

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 086**

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/4748 (2006.01)

A61K 36/11 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2015** **E 15305930 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019** **EP 3106160**

54 Título: **Composición de combinación que comprende huperzina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2020

73 Titular/es:

**NEURALIA (100.0%)
410 Chemin Départemental 60
13120 Gardanne, FR**

72 Inventor/es:

CALLIZOT, NOELLE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 767 086 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 de combinación que comprende huperzina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a una composición que comprende huperzina, los métodos de preparación y el uso de la misma para tratar enfermedades neurodegenerativas. La invención se refiere más específicamente a una composición de combinación para su uso en la prevención o el tratamiento del deterioro y la disfunción neurodegenerativa en un sujeto que padece una enfermedad o afección neurodegenerativa, especialmente la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes

15 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un importante problema de salud pública debido a su creciente prevalencia, larga duración, carga del cuidador y alto coste financiero de la atención. En la enfermedad de Alzheimer, los cambios neuropatológicos más característicos son la formación de ovillos neurofibrilares y placas neuríticas caracterizadas por la presencia de haces de filamentos helicoidales emparejados que se acumulan en las neuritas degenerativas y los cuerpos celulares neuronales. Las placas neuríticas clásicas tienen un núcleo central denso de péptido β -amiloide rodeado por una corona de neuritas distróficas (Esiri MM et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry (1998) 65:29-33). Aunque la composición proteica de los filamentos helicoidales emparejados está mal definida, una serie de proteínas asociadas a microtúbulos se han implicado en estas lesiones. Por lo tanto, se ha informado que en los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer, los niveles de proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP 2) generalmente disminuyen [Adlard PA, Vickers JC; Acta Neuropathol (2002) 103: 377-383; Hsia AY et al.; Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 3228-3233].

Actualmente no hay tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. Los esfuerzos actuales para desarrollar un tratamiento eficaz para la AD se basan en el hallazgo de que los pacientes con enfermedad de Alzheimer sufren de déficits marcados en el sistema neurotransmisor colinérgico, lo que resulta en una deficiencia en la concentración de acetilcolina en el sistema nervioso central. Los enfoques de tratamiento incluyen precursores para la síntesis de acetilcolina, agonistas colinérgicos, potenciadores de la liberación de acetilcolina e inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE). Hasta la fecha, el enfoque más eficaz ha sido el uso de inhibidores de la AChE, tal como tacrina, donepezilo y rivastigmina.

Estudios previos mostraron que la patogénesis de AD se desencadena por la acumulación y el depósito de péptido β -amiloide tóxico (A β) en el sistema nervioso central [Callizot et al., J. Neurosc. Res. (2013) 91(5):706-16]. Los medicamentos a base de hierbas dirigidos a los mecanismos subyacentes a la acumulación de A β podrían ser un enfoque eficaz para prevenir la enfermedad.

La huperzina A, un alcaloide sesquiterpénico, se aísla del musgo de club chino *Huperzia serrata*, también conocido como *Lycopodium serratum*. La planta contiene principalmente alcaloides, triterpenos, flavonas y ácidos fenólicos. Se han descrito cuatro clases estructurales principales de alcaloides de *Lycopodium*, que incluyen licopodina, licodina (a la que pertenece la huperzina A), fawcettiminas y otras.

La huperzina A y la huperzina B son potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa y un enfoque terapéutico prometedor en la enfermedad de Alzheimer. La huperzina A se ha estudiado para su uso potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos del CNS [Xu et al., Acta Pharmacol. Sin. (1999), 20:486-49; Wang et al., J Neural Transm 2009, 116: 457-465]. Los resultados indican que la huperzina A es bien tolerada y beneficiosa para los pacientes con enfermedad de Alzheimer, particularmente cuando se administra a una dosis diaria de 300-500 μ g [Wang et al. 2009, ya citado; Xing et al. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, volumen 2014, ID del artículo 363985, 10 páginas]. Además de su efecto inhibidor de la acetilcolinesterasa, la huperzina A posee otros efectos farmacológicos diferentes. Estas funciones no colinérgicas, por ejemplo, el efecto antagonista sobre el receptor NMDA, la protección de las células neuronales contra β -amiloide, los radicales libres y la lesión inducida por hipoxia/ischemia, podrían ser importantes en el tratamiento de la AD.

