recolección del fruto se realiza, más preferiblemente, en diciembre-enero. Se entiende por "fase de crecimiento" cualquier estadio del cultivo previo a la entrada en la fase madurativa. Los expertos en la materia reconocerán dichas fases de desarrollo del cultivo. Preferiblemente, la recolección se produce cuando las vainas estén todavía verdes y antes de que la piel de las semillas empiece a volverse áspera. En una realización más preferida del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el fruto se recolecta de 2 a 3 semanas antes de que el cultivo entre en la fase madurativa. Esta etapa de recolección es una etapa clave para la posterior obtención del extracto bioactivo o producto final (E-PodoFavalin-15999), tanto para la estandarización de los niveles de L-DOPA como para la estabilidad de los efectos terapéuticos del bioproducto final.

El nombre común o vulgar de *Vicia faba* es habas verdes. Pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Rosidae, orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, tribu Fabeae, género *Vicia*, especie *V. faba*. Su nombre científico es *Vicia faba* (sinónimos: *Faba bona Medik.*, *Faba equina Medik.*, *Faba faba (L.)Housa*, *Faba major Desf.*, *Faba minor Roxb.*, *Faba sativa Bernh.*, *Faba vulgaris Moench*, *Orobis faba Brot.*, *Vicia esculenta Salisb.*, *Vicia vulgaris Gray*). Pertenece a la familia de las Leguminosas.

El "fruto" es una legumbre que posee una vaina alargada de longitud variable entre preferiblemente 10 y 30 cm y consistencia carnosa, con un tabique esponjoso con una especie de pelo afelpado o falso tabique entre las semillas siendo éstas más o menos aplastadas. Dentro de esta vaina se ubican las semillas o habas dispuestas en fila. La vaina, de color verde en estado inmaduro, se oscurece y se vuelve pubescente al secarse. Los granos en el interior de la misma varían entre preferiblemente 2 y 9. Las semillas son oblongas, de tamaño más o menos grande, dependiendo también de la variedad, y de color verde amarillento que luego, al sobremadurar, se vuelve bronceado. También hay variedades de grano negruzco y morado. El peso de una semilla es preferiblemente de uno a dos gramos. El poder germinativo dura preferiblemente de 4 a 6 años. En la semilla comercial el porcentaje mínimo de germinación es del 90% y la pureza mínima del 99%. Por tanto, en la presente invención se entiende por "fruto" la legumbre de *Vicia faba* que comprende una vaina y semillas o habas en su interior, y por "haba" cada una de las semillas que la vaina de *Vicia faba* presenta en su interior.

La planta de *Vicia faba* tiene porte recto y erguido, con tallos fuertes y angulosos de hasta preferiblemente 1,6 m de altura. Muestra hojas alternas, paripinnadas y compuestas, con folíolos anchos de forma oval-redondeada, color verde oscuro, sin zarcillos; el foliolo terminal no existe o se convierte en un zarcillo rudimentario. Las flores se presentan en racimos de preferiblemente 2 a 8, axilares las cuales son fragantes y grandes, alcanzando preferiblemente los 4 cm, con pétalos blancos manchados de violeta, púrpura o negro. Son hermafroditas, y la planta es capaz de autopolinizarse. La raíz de *Vicia faba* crece en profundidad hasta alcanzar un largo similar al del tallo de la planta. Como otras fabáceas, los nódulos de la misma tienen la propiedad de fijar nitrógeno en el suelo; aunque hasta un 80% del mismo es consumido por la propia planta, el 20% restante mejora la fertilidad de la tierra.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, el cultivo de *Vicia faba* es un cultivo ecológico. Se entiende por “cultivo ecológico” en la presente invención un cultivo en el que no se emplea ningún producto químico para el tratamiento de la planta o de la tierra, tales como pesticidas o herbicidas.

5 En cuanto a las condiciones preferidas de cultivo de *Vicia faba*, aunque esta planta no es de las más exigentes son preferidas temperaturas uniformes templado-cálidas y los climas marítimos son preferidos por encima de los continentales. La temperatura óptima es de preferiblemente 15°-22° C. En cuanto al tipo de suelo, se puede cultivar en cualquier suelo bien drenado. Es poco exigente, aunque son preferidos suelos arcillosos o silíceos y arcillosos calizos ricos en humus, profundos y frescos. Le perjudican los suelos húmedos mal drenados. El pH óptimo oscila  
10 entre preferiblemente 7,3 y 8,2. En climas fríos su siembra se realiza preferiblemente en primavera. La época de siembra está ligada al clima y se realiza desde agosto-septiembre en cultivos precoces hasta noviembre, y en las zonas de interior se siembran en primavera. La siembra se realiza preferiblemente a chorrillo, a golpe, a mano o con sembradora. Las semillas se disponen preferiblemente en líneas o caballones, con una distancia entre líneas de entre preferiblemente 50-60 cm y 25-30 cm entre plantas. La nascencia se produce a los 8-12 días, dependiendo de la temperatura. Las semillas más grandes se siembran a preferiblemente 5 cm de profundidad y a preferiblemente 25 cm de distancia entre sí, en una tierra bien removida y abonada.

Existen las siguientes variedades de habas verdes: Aguadulce (Sevillana) (semitemprana, tallos violetas, vainas grandes alargadas, granos de color crema tostada), Muchamiel (muy precoz, planta de porte medio, tallos rojizos, vainas colgantes, grano color crema tostada), Reina Blanca (menos precoz que Muchamiel, granos color blanco grisáceo), Granadina (semillas claras), Reina Mora (semillas púrpura), Arbo (también llamada Blanca erguida, granos blancos, tallos verdes), Mahón (dos modalidades blanca y morada, la blanca tiene granos rojizos y la morada, violáceos; porte medio, semi-erguido). Atendiendo al tamaño de sus semillas o habas, *Vicia faba* se clasifica en tres variedades: *Vicia faba* var. *minor*, las semillas son pequeñas, pesando entre 0,3 y 0,7 g cada una, y de forma elipsoidal, la vaina es cilíndrica y alcanza los 15 cm de largo; *Vicia faba* var. *Equina*, las semillas son de tamaño mediano y chatas, pesando entre 0,7 y 1,1 g, las vainas son moderadamente dehiscentes; *Vicia faba* var. *major*, la más usada para consumo fresco, las semillas pesan entre 1,2 y 1,8 g, la vaina es indehiscente y alcanza los 35 cm de largo. El cultivo más extendido, el llamado *aguadulce*, pertenece a esta variedad.

30 En otra realización preferida del procedimiento de la invención, el cultivo de *Vicia faba* al que se hace referencia en la etapa (a) es de la variedad Muchamiel, es decir, de *Vicia faba* L. (sp. var. MM). Previamente al paso (a) del procedimiento de la presente invención, se puede llevar a cabo un paso opcional de tipificación y caracterización genética de diferentes cepas de *Vicia faba*, con el objetivo de seleccionar posteriormente la variante, preferiblemente la variante muchamiel (MM), para cultivo con máximo rendimiento germinativo.

35 En el paso (b) del procedimiento de la invención se eliminan todos los componentes del haba. E-PodoFavalin-15999 es un bioproducto derivado de los componentes de la vaina de *Vicia faba*. Por ello, en este paso de extracción se eliminan todos los componentes del haba. Este tratamiento selectivo de la vaina es fundamental para preservar el contenido de L-DOPA y el resto de componentes naturales que integran la estructura orgánica final de E-PodoFavalin-15999. El paso (b) comprende, por tanto, un procedimiento de tratamiento selectivo de la vaina que comprende los pasos de higienización, aseptización y eliminación de elementos contaminantes. La “higienización” es un lavado de la vaina, preferiblemente un lavado rápido, más preferiblemente con chorro de agua clorada a presión. La “aseptización” es un procedimiento de selección del producto (vainas) óptimo, descartando el producto dañado y/u oxidado. El último paso de “eliminación de elementos contaminantes” comprende la eliminación de los residuos, preferiblemente mediante lavado y posterior secado rápido de la materia prima (vainas) seleccionada.

50 Durante el paso (c) del procedimiento de la invención, se conserva el producto a, preferiblemente 0°C, durante 24-48 h. Todo el proceso de extracción de E-PodoFavalin-15999 se realiza en frío. Temperaturas superiores a los 5°C desnaturalizan el producto y eliminan sus propiedades.

Durante el paso (d) de ultracongelación, el producto se ultracongela a, preferiblemente, -40°C, durante entre 1 y 3 horas. Este es un paso fundamental para estabilizar posibles mecanismos enzimáticos que desnaturalicen el producto.

55 Durante el paso (e) de almacenamiento del producto, éste se mantiene a, preferiblemente, -20°C, durante un periodo inferior a 3 meses. Hasta la etapa posterior de liofilización, el producto debe ser mantenido a temperaturas inferiores a los -18°C.

60 La etapa (f) de liofilización industrial del producto se lleva a cabo preferiblemente durante entre 3 y 5 días. Este proceso de liofilización comprende tres fases: (1) Fase de Ultracongelación a preferiblemente -80°C durante preferiblemente 12 horas, para generar una matriz congelada rica en estructuras cristalinas que faciliten el proceso de sublimación; (2) Fase de Sublimación o disecación primaria en vacío durante preferiblemente 24 a 48 horas, hasta reducir el contenido de agua del producto a un nivel preferiblemente del 3-5%; y (3) Fase de Desorción o

disecación secundaria bajo temperatura controlada durante preferiblemente 3 a 5 días, hasta que el contenido de humedad en el interior del producto esté próximo a 0 (<0.5%).

A continuación, se lleva a cabo un proceso de tratamiento no desnaturalizante post-liofilización del producto obtenido tras la etapa (f). Este proceso de tratamiento post-liofilización comprende un paso opcional de análisis de la composición química del producto y un paso de estandarización del contenido en L-DOPA. Este paso de "estandarización" se realiza mediante la homogenización de lotes hasta alcanzar un contenido promedio adecuado de L-DOPA. Tras este paso de estandarización, el producto debe presentar un contenido final de L-DOPA de al menos 20 mg/g, preferiblemente 25 mg/g.

En una realización más preferida, el procedimiento de la invención además comprende una etapa (h) de homogeneización del producto obtenido tras la etapa (g) que comprende estandarizar la textura y aspecto del producto final mediante un tratamiento físico neutro. Este "tratamiento físico neutro" comprende preferiblemente los pasos de molienda y filtrado.

En una realización aún más preferida del procedimiento de la invención éste además comprende una etapa (i) de formulación en la que se añaden entre 0,020 g y 0,040 g de D-Alfa-Tocoferol. En esta etapa se añaden, preferiblemente, 0,033 g de D-Alfa-Tocoferol, equivalentes a 12 mg de vitamina E (Tocoferol) 100% CDR.