Los estudios en animales y clínicos mostraron que la huperzina A, cuando se administra por vía oral, se absorbe rápidamente, se distribuye por todo el cuerpo y se elimina a una velocidad moderada, y que la huperzina A tiene una toxicidad más baja en comparación con otros fármacos tales como la tacrina que tiene hepatotoxicidad significativa. potencial.

La huperzina B (HupB), el alcaloide menor en la planta *Huperzia serrata* y un hermano estructural de la huperzina A, es menos potente y selectivo en la inhibición de AChE que HupA. Sin embargo, posee un índice terapéutico más alto que la huperzina A que está según su mayor duración de acción. En estudios de comportamiento, HupB mejoró la retención de la memoria y la recuperación de la memoria en ratones adultos y ancianos, y revirtió la interrupción de

la retención de memoria inducida por escopolamina, nitrito de sodio, choque electroconvulsivo y cicloheximida en ratones [Zhu X. D. et al., Acta Pharmacol. Sin. (1988) 9(6): 492-497]. Estudios recientes también revelaron nuevos derivados 16-sustituidos de HupB que ejercen efectos neuroprotectores al atenuar la neurotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno [Shi et al., Acta Pharmacologica Sinica (2009) 30: 1195-1203].

Hay una serie de análogos sintéticos de huperzina A. La huperzina X, por ejemplo, es un producto de fusión que combina la subestructura carbocíclica de la huperzina A con la subestructura 4-aminoquinolina de la tacrina [Badia A et al, Bioorg Med Chem 1998, 6:427-440]. Otro análogo sintético es ZT-1, que es un profármaco que, en el cuerpo, se hidroliza progresivamente en huperzina A [Li et al, Biomed Chromatogr 2008, 22:354-360]. Estos productos "híbridos" son interesantes porque pueden ser eficaces a dosis más bajas y, por lo tanto, causan menos efectos secundarios.

Los ácidos hidroxicinámicos son fitoquímicos fenólicos presentes en frutas, verduras y café. Este grupo de polifenoles incluye ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido isoferulico y ácido cumárico, que se sabe que ejercen efectos beneficiosos relacionados con su actividad antioxidante. El ácido ferúlico, también llamado ácido 4-hidroxi-3-metoxi cinámico, es un ácido fenólico ampliamente encontrado en una variedad de plantas. El ácido ferúlico tiene una amplia gama de efectos farmacológicos tales como efecto antiinflamatorio, efecto antibacteriano, efecto antioxidante y efecto antitumoral. Entre sus diversos beneficios, se ha centrado mucho interés en el efecto supresor del ácido ferúlico sobre la enfermedad de Alzheimer [Nakamura, S. et al., Geriat. Med. 46, 1511-1519 (2008)].

El ácido cafeico, un derivado del ácido hidroxicinámico tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos e inmunomoduladores. La literatura también informa los efectos neuroprotectores del ácido cafeico [Anwar J. et al., Pharmacol Biochem Behav; 2:386-394 (2012), Jeong CH et al., Chin Med, 6:25 (2011)].

Aunque las huperzinas así como los ácidos hidroxicinámicos se han usado por separado en ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ningún estudio ha evaluado el efecto de las composiciones que combinan huperzina y ácidos hidroxicinámicos sobre la enfermedad de Alzheimer. El documento WO2011/132157 describe formulaciones de liberación sostenida que comprenden huperzina A y métodos que usan dichas formulaciones para tratar una afección médica tal como la enfermedad de Alzheimer.

El documento EP2343065 A1 describe una composición que comprende una combinación de ácido ferúlico y compuestos de matrina y su uso terapéutico para tratar diversas enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO2008/108825 describe composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad neuroprotectora de un compuesto seleccionado en particular de miembros del grupo que consiste en ácido paracarnósico, para L-dopa, ácido para cafeico o un profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

De este modo, ninguna de las técnicas anteriores mencionadas anteriormente describe una combinación específica de huperzina y ácidos hidroxicinámicos.