El resultado final del procedimiento de la invención es un extracto bioactivo o bioproducto, denominado en la presente invención "E-PodoFavalin-15999" o "Atremorine", que se presenta preferiblemente en forma de polvo pardo-verduzco homogéneo y que puede incluirse en cuatro formatos: (i) cápsulas de 250 mg, (ii) bolsas de 5 grs., (iii) botes de 75 grs., y (iv) botes de 150 grs.

Este producto final, en sus diferentes presentaciones, contiene una concentración de L-DOPA de al menos 20 mg/g y niveles de Vicina y Convicina inferiores a 1-2 mg/g.

Otro aspecto de la invención se refiere a un extracto bioactivo, de ahora en adelante "extracto bioactivo de la invención", "extracto de la invención", "bioproducto de la invención", "Atremorine" o "E-PodoFavalin-15999", obtenido u obtenible mediante el procedimiento de la invención. Preferiblemente, dicho extracto de la invención está en forma de polvo.

En una realización preferida, el extracto bioactivo de la invención comprende una cantidad de L-DOPA de al menos 20 mg/g y unas cantidades de vicina y convicina inferiores a 2 mg/g, preferiblemente inferiores a 1 mg/g.

En otra realización preferida, el extracto bioactivo de la invención comprende la siguiente composición:

- a. Entre un 60% y un 70%, preferiblemente un 65%, de carbohidratos,
- b. Entre un 10% y un 20%, preferiblemente un 17%, de proteínas,
- c. Entre un 0,5% y un 1%, preferiblemente un 0,7%, de grasas,
- d. Entre un 15% y un 25%, preferiblemente un 20%, de fibra dietética,
- e. Menos de 3ppm de gluten,
- f. Entre un 5% y un 10%, preferiblemente un 9%, de humedad,
- g. Entre un 3% y un 8%, preferiblemente un 6%, de cenizas,
- h. Entre 400 y 500 mg/100g, preferiblemente 440 mg/100 g, de calcio,
- i. Entre 5 y 15 mg/100g, preferiblemente 10 mg/100 g, de hierro,
- j. Entre 200 mg/100 g y 250 mg/100 g, preferiblemente 205 mg/100 g, de magnesio,
- k. Entre 1mg/100g y 3mg/100g, preferiblemente 2 mg/100 g, de manganeso,
- l. Entre 1500 y 2000 mg/100 g, preferiblemente 1800 mg/100 g, de potasio,
- m. Entre 300 y 400 mg/100g, preferiblemente 385 mg/100 g, de sodio,
- n. Entre un 10% y un 20%, preferiblemente un 15%, de aminoácidos:
  - Aspártico: entre 3% y 4%, preferiblemente 3,52%
  - Glutámico: entre 2% y 3%, preferiblemente 2,30%
  - Arginina: entre 1% y 2%, preferiblemente 1,20%
  - Leucina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,96%
  - Isoleucina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,42%
  - Lisina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,87%
  - Tirosina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,86%
  - Treonina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,86%
  - Serina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,83%
  - Alanina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,73%
  - Prolina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,70%
  - Glicina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,61%
  - Fenilalanina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,57%

Valina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,37%

Histidina: entre 0,2% y 1%, preferiblemente 0,31%

o. Al menos 20 mg/g, preferiblemente 25 mg/g, de L-DOPA,

p. Entre 2 y 3 mg/g, preferiblemente 2,4 mg/g, de vitamina E,

5 q. Menos de un 1% de vicina,

r. Menos de un 1% de convicina,

s. Menos de un 1% de lecitina,

t. Menos de un 1% de colina.

10 El valor energético del extracto bioactivo de la invención es de, preferiblemente, 340 Kcal/100 g y 1440 KJ/100 g.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los elementos (a) a (t) indicados más arriba.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante "composición farmacéutica de la invención" o "composición de la invención", que comprende el extracto bioactivo de la invención.

La composición de la invención comprende el bioproducto de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se entiende por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de extracto de la invención que cuando se administra al sujeto para tratar y/o prevenir una condición neurológica basada en una reducción en los niveles de dopamina produce el efecto deseado incrementando dichos niveles. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, del tipo de condición o afección neurológica y su severidad, así como de la edad, peso, sexo, condición física, capacidad de respuesta o tolerancia, etc., del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

20 Como demuestran los ejemplos mostrados más adelante, la administración de 5 g del bioproducto de la invención a pacientes de Parkinson indujo una espectacular respuesta de dopamina en sangre. Por ello, preferiblemente el extracto bioactivo se encuentra en una cantidad de entre 3 y 7 g, más preferiblemente 5 g, en la composición de la invención.

30 En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo. Como muestran los ejemplos mostrados más adelante, la coadministración del bioproducto de la invención junto con otros fármacos antiparkinsonianos basados en L-DOPA potencia el efecto terapéutico de estos últimos al potenciar el aumento en los niveles de dopamina provocado por éstos. Por ello, preferiblemente el otro principio activo es un fármaco antiparkinsoniano, más preferiblemente L-DOPA y aún más preferiblemente Sinemet.

35 Se entiende por "fármaco antiparkinsoniano" cualquier fármaco empleado para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Parkinson u otros síndromes parkinsonianos. Ejemplos de este tipo de fármacos son L-DOPA, agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la COMT o de la MAO-B, levodopa, fármacos anticolinérgicos, etc.

40 Los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la composición de la invención son los conocidos por los expertos en la materia.

45 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

55 El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia o combinación de sustancias que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se debe administrar la composición de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicha composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Ejemplos de vehículos son agua, aceites o surfactantes, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceites de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitano, éter sulfatos, sulfatos, betaínas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de

otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

5 La composición de la invención y/o sus formulaciones pueden administrarse en una variedad de formas, incluyendo, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, cutánea o subcutánea, oral, intraorbital, intracapsular, tópica, oftalmológica u ocular, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

10 Las composiciones de la presente invención son asimismo aptas para su aplicación mediante dispositivos médicos que permitan la liberación del/los principio/s activo/s en concentraciones adecuadas para el tratamiento y/o prevención de condiciones neurológicas basadas en una reducción en los niveles de dopamina, como por ejemplo Parkinson o síndromes parkinsonianos. Estos dispositivos deben ser, preferiblemente, adecuados para la administración del/los principio/s activo/s de forma local, permitiendo que el tratamiento actúe en la zona afectada y no se disperse. Los dispositivos pueden, por ejemplo, llevar el/los principio/s activo/s en su interior o ir recubiertos con el/los mismo/s.

15 En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención está formulada para su administración oral.

20 La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, bolsas, botes, polvos, gránulos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, etc.), semisólida (ungüento, crema, pomada, gel, hidrogel, espuma, loción, jabón, jalea, gelatina, etc.) o líquida (soluciones acuosas o no acuosas, soluciones hidroalcohólicas o hidroglicólicas, suspensiones, emulsiones, jarabes, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, linimentos, sueros, etc.) para administración oral, tópica o parenteral, preferiblemente oral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación. El término "liberación sostenida" se utiliza en sentido convencional refiriéndose a un sistema de vehiculización de un compuesto que proporciona la liberación gradual de dicho compuesto durante un período de tiempo y preferiblemente, aunque no necesariamente, con niveles de liberación del compuesto relativamente constantes a lo largo de un período de tiempo. Ejemplos ilustrativos de vehículos o sistemas de liberación sostenida incluyen liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípidotensioactivo, millesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas, soportes lipídicos nanoestructurados, materiales poliméricos, parches o implantes biodegradables o no biodegradables, o micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

35 En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención está incluida en una cápsula, bolsa o bote.

40 Los ejemplos mostrados más adelante demuestran que el extracto bioactivo de la invención posee efecto neuroprotector sobre células de una línea de neuroblastoma humano, sobre hipocampo de rata en un modelo de privación de oxígeno y glucosa y sobre estriado de rata en un modelo de toxicidad celular inducida. Asimismo, dicho extracto evita la neurodegeneración de neuronas nigrostriatales dopaminérgicas en modelos murinos de enfermedad de Parkinson, aumentando la supervivencia neuronal, y tanto en modelos animales como en pacientes de Parkinson el bioproducto provocó un incremento sorprendente en los niveles de dopamina y una mejora en las funciones motoras y de aprendizaje. Así, el extracto de la invención posee efectos neuroprotectores y antiinflamatorios frente a los efectos degenerativos de la enfermedad de Parkinson, por lo que posee valor terapéutico en el tratamiento de los aspectos neurodegenerativos de la enfermedad de Parkinson relacionados con la demencia y el deterioro cognitivo.

45 El extracto bioactivo de la invención también indujo en pacientes de Parkinson un incremento en los niveles de noradrenalina y una disminución en los niveles de prolactina, cortisol y hormona del crecimiento.

50 Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al extracto bioactivo de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso del extracto bioactivo de la invención o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento.

55 Otro aspecto de la invención se refiere al extracto bioactivo de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente enfermedad de Parkinson u otros síndromes parkinsonianos.

Se entiende por “enfermedades neurodegenerativas” un tipo de enfermedades que agrupa a un género de desórdenes cognitivos, tales como por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Creutzfeldt-Jakob, de Huntington, ataxia de Friedreich, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple. Estos trastornos cognitivos se deben a un aumento en los procesos de muerte celular, reduciendo el número de neuronas y generando cambios en la conducta. Las enfermedades neurodegenerativas afectan varias actividades como el equilibrio, el movimiento, el habla, la respiración y funciones del corazón. Muchas de estas enfermedades son genéticas, pero en la presente invención se incluyen tanto las genéticas como las derivadas de otras causas diversas. Las causas pueden ser alcoholismo, tabaquismo, tumores o un ataque cerebrovascular (ACV). Otras causas incluyen toxinas, químicos y virus.

Se entiende por “síndromes parkinsonianos” aquellos síndromes de diferente naturaleza, por ejemplo, tóxica, traumática, degenerativa o isquémica, que cursan con una neurodegeneración y una afectación cognitiva y locomotora similar a las de la enfermedad de Parkinson y que también cursan con una reducción en los niveles de dopamina. Se deben a trastornos en el sistema piramidal, siendo éste un conjunto de vías y centros nerviosos ubicado fuera e independiente del sistema piramidal o corticoespinal, que interviene en la regulación de la motilidad involuntaria. Los síndromes parkinsonianos son un trastorno neurológico cuyos síntomas son similares a los que encontramos en la enfermedad de Parkinson. Pueden ser debidos a una auténtica enfermedad de Parkinson secundaria o a una degeneración de ciertas neuronas en el cerebro que causan un déficit en el neurotransmisor dopamina. Otras causas son posibles como una cantidad anormalmente alta de cobre en el cuerpo (enfermedad de Wilson), la toma de fármacos neurolépticos u otras enfermedades degenerativas del sistema nervioso. El síndrome parkinsoniano causa diferentes síntomas como acinesia, es decir, una ralentización y una escasez de movimientos, temblores en reposo y rigidez muscular.