En este contexto, los inventores han demostrado por primera vez que la huperzina y los ácidos hidroxicinámicos tienen efectos sinérgicos cuando se usan en combinación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Investigaron el efecto neuroprotector de un extracto de planta de *Huperzia serrata* en neuronas corticales primarias de rata lesionadas con glutamato como modelo in vitro de AD. A la luz de los resultados obtenidos y un análisis analítico del perfil químico del extracto, identificaron tres compuestos potencialmente implicados en el efecto neuroprotector: huperzina A, ácido cafeico y ácido ferúlico. También se investigó el efecto sinérgico de estos compuestos.

El efecto de dichos compuestos se investigó adicionalmente en un segundo modelo in vitro de AD que es neuronas corticales primarias dañadas con péptido β -amiloide.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de combinación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos del CNS y un método de preparación de la misma.

Según la presente invención, se proporciona una composición de combinación que comprende como componentes activos, en cantidades sinérgicamente eficaces (i) una huperzina de origen natural o sintético o un extracto vegetal que contiene huperzina, y (ii) al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en ácidos hidroxicinámicos, de origen natural o sintético, mezclas de los mismos y un extracto vegetal que los contiene, en la que dichos ácidos hidroxicinámicos son ácido cafeico y ácido ferúlico y en la que la proporción molar huperzina/ácido cafeico/ácido ferúlico está comprendida entre 0.01/0.5/10 a 0.1/5/1000, preferentemente desde 0.01/0.5/10 a 0.1/0.5/1000 o igual a 0.01/50/100 o igual a 0.01/5/100.

La huperzina se selecciona del grupo que consiste en huperzina A, huperzina B y mezclas de las mismas. Según la invención, la composición puede contener huperzina A sola o huperzina B sola o una combinación de dos o más de

huperzina A, huperzina B.

Los compuestos activos se pueden usar como tales o bajo la forma de sales fisiológicamente aceptables.

5 Los componentes activos pueden ser naturales o sintéticos. Los agentes activos de origen no natural se pueden preparar adecuadamente mediante modificación de grupos laterales y/o átomos laterales de compuestos naturales, como se conoce en la técnica.

10 Se pueden usar también extractos de plantas en particular extracto de *Huperzia serrata*. Tales extractos pueden ser preparados por cualquier técnica conocida en la técnica.

Según una realización preferida de la presente invención, los al menos dos compuestos (ii) son dos ácidos hidroxicinámicos de origen natural o sintético. Según la invención, los ácidos hidroxicinámicos son el ácido cafeico y el ácido ferúlico. Ventajosamente, la huperzina, en particular la huperzina A, el ácido cafeico y el ácido ferúlico se pueden usar en diferentes proporciones, por ejemplo, en una proporción molar huperzina/ácido cafeico/ácido ferúlico; por ejemplo, puede estar comprendido entre 0.01/0.5/10 a 0.1/0.5/1000, ventajosamente igual a 0.01/0.5/100; otra proporción posible es 0.01/50/100. Se entenderá que la cantidad del fármaco administrado realmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección o afecciones que se van a tratar, la composición exacta a administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la ruta de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores están destinados a proporcionar orientación general y soporte para las enseñanzas en este documento, pero no están destinados a limitar el alcance de la invención. Una ventaja de la invención es que cada compuesto se puede usar a dosis bajas en una terapia de combinación, mientras que produce, en combinación, un beneficio clínico sustancial para el sujeto. La terapia combinada puede ser eficaz a dosis en las que los compuestos tienen un efecto individualmente bajo o nulo. De acuerdo con lo anterior, una ventaja particular de la invención radica en la capacidad de usar dosis subóptimas de cada compuesto, esto es, dosis que son más bajas que las dosis terapéuticas usualmente prescritas, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5, o incluso más preferiblemente 1/10 de dosis terapéuticas. En ejemplos particulares, se usan dosis tan bajas como 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, o incluso más bajas, de dosis terapéuticas. A tales dosis subterapéuticas, los compuestos no exhibirían ningún efecto secundario, mientras que la combinación (es) según la invención son completamente eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos del CNS.