Los usos médicos aquí propuestos para el extracto bioactivo de la invención y para la composición farmacéutica de la invención son además extensibles al tratamiento y/o prevención de enfermedades o patologías seleccionadas de la lista que consiste en: daños cerebrales asociados a la privación de oxígeno y/o glucosa, daños cerebrales asociados a toxicidad inducida por agentes externos, neuroblastoma, síndromes extrapiramidales, enfermedades que cursen con déficit de dopamina o noradrenalina, otras enfermedades neurodegenerativas (como por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Huntington), trastornos psicomotrices, enfermedades que cursen con incremento en la secreción de prolactina (PRL), enfermedades que cursen con incremento en la producción de hormona de crecimiento (GH), síndromes estresantes con incremento de la producción de cortisol, y cualquier condición fisiológica y/o patológica que altere la producción de dopamina, noradrenalina, PRL, GH o cortisol.

Como muestran los ejemplos de la presente invención los efectos terapéuticos del bioproducto de la invención se ven especialmente potenciados en el subgrupo de pacientes de Parkinson con el genotipo APOE -2/3 y/o el fenotipo CYP2D6-IM. Por ello, una realización más preferida se refiere al extracto bioactivo de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Parkinson, aún más preferiblemente en pacientes con genotipo APOE -2/3 y/o fenotipo CYP2D6-IM, siendo el fenotipo CYP2D6-IM un perfil farmacogenético correspondiente a pacientes clasificados como metabolizadores intermedios.

El gen de la apolipoproteína E (APOE), localizado en 19q13.2, presenta 3 alelos en la especie humana ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), que dan lugar a 4 genotipos prevalentes: APOE-2/2 (<1%), APOE-2/3 (2-5%), APOE-2/4 (1-2%), APOE-3/3 (50-60%), APOE-3/4 (20-30%) y APOE-4/4 (1-3%). El genotipado del gen APOE (APOE rs429358 c.3932T>C; Cys112Arg; C\_3084793\_20) se realiza mediante métodos convencionales conocidos en la técnica para el análisis de ADN extraído preferiblemente de sangre total, más preferiblemente por venipuntura.

El gen CYP2D6 pertenece a la familia del Citocromo P450 y codifica a una de las enzimas más importantes para el metabolismo de fármacos. Más de un 60% de los fármacos que actúan sobre sistema nervioso se metabolizan a través de la ruta cyp2d6. El gen CYP2D6 presenta más de 100 variantes alélicas en la población humana, que configuran 4 fenotipos prevalentes: (i) metabolizadores normales (Extensive Metabolizers)(EM), con los 2 alelos normales y actividad enzimática plena, (ii) metabolizadores intermedios (Intermediate Metabolizers)(IM), con un alelo mutante y pérdida de un 25-50% de su capacidad enzimática; (iii) metabolizadores lentos (Poor Metabolizers)(PM), con 2 alelos mutantes y capacidad enzimática nula; y (iv) metabolizadores ultra-rápidos (Ultra-Rapid Metabolizers)(UM), con alelos funcionales multiplicados y capacidad enzimática magnificada.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta invención, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, alivio, tratamiento o curación de las enfermedades o patologías descritas anteriormente en este documento, en el hombre, o en cualquier otro animal. En el contexto de la presente invención, este término se refiere a una preparación que comprenda el extracto bioactivo de la invención.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o

administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario, incluyendo a las premezclas medicamentosas. Se entiende por "premezcla medicamentosa" o "premezcla para alimentos medicamentosos", todo medicamento veterinario preparado de antemano con vistas a la fabricación ulterior de alimentos medicamentosos. Se entiende por "alimento medicamentoso" toda mezcla de medicamento(s) veterinario(s) y de alimento(s) preparada previamente a su comercialización y destinada a ser administrada a los animales sin transformación, en razón de las propiedades curativas o preventivas o de otras propiedades del medicamento.

Los medicamentos de la invención pueden utilizarse tanto solos como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas o de cualquiera de las otras patologías descritas anteriormente, preferiblemente enfermedad de Parkinson u otros síndromes parkinsonianos, más preferiblemente con otros medicamentos como L-DOPA. Así, los medicamentos de la presente invención pueden ser empleados junto a otros principios activos o terapias a modo de terapia combinada. Los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición o bien pueden ser proporcionados mediante una composición distinta, siendo administrados al mismo tiempo o en tiempos diferentes (administración simultánea o secuencial).

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad o condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular cuando dicho sujeto tiene predisposición para sufrir la enfermedad o condición patológica pero aún no se ha diagnosticado que la tenga, como es el caso, por ejemplo, de familiares de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente Parkinson u otros síndromes parkinsonianos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Efecto protector de Atremorine en cultivo de células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

**Fig. 2.** Efecto protector de Atremorine en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (POG) en rodajas de hipocampo de rata.

**Fig. 3.** Efecto protector de Atremorine en el modelo de toxicidad por 6-OHDA en rodajas de estriado de rata.

**Fig. 4.** Efecto de Atremorine sobre degeneración dopaminérgica en un modelo murino de MPTP.

**Fig. 5.** Efecto de Atremorine sobre microglía en un modelo murino de MPTP.

**Fig. 6.** Efecto de Atremorine sobre actividad psicomotriz en un modelo murino de MPTP analizado en Rota-Rod. Nivel de actividad psicomotriz (counts).

**Fig. 7.** Efecto de Atremorine sobre actividad psicomotriz y funciones cognitivas en un modelo murino de MPTP analizado en el OUCEM-86 (Osaka University Computerized Electroniz Maze). Nivel de actividad psicomotriz/eficiencia psicomotriz (se ve cómo Atremorine (4 mg) es capaz de revertir el efecto tóxico de MPTP, restableciendo una función psicomotriz normal en los animales tratados).

**Fig. 8.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de dopamina en sangre de pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo.

**Fig. 9.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de dopamina en sangre en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (izquierda), con tratamiento previo (Sinemet, centro) y en el grupo total (pacientes pretratados con Sinemet+pacientes sin tratamiento previo, derecha).

5 **Fig. 10.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de dopamina en sangre de pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo en base al genotipo APOE.

10 **Fig. 11.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de dopamina en sangre de pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo en base al geno-fenotipo CYP2D6 (EM: Metabolizadores Normales; IM: Metabolizadores Intermedios; PM: Metabolizadores Lentos; UM: Metabolizadores Ultra-Rápidos).

15 **Fig. 12.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de noradrenalina en sangre en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (izquierda), con tratamiento previo (Sinemet, centro) y en el grupo total (pacientes pretratados con Sinemet+pacientes sin tratamiento previo, derecha).

20 **Fig. 13.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de PRL en sangre en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (izquierda), con tratamiento previo (Sinemet, centro) y en el grupo total (pacientes pretratados con Sinemet+pacientes sin tratamiento previo, derecha).

25 **Fig. 14.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de cortisol en sangre en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (izquierda), con tratamiento previo (Sinemet, centro) y en el grupo total (pacientes pretratados con Sinemet+pacientes sin tratamiento previo, derecha).

30 **Fig. 15.** Efecto de Atremorine sobre los niveles de GH en sangre en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (izquierda), con tratamiento previo (Sinemet, centro) y en el grupo total (pacientes pretratados con Sinemet+pacientes sin tratamiento previo, derecha).

## EJEMPLOS

35 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del extracto bioactivo de la invención en el tratamiento de desórdenes asociados a una reducción en los niveles de dopamina, por ejemplo en enfermedad de Parkinson.

### Ejemplo 1. Estudios *in vitro*.

40 **1.1. Evaluación del efecto protector de Atremorine en cultivo de células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.**

45 Las células SH-SY5Y se mantuvieron en un medio de cultivo con un 10% de suero bovino fetal inactivado, 15 aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico (Invitrogen, Madrid, España), medio de nutrientes F12 (Ham F12), medio MEM (Eagle's minimum essential medium) (Sigma Aldrich, Madrid, España), NaHCO<sub>3</sub>, 100 u/ml Penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen, Madrid, España) en H<sub>2</sub>O miliQ. Las células se cultivaron inicialmente en botella y posteriormente se realizaron subcultivos en placas de 48 pocillos a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células se mantuvieron en un incubador en una atmósfera húmeda, a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Antes de llegar a confluencia, las células se incubaron con Atremorine a 1, 10 y 100 ng/ml; y 1, 10 y 100 µg/ml durante 24 horas; transcurrido ese periodo, las células se incubaron con dos estímulos tóxicos, 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) y un cocktail de 30 µM Rotenona/10 µM Oligomicina-A (RO) en presencia de Atremorine para evaluar su potencial terapéutico y determinar la concentración que induce neuroprotección para abordar ensayos posteriores. Los resultados se presentan en la figura 1.

50 Como se observa en la figura 1, 24 horas de tratamiento con 100 µM 6-OHDA produjo una muerte celular de un 30 %; en estas condiciones, la incubación de Atremorine a todas las concentraciones probadas (1 ng/ml-100 µg/ml) produjo un efecto protector significativo de, aproximadamente, un 50%. En segundo lugar, se evaluó el potencial efecto protector de Atremorine en un modelo de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial producido por la combinación de Rotenona y Oligomicina-A (Fig. 1). La exposición de las células a Rot/Oligo durante 24 horas produjo una muerte celular de un 32%; de la misma forma que en el caso anterior, la incubación con Atremorine produjo un efecto protector de un 60% a las concentraciones de 1ng/ml- 10 µg/ml. Sin embargo a la concentración más alta (100 µg/ml) no se observó protección.

60 **1.2. Evaluación del efecto protector de Atremorine en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (POG) en rodajas de hipocampo de rata.**

Estos experimentos se realizan con ratas Sprague-Dawley procedentes de una colonia del estabulario. Las ratas se anestesian con barbital sódico (69 mg/kg, i.p.). A continuación, se decapitan y se extraen los cerebros que se

5 sumergen rápidamente en una solución Krebs bicarbonato (con alto magnesio y sacarosa y bajo calcio) enfiada previamente y, cuya composición, en mM, es la siguiente: NaCl 120, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 0,5, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glucosa 11 y sacarosa 200. Todas las soluciones se burbujan previamente con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (carbógeno) o 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (nitrógeno) para mantener la oxigenación o anoxia, respectivamente. Los hipocampos se disecan rápidamente y se colocan en un chopper (McIlwain) para cortarlas en rodajas de 350 micras de espesor. Inmediatamente, las rodajas del hipocampo se transfieren a tubos conteniendo la misma solución sin sacarosa, y se burbujan con carbógeno durante una hora para estabilizarlas. En cada experimento individual se evalúan seis grupos. Estos grupos se distribuyen en cuatro concentraciones de Atremorine (10 y 100 ng/ml y 1 y 10 µg/ml) además del control (basal) y del grupo POG (grupo de rodajas sometidas a privación de glucosa y oxígeno sin tratamiento). Las rodajas se preincubaron durante 30 minutos en solución de Krebs normal conteniendo (en mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 1,19, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 y glucosa 11. La privación de glucosa y oxígeno se induce burbujando nitrógeno y sustituyendo la glucosa por 2-desoxiglucosa. La viabilidad de las rodajas se evaluó mediante el método de MTT.

15 Como se observa en la figura 2, la exposición de las rodajas de hipocampo a POG durante 15 min seguido de 2 horas de reoxigenación produjo una muerte celular de alrededor del 40%. En estas condiciones, la incubación de Atremorine produjo un efecto protector significativo a todas las concentraciones probadas, con un máximo de protección a 100 ng/ml (50 %).

### 20 **1.3. Evaluación del efecto protector de Atremorine en el modelo de toxicidad por 6-OHDA en rodajas de estriado de rata.**

25 Estos experimentos se realizan con ratas Sprague-Dawley procedentes de una colonia del estabulario. Las ratas se anestesian con barbital sódico (69 mg/kg, i.p.). A continuación, se decapitan y se extraen los cerebros que se sumergen rápidamente en una solución Krebs bicarbonato (con alto magnesio y sacarosa y bajo calcio) enfiada previamente y, cuya composición, en mM, es la siguiente: NaCl 120, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 0,5, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glucosa 11 y sacarosa 200. Todas las soluciones se burbujan previamente con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (carbógeno). El estriado se disecciona rápidamente y se coloca en un chopper (McIlwain) para cortarlo en rodajas de 350 micras de espesor. Inmediatamente, las rodajas del estriado se transfieren a tubos conteniendo la misma solución sin sacarosa, y se burbujan con carbógeno durante una hora para estabilizarlas. En cada experimento individual se evalúan seis grupos. Estos grupos se distribuyen en cuatro concentraciones de Atremorine (0,01; 0,1; 1 y 10 µg/ml) además del control (basal) y del grupo 6-OHDA 300 µM. Las rodajas se preincubaban durante 30 minutos en solución de Krebs normal conteniendo (en mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 1,19, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 y glucosa 11. La toxicidad se induce por incubación con 6-hidroxidopamina 300 µM durante 4 horas. La viabilidad de las rodajas se evaluó mediante el método de MTT.

35 Como se observa en la Figura 3, la incubación de las rodajas con 6-OHDA 300 µM durante 4 horas produjo una muerte celular de un 29%. En estas condiciones, la incubación de Atremorine produjo un efecto protector concentración-dependiente, con un máximo de protección a 10 µg/ml (72 %).

### 40 **Ejemplo 2. Estudios *in vivo*.**

45 Los estudios que se describen a continuación analizan el efecto de Atremorine sobre la supervivencia de neuronas nigrostriatales dopaminérgicas (DA) en el modelo murino 1-metil-4-fenil-1, 2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) de la enfermedad de Parkinson. Los efectos parkinsonianos inducidos por la degeneración MPTP de las neuronas DA nigrostriatales fueron estudiados mediante marcadores anti-tirosina hidroxilasa, activación microglial y muerte neuronal. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se observó que el tratamiento con Atremorine tiene efecto neuroprotector y evita en un 46% la degeneración de neuronas DA nigrostriatales, aumentando los niveles de dopamina del estriado, y la mejora de las funciones motora y de aprendizaje. Los presentes resultados muestran que Atremorine posee efectos neuroprotectores y antiinflamatorios frente a los efectos degenerativos de la enfermedad de Parkinson, por lo que Atremorine tiene valor terapéutico en el tratamiento de los aspectos neurodegenerativos de la enfermedad de Parkinson relacionados con la demencia y deterioro cognitivo en humanos.

55 El objetivo era estudiar el efecto del Atremorine como agente antiparkinsoniano en ratones.

Tipos de modelos animales: ratones silvestres de laboratorio (C57BL6/J 10 semanas)

- Ratones silvestres con neurodegeneración químicamente inducida (q/i)
- Ratones silvestres (control)

60

Neurodegeneración inducida por: MPTP

- 0,5 mg / ratón (peso: 25mg/Kg) – 100µl/ratón - i.p

Tratamientos:

- Atremorine (2mg) - 250µl/ratón
- Atremorine (4mg) - 500µl/ratón
- L-DOPA (Sinemet Plus: 2mg) – 200µl/ratón – i.p

5 Estrategia experimental:

1. Análisis Comportamental Rota rod Oucem-86  
 Coordinación de movimientos  
 Déficit motor de carácter hipocinético

10 2. Procesamiento y análisis histopatológico de regiones cerebrales afectadas - Disfunción y degeneración de neuronas DA

15 Tabla 1. Tabla experimental.

	<b>Tratamiento experimental</b>	<b>n</b>	<b>n ratón q/i</b>
<b>Grupo A</b>	<b>MPTP / 2 mg Atremorine en comida</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Grupo B</b>	<b>MPTP / 4 mg Atremorine en comida</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Grupo C</b>	<b>MPTP / 2 mg L-DOPA (tratamiento antiparkinsoniano)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Grupo D</b>	<b>MPTP / 2 mg Atremorine / 2 mg L-DOPA)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Grupo E</b>	<b>MPTP (neurodegeneración química)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Grupo F</b>	<b>4 mg Atremorine en comida (control)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Grupo G</b>	<b>Comida (control)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

20 Características histopatológicas y neuroquímicas del modelo animal con MPTP.

20 Un estudio histopatológico de uno de los individuos que desarrollaron síndrome Parkinsoniano tras inyectarse una droga que contenía MPTP mostró una lesión selectiva de las células dopaminérgicas de la SNpc; sin embargo, los estudios realizados en primates han demostrado que la lesión inducida por MPTP no afecta de forma exclusiva a esta población neuronal. A este respecto, diversos grupos han demostrado que en macacos adultos, la administración de MPTP induce, además, una degeneración de las NDA del área tegmental ventral (ATV) y del locus coeruleus, donde se han descrito cuerpos de inclusión eosinofílicos que se asemejan a los cuerpos de Lewy. La degeneración del ATV, aunque en menor grado, es evidente también en los primates jóvenes aunque la pérdida neuronal es siempre de mayor intensidad en las NDA de la SNpc. Desde el punto de vista neuroquímico también existe una gran similitud entre el parkinsonismo inducido por MPTP y la EP. La acción neurotóxica del MPTP se caracteriza, como la EP, por una reducción de la concentración de dopamina (DA) y de sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA), así como una disminución de la actividad del enzima tirosina hidroxilasa y una alteración en la densidad de receptores dopaminérgicos. Al contrario de lo que sucede en la EP, donde la disminución de DA es más intensa en el putamen que en núcleo caudado, los primates expuestos de forma crónica a la acción del MPTP muestran una disminución homogénea y no selectiva del contenido de DA estriatal, siendo de igual intensidad en ambas estructuras estriatales. Otras áreas cerebrales con inervación dopaminérgica como el núcleo accumbens, el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral, también son afectadas por MPTP y la reducción en el contenido de DA es similar a la descrita en estriado. En contraste, los niveles de DA no se alteran en estructuras como el globo pálido lateral y medial, que recibe proyecciones directas

de la SNpc. Adicionalmente, las concentraciones de noradrenalina y serotonina en estriado no se modifican con la administración aguda de MPTP, aunque se reducen de forma significativa en estriado y corteza en los animales tratados de forma crónica.

#### 5 Atremorine protege contra la neurodegeneración dopaminérgica inducida por MPTP.

Los ratones fueron tratados con Atremorine (tratamiento) o L-DOPA (Sinemet Plus, control) a través de la dieta. A los siete días de tratamiento los animales fueron procesados para la cuantificación de los cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNpc y de sus proyecciones fibrilares dopaminérgicas en el estriado mediante inmunotinción de tirosina hidroxilasa (TH). La intoxicación química inducida por MPTP resultó aproximadamente en un 71% de pérdida de neuronas TH-positivas del SNpc (grupo E, fig. 4) en comparación con los controles normales sanos sin tratamiento (grupo G). Sin embargo, en los modelos de ratones inducidos por MPTP y tratados con Atremorine (grupos A y B), se ha observado un significativo efecto neuroprotector, resultado de una menor reducción en la densidad de neuronas TH-positivas en la SNpc (fig. 4A-F). La dosis de 2 mg de Atremorine fue ligeramente más eficiente en la protección de las neuronas TH-positivas y las fibras contra la toxicidad de MPTP (fig. 4A-C), un 25% de pérdida de neuronas TH-positivas del SNpc. Además, también se cuantificó el efecto aislado y en conjunto del fármaco Sinemet Plus (LDopa 2mgr (grupo C)/ L-DOPA+Atremorine (grupo D)). Los resultados observados indican que el efecto combinado del Atremorine junto con la L-DOPA (Sinemet Plus), incrementan el efecto neuroprotector (fig. 4G-L) y consecuentemente conduce a una reducción significativa del daño neuronal, un 44% de pérdida de neuronas TH-positivas del SNpc con efecto directo sobre la neurodegeneración nigroestriatal, mitigando así el efecto patológico a nivel del sistema nervioso central observado en los controles de MPTP (fig. 4M-O). El efecto neuroprotector del Atremorine en las poblaciones neuronales dopaminérgicas también se observó en el grupo F (fig. 4P-R), en el que dicha población expresa TH en niveles ligeramente superiores a los controles normales sin tratamiento (grupo G).

#### 25 Atremorine inhibe la activación microglial inducida por MPTP en la sustancia nigra.

Se ha demostrado que existe una activación de astrocitos en la sustancia nigra (SN) de los pacientes de Parkinson así como también en los ratones tratados con MPTP, desencadenando un proceso neuroinflamatorio. Por lo tanto, en este estudio también se examinó si Atremorine inhibe la activación inducida por MPTP microglial en la SN, con el fin de mejorar la supervivencia neuronal. Para ello se realizaron pruebas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos contra microglía (IFN- $\gamma$ ), en todos los grupos de ratones en tratamiento. El tratamiento con Atremorine después de la inyección de MPTP redujo drásticamente la densidad de microglía activada en los ratones tratados con MPTP (fig. 5A-B). De acuerdo con estudios previos, la microglía y los astrocitos en reposo se transformaron en células con cuerpos agrandados y dendritas gruesas en ratones tratados con MPTP (fig. 5C-F). Como control, Atremorine sola no tuvo efectos adversos (fig. 5E).