Según otro objeto de la presente invención, se proporciona una composición de combinación tal como la descrita anteriormente para su uso en la prevención, inhibición, retraso o tratamiento de la degeneración neuronal en un sujeto que padece una enfermedad o afección neurodegenerativa.

Más particularmente, la invención proporciona una composición de combinación para su uso en la prevención de la inhibición, el retraso o el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer (AD), demencia senil de tipo AD (SDAT) y enfermedades de las neuronas motoras, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). La composición es particularmente útil para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Según aún otro objeto de la presente invención, se proporciona un método para prevenir, inhibir, retrasar o tratar la degeneración neuronal en un sujeto que lo necesite, en el que el método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición según la invención a dicho sujeto.

Como se describe en este documento, las composiciones de combinación según la presente invención se pueden preparar como composiciones farmacéuticas, especialmente composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Tales composiciones pueden comprender los compuestos activos (i) y (ii) como se definieron anteriormente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto adicional de la presente invención, la composición de combinación se puede preparar como composiciones nutracéuticas que comprenden los compuestos activos (i) y (ii) como se definieron anteriormente junto con un excipiente nutracéuticamente aceptable.

La composición de combinación según la presente invención se puede formular para administración oral, administración tópica, administración transdérmica, administración parenteral y combinaciones de los mismos. Las formas apropiadas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras comprimidas o recubiertas, grageas, sobres, grageas, granulados, cápsulas de gelatina dura o blanda, comprimidos sublinguales, jarabes, soluciones y suspensiones, aerosoles; para administración parenteral, la invención proporciona ampollas o viales que incluyen una solución o emulsión acuosa o no acuosa; para la administración rectal se proporcionan supositorios con vehículos hidrófilos o hidrófobos; y para la aplicación tópica como ungüentos y administración transdérmica, se proporcionan sistemas de administración adecuados como se conocen en la técnica, por ejemplo, parches.

65 Las dosis preferidas de los ingredientes activos en las composiciones anteriores serán definidas por el experto en el arte sobre la base de su conocimiento general. Dichas dosis pueden tomarse diariamente en una o varias salidas.

De acuerdo con la presente invención, la composición se puede formular para liberación inmediata, liberación extendida o liberación programada. Según un aspecto adicional de la invención, la composición de combinación puede ser para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección neurodegenerativa.

La invención proporciona además un extracto de *Huperzia serrata* que comprende huperzina A/ácido cafeico/ácido ferúlico en una proporción molar de 1/0.1/0.5. Dicho extracto tiene buen efecto terapéutico y es apropiado para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección neurodegenerativa.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y sus figuras 1 a 4 adjuntas.

La figura 1 ilustra el efecto del extracto de *Huperzia serrata* (HS) (N6001-1) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la supervivencia de la neurona cortical primaria (a) y red de neuritas (b) lesionado por glutamato (40 μ M, 20 min). Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Dunnett). La cantidad de huperzina A (HA o Hpz A) en cada extracto se indicó para cada concentración de extracto.

La figura 2a ilustra el efecto de la huperzina A (HA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la red de neuritas. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher). Hup A significa Huperzina A.

La figura 2b ilustra el efecto de la huperzina A (HA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la neurona cortical primaria. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher). Hup A significa Huperzina A.

La figura 2c ilustra el efecto del ácido cafeico (CA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la red de neuritas. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

La figura 2d ilustra el efecto del ácido cafeico (CA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la supervivencia de la neurona cortical primaria. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

La figura 2e ilustra el efecto del ácido ferúlico (FA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la supervivencia de la neurona cortical primaria. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

La figura 2f ilustra el efecto del ácido ferúlico (FA) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la red de neuritas. Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

La figura 3 ilustra el efecto de las mezclas de huperzina A (HA), ácido cafeico (CA) y ácido ferúlico (FA) en diferentes proporciones sobre la toxicidad del glutamato (40 μ M, 20 min) en la supervivencia de la neurona cortical primaria (a) y red de neuritas (b). Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin glutamato). * p <0.05 vs glutamato (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

La figura 4 ilustra el efecto de la huperzina A (HA) (a, b), el ácido cafeico (CA) (c, d) y el ácido ferúlico (FA) (e, f) a diferentes concentraciones sobre la toxicidad del péptido A β (20 μ M, 24 horas) en la red de neuritas a, c y e) y supervivencia de neuronas corticales primarias (b, d y f). Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin A β). * p <0.05 vs A β (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Dunnett).