#### Atremorine inhibe la muerte celular inducida por MPTP en la sustancia nigra.

Una característica fundamental en el deterioro neuronal de la SN en la enfermedad de Parkinson es la degeneración celular así como también en los ratones tratados con MPTP, desencadenando procesos de activación de marcadores apoptóticos y de necrosis. Por lo tanto, en este estudio también se examinó si Atremorine inhibe la muerte celular inducida por MPTP en la SN, para proteger la estabilidad neuroquímica. Para ello se realizaron pruebas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos contra la apoptosis (p53), en todos los grupos de ratones en tratamiento. El tratamiento con Atremorine después de la inyección de MPTP redujo drásticamente el número de muerte celular neuronal en ratones (fig. 5G-H). Además se ha observado que los efectos de muerte celular inducida por MPTP (fig. 5I) se reducen con la combinación de Atremorine y L-DOPA (fig. 5J).

#### 50 Atremorine mejora las funciones motoras en ratones con neurodegeneración por MPTP.

El objetivo terapéutico de la neuroprotección es el de disminuir el deterioro funcional a nivel del sistema nervioso. Por lo tanto, para examinar si Atremorine protege no sólo contra daños estructurales y de neurotransmisión, sino también contra los déficits funcionales causados por MPTP, que afecta el índice de locomoción y coordinación de movimientos, se realizaron test comportamentales. Los resultados de dichos tests en el rendimiento de los ejercicios en la barra giratoria mostraron que los grupos A, B, D y F mantienen una actividad motora similar a los controles normales, mientras que los ratones de los grupos C y E, pierden agilidad motora, coordinación de movimientos y presentan una marcada disminución del tono muscular y del equilibrio, tanto antes como después de cada tratamiento (fig 6). La hipolocomoción inducida por MPTP (grupo E, fig. 6) también se ha observado en gran medida en los ratones del grupo C. En cuanto al mejor rendimiento a nivel motor, es de destacar el efecto potenciador de Atremorine ya que el grupo B (antes de cada tratamiento) y el grupo F (después de cada tratamiento) han demostrado un elevado nivel en la actividad motora y de coordinación a 16 rpm de modo significativo ( $p < 0,0001$ ). Además, se han realizado tests de aprendizaje (OUCEM) para analizar el efecto neurodegenerativo del MPTP en los diversos grupos de ratones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7 y demuestran que el efecto neuroprotector de Atremorine evita una degeneración celular dopaminérgica y el consecuente déficit de aprendizaje.

**Ejemplo 3. Estudios clínicos.**

Se seleccionó un grupo de 92 pacientes (47 mujeres, 45 hombres) con enfermedad de Parkinson y otros síndromes parkinsonianos (tóxicos, traumáticos, degenerativos, isquémicos) (véase características de la muestra en Tabla 2). Del total, 78 pacientes nunca habían recibido tratamiento previo y el resto estaban tratados con Sinemet a diferentes dosis. A los pacientes se les practicó un examen médico completo: (i) anamnesis y evaluación clínica, (ii) psicometría, (iii) análisis de sangre (ver Tabla 2), (iv) pruebas de neuroimagen (MRI cerebral), (v) cartografía cerebral, (vi) perfil genético (APOE), y (vii) perfil farmacogenético (CYP2D6). Tras consentimiento informado, los pacientes recibieron una dosis oral de 5 g de Atremorine y se les practicó un análisis basal (antes de la toma) y a los 30 minutos tras la ingesta de Atremorine en un yogurt. Los parámetros analíticos estudiados fueron: dopamina (DA), noradrenalina (NA), prolactina (PRL), cortisol (Cort), y hormona de crecimiento (GH). En los estudios, se diferenciaron pacientes sin tratamiento previo y pacientes con tratamiento crónico con antiparkinsonianos. Los estudios farmacogenéticos se refieren siempre a pacientes que reciben Atremorine por primera vez y nunca han sido tratados previamente con Sinemet u otros tratamientos antiparkinsonianos.

Los genotipos APOE se distribuyeron con las siguientes frecuencias: APOE-2/3, 13.80%; APOE-3/3, 63.10%; y APOE-3/4, 23.10% (ningún paciente presentó genotipos APOE-2/2, APOE-2/4 o APOE-4/4).

Los fenotipos CYP2D6 se distribuyeron de la siguiente forma: (i) metabolizadores normales CYP2D6-EM, 53.62%; (ii) metabolizadores intermedios CYP2D6-IM, 39.13%; (iii) metabolizadores lentos CYP2D6-PM, 4.35%; y (iv) metabolizadores ultra-rápidos CYP2D6-UM, 2.90%.

Efecto de E-PodoFavalin-15999 sobre los niveles de dopamina en sangre.

La administración oral de 5 g de Atremorine induce una respuesta espectacular de dopamina en sangre en el 98,92% de los pacientes (Fig. 8). Esta respuesta es similar en pacientes que nunca han sido previamente tratados con medicación antiparkinsoniana (Fig. 8) y en aquellos que están recibiendo Sinemet (Fig. 9). La coadministración de Atremorine y Sinemet potencia el efecto del Sinemet. El rango de respuesta dopaminérgica en sangre en pacientes sin tratamiento previo va de 11 a 31883 pg/mL y en pacientes tratados con Sinemet oscila entre 1326 y 40603 pg/mL (Fig. 8 y 9). La respuesta de dopamina a la administración de Atremorine tiene cierto componente farmacogenético (Fig. 10 y 11): Aunque todos los pacientes responden de forma clara, los pacientes que mejor responden son los APOE-2/3, seguidos de los APOE-3/3 y los APOE-3/4 (Fig. 10). De igual forma, los CYP2D6-IM (metabolizadores intermedios) muestran una respuesta más potente que los CYP2D6-EM (metabolizadores normales) (Fig. 11). La respuesta de PMs y UMs no es valorable por el escaso número de pacientes con esta condición farmacogenética.

Tabla 2. Analítica basal de la muestra de pacientes con parkinsonismo.

Parámetros	Valor (m ± ds)
N (Mujeres: 47; Hombres: 45)	92
Edad (años)	60,60±15,55
Rango	21-89
Tensión Arterial Sistólica (mm Hg)	137,04±24,19
Tensión Arterial Diastólica (mm Hg)	78,16±11,23
Pulso (lpm)	73,11±12,38
Peso (Kg)	73,11±12,38
Altura (m)	1,62±0,09
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,64±4,32
Glucosa (mg/dL)	99,98±17,35
Colesterol total (mg/dL)	200,72±38,55
Colesterol-HDL (mg/dL)	57,58±12,9
Colesterol-LDL (mg/dL)	120,50±32,06
Triglicéridos (mg/dL)	111,29±60,39
Urea (mg/dL)	43,88±12,91
Creatinina (mg/dL)	0,91±0,20
Ácido Úrico (mg/dL)	4,72±1,38
Proteínas totales (g/dL)	6,91±0,50
Calcio (mg/dL)	9,66±0,49
GOT/ASAT (IU/L)	20,97±7,41
GPT/ALAT (IU/L)	23,54±16,91
GGT (IU/L)	29,26±34,51
Na <sup>+</sup> (mEq/L)	140,33±4,21
K <sup>+</sup> (mEq/L)	4,27±0,27

Cl <sup>-</sup> (mEq/L)	102,25±6,53
Fe <sup>2+</sup> (µg/dL)	82,02±32,52
Ferritina (ng/mL)	159,84±147,15
Folato (ng/mL)	15,99±6,65
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	738,02±419,50
TSH (µIU/mL)	1,66±1,35
T4 (ng/mL)	0,89±0,17
RBC (x10 <sup>6</sup> /µL)	4,59±0,46
HCT (%)	42,31±3,88
Hb (g/dL)	14,12±1,57
VCM (fL)	92,19±4,13
HCM (pg)	31,00±1,49
CHCM (g/dL)	33,63±0,76
ADE (RDW)(%)	12,92±1,12
WBC (x10 <sup>3</sup> /µL)	6,75±1,57
%Neu	42,47±26,01
%Lin	31,77±8,54
%Mon	7,26±1,57
%Eos	2,73±1,30
%Bas	0,71±0,48
PLT (x10 <sup>3</sup> /µL)	213,33±58,09
VPM (fL)	8,75±0,84
VSG	16,95±9,96

#### Efecto de Atremorine sobre los niveles de noradrenalina en sangre en pacientes parkinsonianos.

5 Atremorine produce un incremento significativo de los niveles de noradrenalina en sangre de pacientes parkinsonianos (Fig. 12), especialmente en pacientes sin tratamiento previo. En aquellos que siguen un tratamiento continuado con Sinemet (Fig. 12), la respuesta de Noradrenalina a Atremorine se ve anulada. Esta respuesta es similar en pacientes con genotipo APOE-2/3 y APOE-3/3 y ligeramente inferior en pacientes APOE-3/4. Esta respuesta no parece afectarse por la condición CYP2D6, aunque los pacientes CYP2D6-EM y CYP2D6-IM parecen responder mejor que los CYP2D6-PM y CYP2D6-UM.

10

#### Efecto de Atremorine sobre los niveles de prolactina (PRL) en sangre de pacientes parkinsonianos.

15 La administración oral de Atremorine induce una disminución significativa de los niveles de PRL en sangre de pacientes sin tratamiento previo (Fig. 13). Esta respuesta también es potente en pacientes pretratados con antiparkinsonianos, pero más variable (Fig. 13). Los pacientes APOE-3/3 muestran los niveles basales de PRL más altos y la respuesta más potente a Atremorine, seguida en potencia por la respuesta que se observa en los pacientes APOE-3/4, y mínima respuesta en pacientes APOE-2/3. Los niveles basales de PRL muestran cierta dependencia del perfil CYP2D6. Los pacientes CYP2D6-EM presentan los niveles basales más altos y la respuesta más potente a Atremorine, seguida de los pacientes CYP2D6-IM, CYP2D6-PM y CYP2D6-UM.

20

#### Efecto de Atremorine sobre los niveles de cortisol en sangre de pacientes parkinsonianos.

25 La administración oral de Atremorine provoca una disminución de cortisol en pacientes sin tratamiento previo (Fig. 14). Esta respuesta desaparece en los pacientes a tratamiento crónico con antiparkinsonianos convencionales (Fig. 14). La disminución de los niveles de cortisol en respuesta a Atremorine es similar en los pacientes APOE-2/3, APOE-3/3 y APOE-3/4, con una poderosa respuesta en APOE-3/3. La respuesta también es similar en pacientes CYP2D6-EM y CYP2D6-IM. La tendencia es idéntica en CYP2D6-PM y desaparece en CYP2D6-UM, pero los datos en PMs y UMs deben ser considerados con reserva por el pequeño número de casos en ambos grupos.

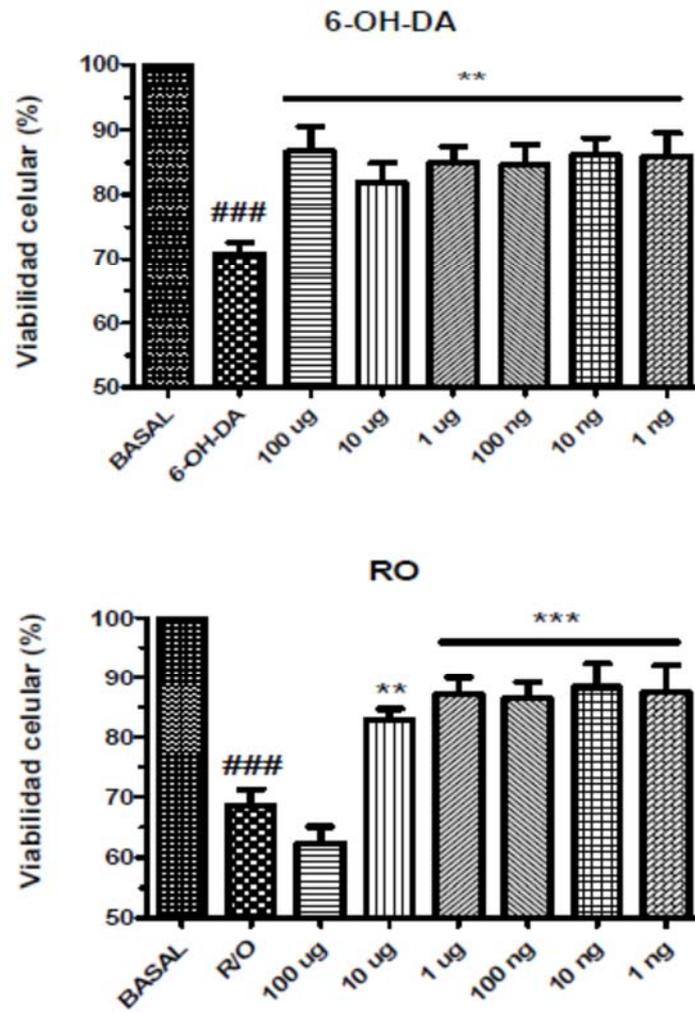
#### Efecto de Atremorine sobre los niveles de hormona de crecimiento (GH) en sangre de pacientes parkinsonianos.

35 La administración oral de Atremorine induce una marcada disminución de los niveles sanguíneos de GH en pacientes parkinsonianos sin tratamiento previo (Fig. 15). Esta respuesta es menos significativa en pacientes pretratados con antiparkinsonianos convencionales (Fig. 15). Los niveles basales de GH son más altos en pacientes APOE-2/3, seguidos de APOE -3/3 y APOE-3/4. La respuesta a Atremorine es significativa en APOE-2/3 y APOE-3/3 e insignificante en APOE-3/4. En relación al genotipo CYP2D6, la respuesta de GH a Atremorine es significativa en CYP2D6-EM, con idéntica tendencia en CYP2D6-IM, CYP2D6-PM y CYP2D6-UM. Los niveles basales de GH son máximos en CYP2D6-PM.

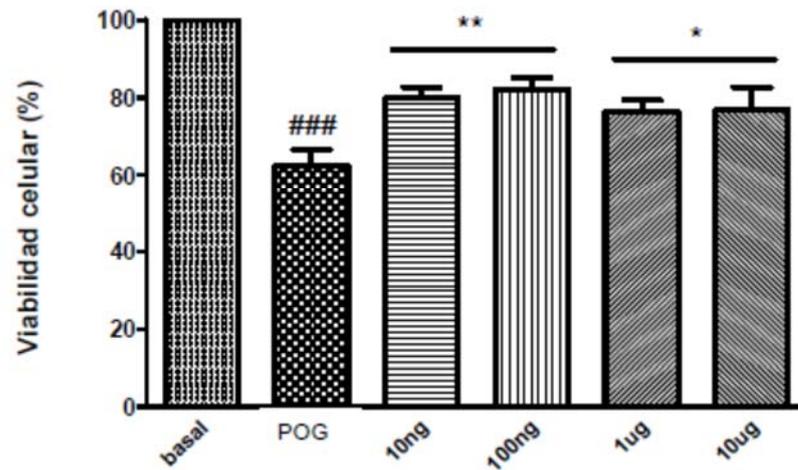
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para obtener un extracto bioactivo de la vaina de *Vicia faba* que comprende las siguientes etapas:
  - 5 a. recolectar el fruto de un cultivo de *Vicia faba* en fase de crecimiento,
  - b. eliminar las habas del fruto recolectado en la etapa (a) y tratar la vaina mediante un tratamiento que comprende los pasos de lavar las vainas, eliminar las vainas dañadas y/o oxidadas y lavar y secado rápido de las vainas seleccionadas,
  - 10 c. conservar el producto obtenido en la etapa (b) a una temperatura de entre 0°C y 5°C durante entre 24 y 48h,
  - d. ultracongelar el producto obtenido tras la etapa (c) a entre -50°C y -30 °C durante entre 1 y 3 horas,
  - e. almacenar el producto obtenido tras la etapa (d) a una temperatura inferior a -18°C durante un periodo inferior a 3 meses,
  - 15 f. liofilizar el producto obtenido tras la etapa (e) durante entre 3 y 5 días, y
  - g. estandarizar el contenido en L-DOPA del producto obtenido tras la etapa (f) de manera que presente un contenido final de L-DOPA de al menos 20 mg/g.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa (a) el fruto se recolecta de 2 a 3 semanas antes de que el cultivo entre en la fase madurativa.
- 20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el cultivo de *Vicia faba* es un cultivo ecológico.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el cultivo de *Vicia faba* es de la variedad *Vicia faba* L. (sp. var. MM).
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende una etapa (h) de homogeneización del producto obtenido tras la etapa (g) que comprende estandarizar la textura y aspecto del producto final mediante un tratamiento físico neutro.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una etapa (i) de formulación en la que se añaden entre 0,020 g y 0,040 g de D-Alfa-Tocoferol.
- 35 7. Extracto bioactivo obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, preferiblemente donde dicho extracto está en forma de polvo.
8. Extracto bioactivo según la reivindicación 7, donde dicho extracto comprende una cantidad de L-DOPA de al menos 20 mg/g y unas cantidades de vicina y convicina inferiores a 2 mg/g, preferiblemente inferiores a 1 mg/g.
- 40 9. Composición farmacéutica que comprende el extracto bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, preferiblemente donde el extracto bioactivo se encuentra en una cantidad de entre 3 g y 7 g, más preferiblemente 5 g.
- 45 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo, preferiblemente donde dicho principio activo es un fármaco antiparkinsoniano, más preferiblemente L-DOPA.
- 50 11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde dicha composición está formulada para su administración oral.
12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde dicha composición está incluida en una cápsula, bolsa o bote.
- 55 13. Extracto bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso como medicamento.
14. Extracto bioactivo según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente enfermedad de Parkinson u otros síndromes parkinsonianos.
- 60 15. Extracto bioactivo o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, preferiblemente enfermedad de Parkinson en pacientes con genotipo APOE -2/3 y/o fenotipo CYP2D6-IM.