La figura 5 ilustra el efecto de mezclas de huperzina A (HA), el ácido cafeico (CA) y el ácido ferúlico (FA) en diferentes proporciones sobre la toxicidad del péptido A β (20 μ M, 24 horas) en la supervivencia de la neurona cortical primaria (a) y red de neuritas (b). Los datos se expresaron como porcentaje de control como media \pm SEM (100% = sin A β). * p <0.05 vs A β (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de PLSD Fisher).

Ejemplo 1: prevención de la toxicidad de glutamato en células neuronales mediante extractos de *huperzia serrata* (HS)

La excitotoxicidad del glutamato es responsable de la muerte neuronal en los trastornos neurológicos agudos, incluida la enfermedad neurodegenerativa. La pérdida de la homeostasis del calcio es un mediador clave de la muerte celular inducida por glutamato. Los inventores probaron extractos de *Huperzia serrata* por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del glutamato en las neuronas corticales primarias dañadas por el glutamato.

5 1. Sección experimental

Los extractos de *Huperzia serrata* (HS) se obtienen a partir de material vegetal seco mediante varios métodos, que incluyen reflujos convencionales, ultrasonido y extracción asistida por microondas, según lo descrito por Zha Shenghua et al. y Sun Yuan-Ming et al. [Zha Shenghua et al., *Natural Product Research and Development* (2005) 17(1):7-10, Sun Yuan-Ming et al., *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (2002) 33(12):1078-1092]. El solvente usado en este documento era agua pura. Se usó un método analítico basado en HPLC para dosificar la huperzina A (HA) y los ácidos polifenólicos en cada extracto realizado.

15 El efecto neuroprotector del extracto de HS se evaluó mediante la cuantificación de la red de neuritas que revela específicamente las neuronas glutamatérgicas.

Se cultivaron neuronas corticales de rata como describen Singer et al., 1999 [*J. Neuroscience* 19(7), 2455-2463] and Callizot et al. [*J. Neurosc. Res.* 91(5), 706-716].

20 Brevemente, las hembras preñadas (Wistar; JanvierLabs, St Berthevin, Francia) a los 15 días de gestación fueron asesinadas por dislocación cervical. Los fetos se recogieron e inmediatamente se colocaron en medio Leibovitz L15 helado (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania, Lote: 4120413) con una solución de penicilina al 2% (10,000 U/ml) y estreptomicina (10 mg/ml) (PS; Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) y albúmina de suero bovino al 1% (BSA; Pan Biotech, Aidenbach, Alemania). La corteza se trató durante 20 minutos a 37 °C, con una solución de tripsina-EDTA (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) a una concentración final de 0.05% de tripsina y 0.02% de EDTA. La disociación se detuvo mediante la adición de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/litro de glucosa (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania), que contenía DNase I grado II (concentración final 0.5 mg/ml; Pan Biotech, Alemania) y 10 % de suero de ternera fetal (FCS; Invitrogen, Cergy Pointoise, Francia). Las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasos forzados a través de la punta de una pipeta de 10 ml. Las células se centrifugaron a 515 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y las pellas se volvieron a suspender en un medio de cultivo definido que consiste en medio Neurobasal (Invitrogen, Cergy Pointoise, Francia) con una solución al 2% de suplemento B27 (Invitrogen, Cergy Pointoise, Francia), 2 mmol/litro de L-glutamina (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania), 2% de solución de PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Pan Biotech, Aidenbach, Alemania). Las células viables se contaron en un citómetro de Neubauer, usando la prueba de exclusión de azul tripán. Las células se sembraron a una densidad de 30,000 por pocillo en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-L-lisina (Corning Biocoat, Tewksbury, EE. UU.) y se cultivaron a 37 °C, en una incubadora con aire (95%) - CO2 (5%). El medio se cambió cada 2 días.