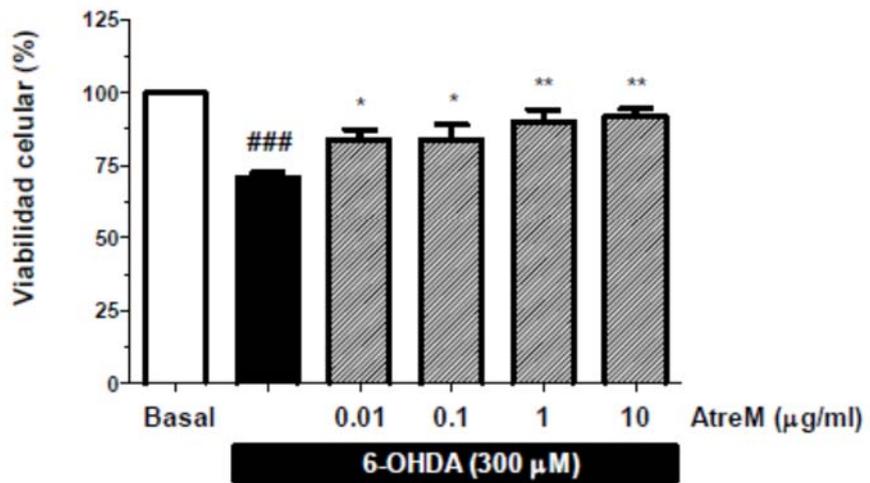
FIG. 1



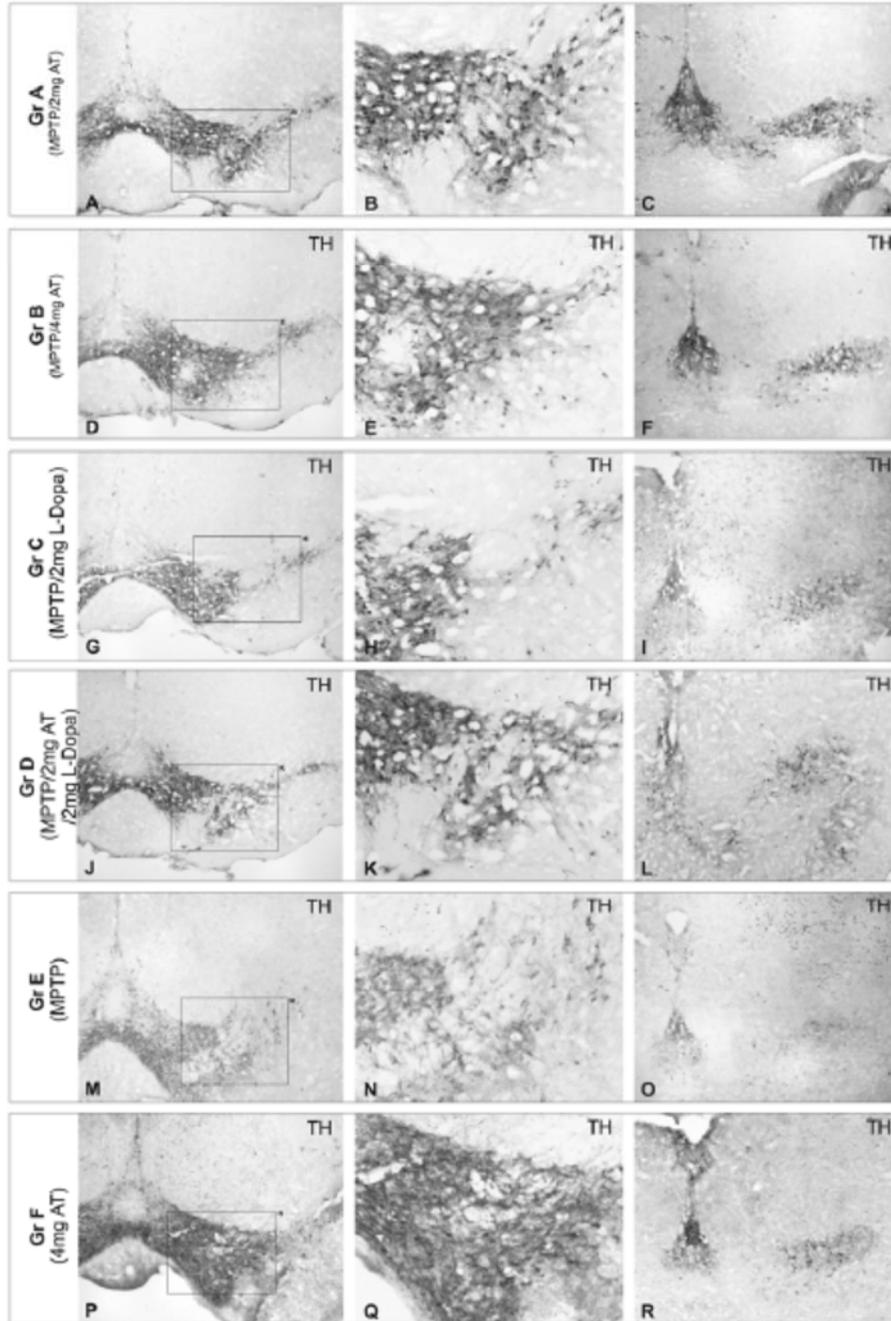
**FIG. 2**



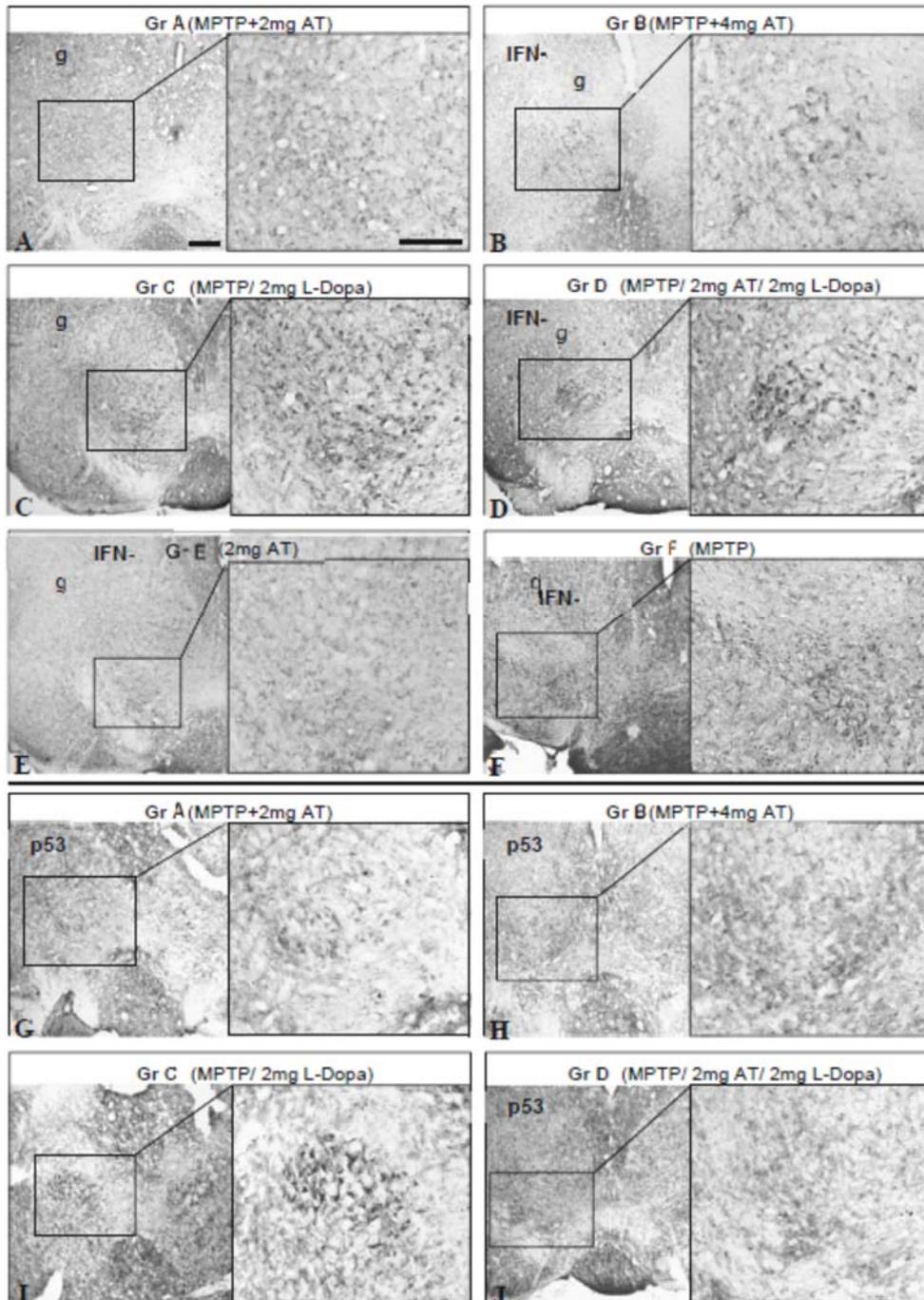
**FIG. 3**



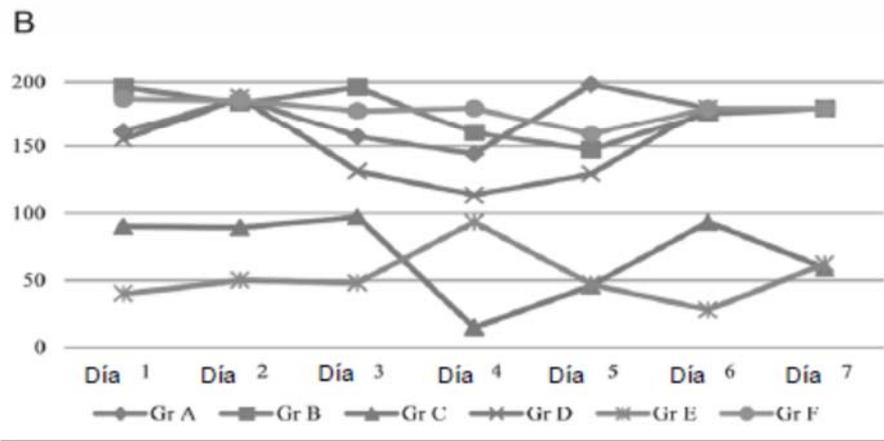
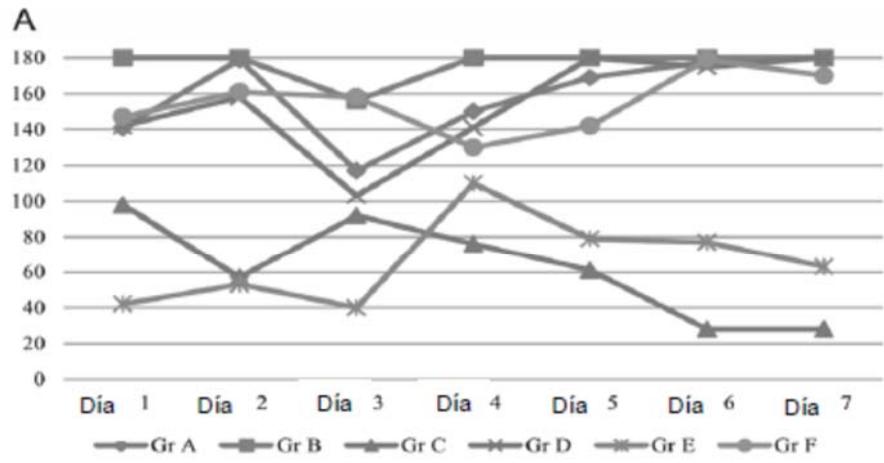
**FIG. 4**