40 El día 13, los cultivos se expusieron durante 20 minutos a glutamato 40 μM en ausencia o presencia de extractos de *Huperzia serrata*. Luego se lavaron las células y se agregó nuevo medio que contenía extractos de *Huperzia serrata* o no durante otras 48 horas.

45 Después, las células se fijaron mediante una solución fría de etanol/ácido acético (95:5 v/v) durante 5 minutos a -20 °C. Después de la permeabilización con 0.1% de saponina (Sigma), las células se incubaron durante 2 horas con anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP 2; Sigma) a una dilución de 1/400 en PBS que contiene 1% de suero de ternera fetal (Invitrogen) y 0.1% de saponina. Este anticuerpo se reveló con IgG Alexa-Fluor 488 de cabra antiratón (Invitrogen) a la dilución de 1/400 en PBS que contiene 1% de suero de ternera fetal y 0.1% de saponina durante 1 hora a temperatura ambiente.

50 Evaluación de supervivencia de la neurona: para cada condición se evaluaron 6 pocillos, se tomaron 20 imágenes por pocillo usando InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con un aumento de 20x para evaluar los cuerpos celulares (tinción con MAP 2). El análisis de la imagen se realizó con el software Developer (GE Healthcare), se registró el número de neuronas por imagen. Se calculó automáticamente una media del número de neuronas de las diez imágenes por pocillo, luego se proporcionó un dato por pocillo (se proporcionaron un total de 6 datos en bruto por condición).

60 Evaluación de la longitud de la red neuronal: para cada condición se evaluaron 6 pocillos, se tomaron 20 imágenes por pocillo usando InCell Analyzer™ 1000 con un aumento de 20x (20 imágenes en X20 que representan ~ 80% de la superficie total del pocillo), para evaluar la tinción de NF. El análisis de la imagen se realizó usando el software Developer, se registró la longitud total de neuritas por imagen. Se calculó automáticamente una longitud media de neurita de las diez imágenes por pocillo, luego se proporcionó un dato por pocillo (se proporcionaron un total de 6 datos en bruto por condición).

65 2. Resultados

Se dan en la figura 1.

Demuestran que los extractos de HS inducen un efecto protector sustancial contra la toxicidad causada por el glutamato.

5 El glutamato (40 μ M, 20 min) indujo una muerte neuronal significativa (~25%) (Figura 1a) y una gran pérdida de neuritas (en un 25%) (Figura 1b). En presencia del extracto de *Huperzia serrata* N6001-1 (33,3 μ g/ml; 25 μ g/ml, 5 μ g/ml y 2.5 μ g/ml) se agregó 1 hora antes del glutamato y se dejó durante la aplicación tóxica y 48 horas después del lavado, se observó un efecto protector significativo en la supervivencia de las neuronas (~90% de la supervivencia) (Figura 1a) así como en la red de neuritas (Figura 1b).

Ejemplo 2: prevención de la toxicidad de glutamato en células neuronales por huperzina A, ácido cafeico y ácido ferúlico

15 A la luz de los resultados con extractos de HS y un análisis analítico del perfil químico del extracto de HS usado, se identificaron tres compuestos potencialmente implicados en el efecto protector sobre las células neuronales: huperzina A, ácido cafeico y ácido ferúlico.

20 Se ha probado la capacidad de dichos compuestos candidatos para prevenir o reducir la toxicidad del glutamato en las células neuronales. Los compuestos se probaron primero individualmente, seguidos de ensayos de su acción combinatoria. La eficacia de los compuestos y una combinación de ellos se evaluó en células primarias de neuronas corticales.

1. Sección experimental

25 El protocolo usado en estos ensayos es el mismo que el descrito en el ejemplo 1. Después de 13 días de cultivo de neuronas, los compuestos candidatos se resolvieron en DMSO y se diluyeron en medio de cultivo. Luego los compuestos candidatos se incubaron previamente con neuronas corticales 1 hora antes de la exposición al glutamato (20 min, 40 μ M) a diferentes concentraciones solo o como mezcla y se dejaron durante la aplicación tóxica y durante otras 48 h después del lavado. Los compuestos candidatos se probaron en un cultivo cortical primario en placas de 96 pocillos, 6 pocillos por condición.

2. Resultados

35 Se muestran en las figuras 2 y 3. Demuestran que todos los compuestos ensayados solos inducen un efecto neuroprotector sustancial contra la toxicidad causada por el glutamato.

40 El glutamato (40 μ M, 20 min) indujo una muerte neuronal significativa (~ 30%) y una gran pérdida de neuritas (en un 30%). Como se muestra en la figura 2:

- la huperzina A (HA), a una dosis de 10 nM, induce un efecto protector significativo sobre la supervivencia de las neuronas (94%) así como la red de neuritas (> 90%), la dosis activa más baja fue de 1 nM (Figure 2a, b);

45 - el ácido cafeico (CA), a una dosis de 1 μ M y 5 μ M, induce un efecto protector significativo sobre la supervivencia de las neuronas (> 80% de supervivencia) así como la red de neuritas (Figure 2c, d);

- el ácido ferúlico (FA), a una dosis de 10 μ M y 100 μ M, induce un efecto protector significativo en la supervivencia de las neuronas (> 80% de supervivencia), así como en la red de neuritas (Figure 2e, f).

50 Los resultados también muestran que a las concentraciones más bajas, HA, CA así como FA tienen poco o ningún efecto sobre la toxicidad del glutamato en este modelo.

Como se muestra en la figura 3, las combinaciones según la invención protegen fuertemente a las neuronas de la toxicidad del glutamato en las condiciones experimentales descritas anteriormente.

55 El glutamato (40 μ M, 20 min) indujo una muerte neuronal significativa (~ 30%) y una gran pérdida de neuritas (en un 40%).

Las siguientes concentraciones de la mezcla dieron como resultado un aumento significativo de la supervivencia de la neurona cortical:

- 10 pM/500pM/10nM (HA/CA/FA),

65 - 10 pM/50pM/10nM (HA/CA/FA) y

- 1 pM/500pM/10nM (HA/CA/FA).

Estas mezclas también fueron protectoras en la red de neuritas.

5 Además, la concentración de la mezcla de 10pM/5pM/10nM (HA/CA/FA) también fue protectora en la red de neuritas.

También se observó un efecto protector con las concentraciones de la mezcla 1pM/5nM/10nM (HA/CA/FA), 1pM/500pM/10nM (HA/CA/FA) y 1pM/50pM/10nM (HA/CA/FA) sin alcanzar la significancia.

10 Es digno de mención que se advierte una protección eficaz usando concentraciones de compuestos a las que los compuestos usados solos no pudieron mostrar ningún efecto protector.

Por primera vez, se mostró claramente un efecto protector sinérgico de estos compuestos.

15 Ejemplo 3: prevención de la toxicidad de péptidos A β en células neuronales.

En una serie adicional de experimentos, los compuestos candidatos identificados anteriormente han sido probados por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del A β 1-42 humana en las neuronas corticales. A β -1-42 es el péptido de longitud completa que constituye agregados encontrados en biopsias de pacientes humanos afectados con la enfermedad de Alzheimer [Sakono et al. 2010, FEBS Journal 277(6), 1348-1358; Callizot et al., 2013, ya citado].

1. Sección experimental

25 El presente estudio usó un modelo in vitro de la enfermedad de Alzheimer establecido por Callizot et al. [2013, ya citado], usando una solución de péptido A β que contiene oligómeros de A β y que permite reproducir características neuropatológicas esenciales de la enfermedad de Alzheimer.

30 Los fármacos se prueban primero individualmente, seguidos de ensayos de su acción combinatoria.

La preparación A β 1-42 se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito por Callizot et al., 2013 (ya citado). Brevemente, el péptido A β 1-42 se disolvió en el medio de cultivo definido mencionado anteriormente, desprovisto de suero, a una concentración inicial de 40 μ mol/litro. Esta solución se agitó suavemente durante 3 días a 37 °C, en la oscuridad y se usó inmediatamente después de diluirse en medio de cultivo a las concentraciones usadas.