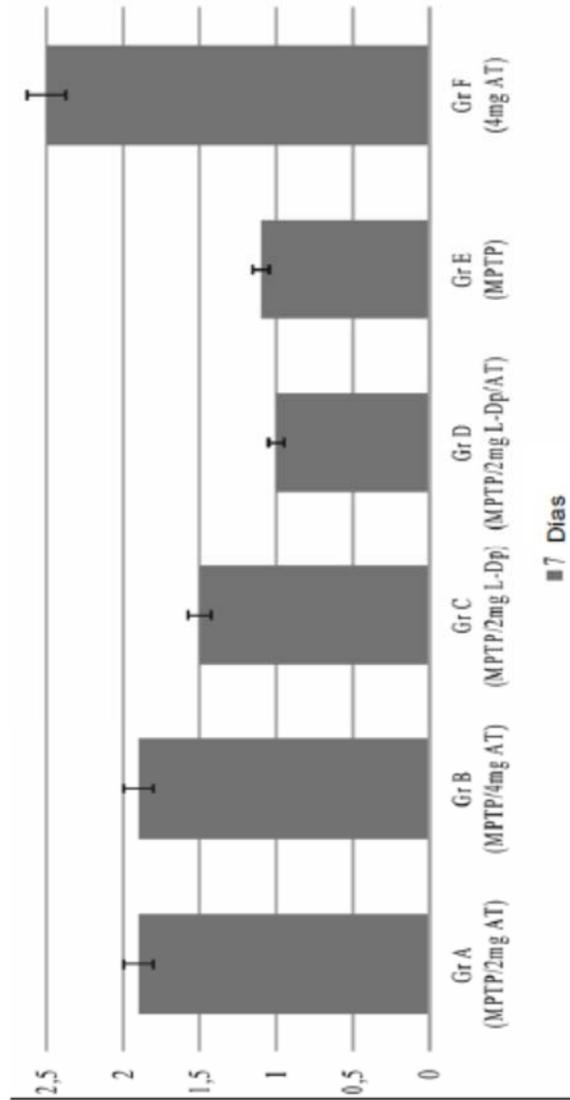
**FIG. 5**



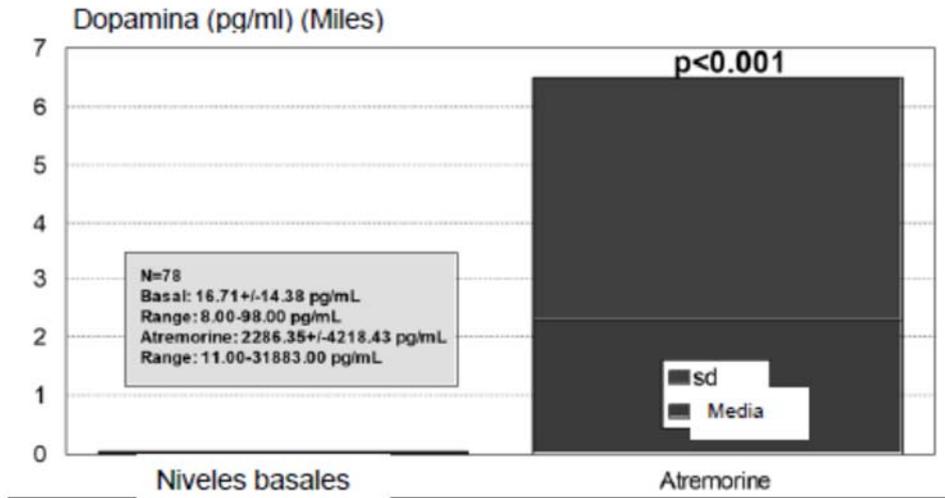
**FIG. 6**



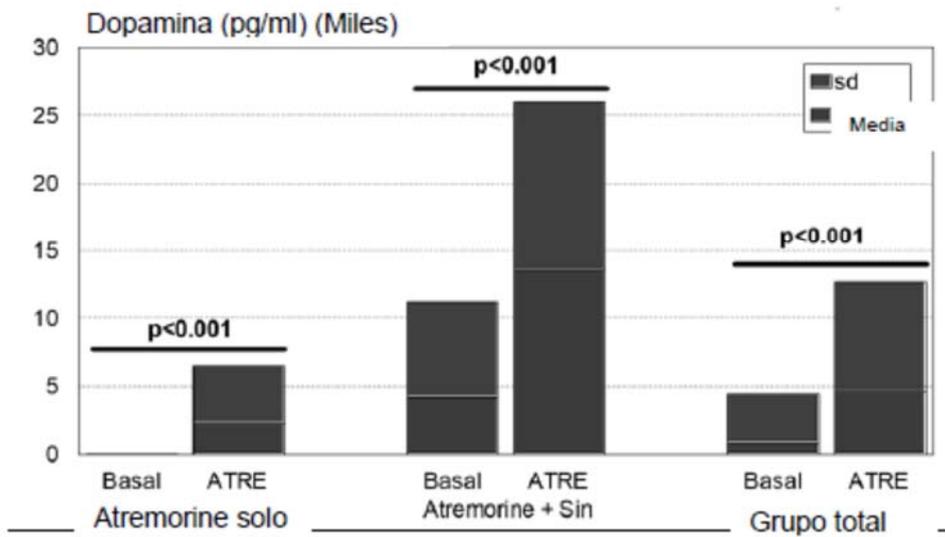
**FIG. 7**



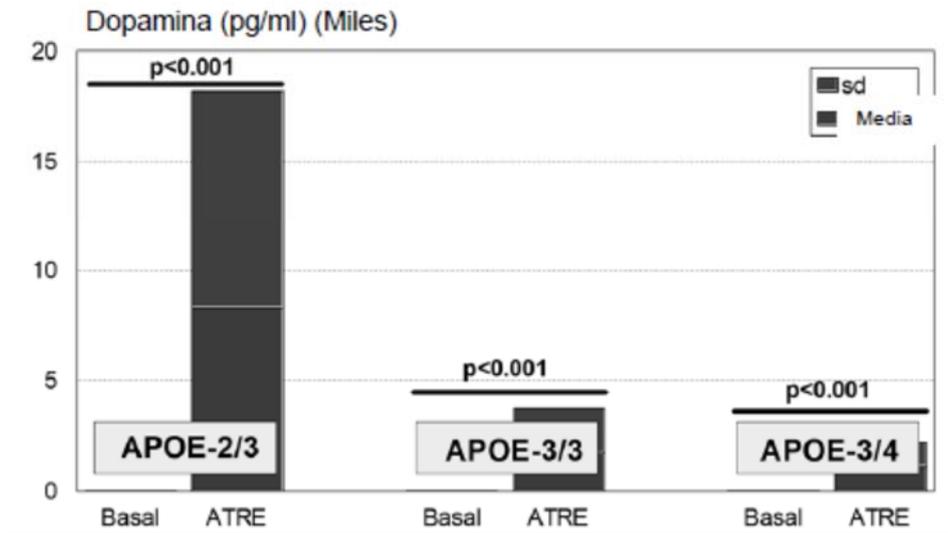
**FIG. 8**



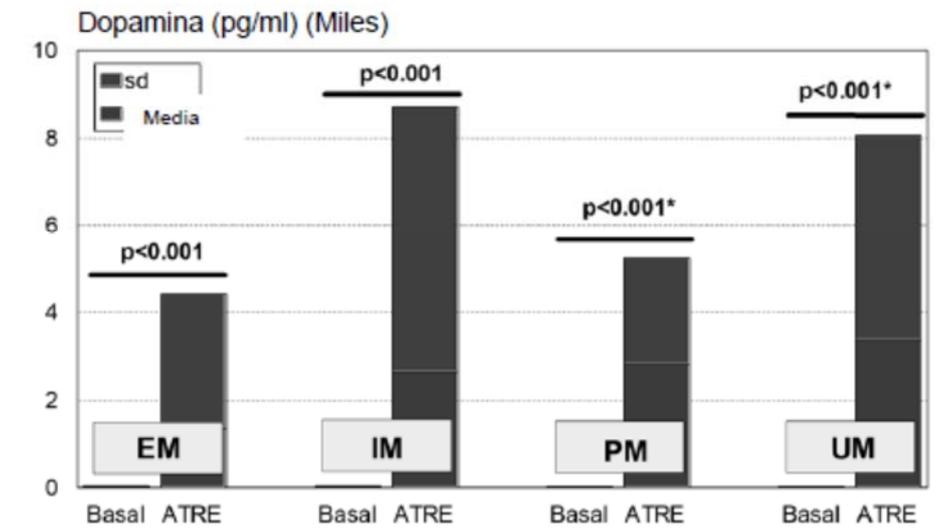
**FIG. 9**



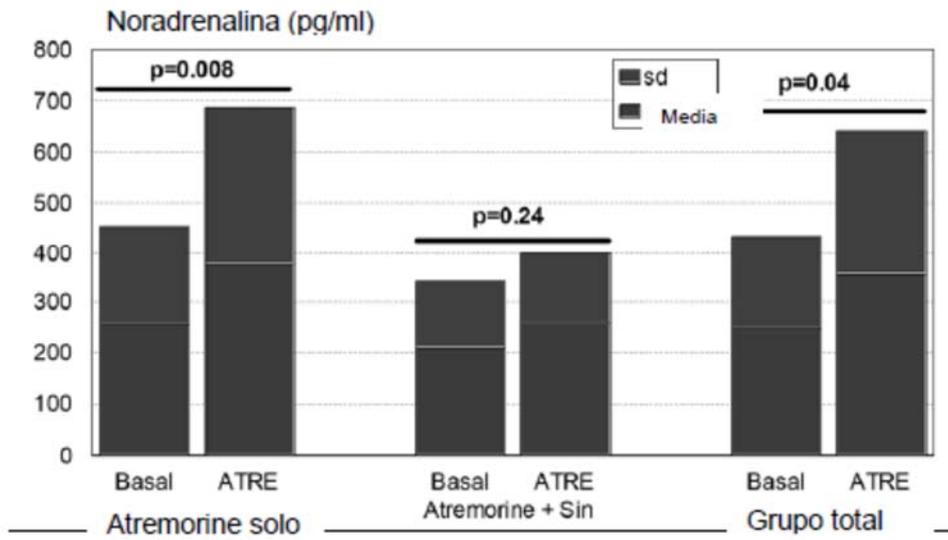
**FIG. 10**



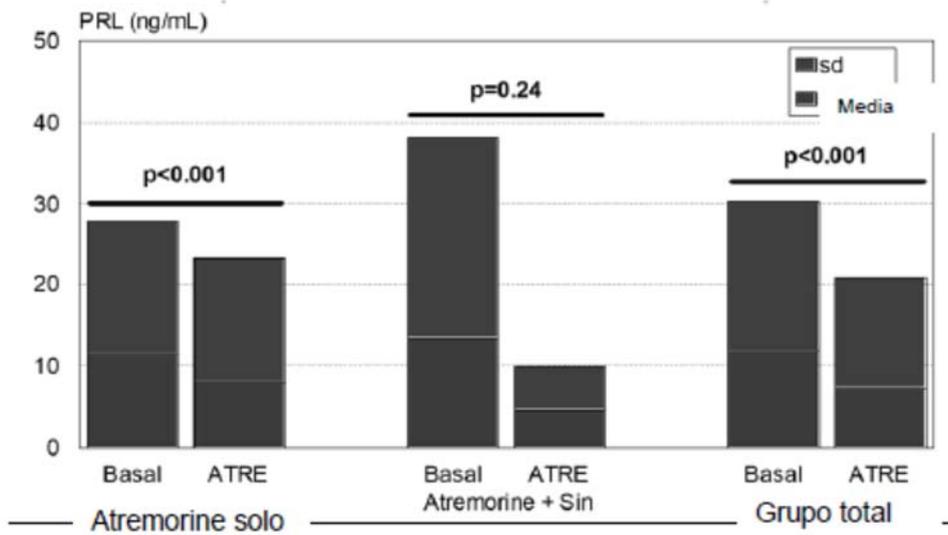
**FIG. 11**



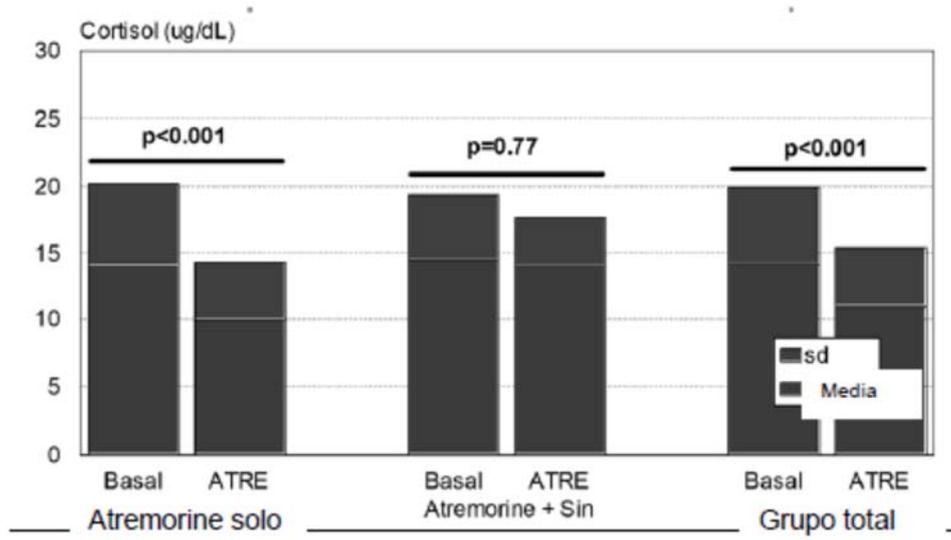
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**