35 El día 11 de cultivo, HA, CA, FA y mezclas de las mismas se resolvieron y diluyeron en medio de cultivo y luego se incubaron previamente con neuronas corticales 1 hora antes de la aplicación del péptido A β 1-42. Luego se agregó una preparación de A β 1-42 a una concentración final de 20 μ M diluido en medio de control. Después de 24 horas de intoxicación por A β , los cultivos se fijaron y se inmunomarcaron y se evaluó la supervivencia de las neuronas y la longitud de la red de neuritas como se describe en el ejemplo anterior.

2. Resultados

45 Se presentan en la figura 4 y la figura 5.

A β (20 μ M, 24 h) indujo una muerte neuronal significativa (~25%) y una gran pérdida de neurita (en un 35%).

50 - la huperzina A (HA) no pudo proteger significativamente las neuronas de las lesiones (Figura 4a). Por el contrario, HA en una concentración de 10 pM y 10 nM tuvo efectos significativos en la red de neuritas (Figura 4b);

- el ácido cafeico fue capaz de proteger significativamente las neuronas de las lesiones a concentraciones desde 5 nM hasta 5 μ M. A concentraciones de 500 pM e inferiores, no se observó ningún efecto sobre la supervivencia de las neuronas (Figura 4c). Se observó un efecto protector sobre la red de neuritas incluso a concentraciones más bajas (Figura 4d);

55 - el ácido ferúlico no pudo proteger las neuronas de las lesiones, independientemente de la concentración probada (Figura 4e). Se observó un pequeño efecto en la red de neuritas con un efecto significativo para 10 y 100 μ M (Figura 4f).

60 El efecto de las mezclas de HA, CA y FA sobre las neuronas corticales primarias dañadas por A β se dan en la figura 5. Tales combinaciones según la invención protegen fuertemente a las neuronas de la toxicidad de A β en las condiciones experimentales descritas anteriormente.

65 A β (20 μ M, 24 h) indujo una muerte neuronal significativa (~25%) y una gran pérdida de neuritas (en un 40%).

- 5 En presencia de una mezcla de HA/CA/FA se observó un efecto protector significativo (~ 90% de supervivencia) sobre la supervivencia de la neurona y todas las concentraciones probadas mostraron un efecto protector. Las siguientes concentraciones de la mezcla dieron como resultado un aumento significativo de la supervivencia de la neurona cortical: 1 pM/5 nM/10 nM (HA/CA/FA); 1 pM/500 pM/10 nM (HA/CA/FA); 1 pM/50 pM/10 nM μ g/ml (HA/CA/FA) respectivamente (Figura 5a). Lo más importante, todas las combinaciones de concentración de los tres compuestos mostraron un efecto protector significativo en la red de neuritas, conservándola casi por completo. Todas las mezclas probadas protegieron en más del 90% de la pérdida de neuritas inducida por A β (Figura 5b).
- 10 Se debe recordar que a las concentraciones usadas, ninguno de los tres compuestos usados solos pudo mostrar ningún efecto protector (Figura 4).

- 15 Este estudio demostró que la huperzina A, el ácido cafeico y el ácido ferúlico podían proteger a las neuronas de las lesiones inducidas tanto por el glutamato como por el péptido β -amiloide. Más interesante y sorprendente, se demostró en este estudio que la huperzina A, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, cuando se usan en combinación en concentraciones donde los componentes individuales son ineficaces, fueron capaces de proporcionar neuroprotección casi completa tanto en lesiones de glutamato como de β -amiloide. Por primera vez se mostró claramente un efecto neuroprotector sinérgico de la mezcla de estos compuestos. De este modo, la presente invención proporciona ventajosamente composiciones que contienen bajas concentraciones de huperzina A, por lo
- 20 tanto reduce los efectos secundarios desagradables generalmente producidos por fármacos alcaloides tales como sudoración, náuseas, vómitos, mareos y calambres [Yang G. et al., PLOS ONE (2013), 8(9): e74916].

Se han obtenido los mismos resultados con todos los extractos sea cual sea el método de extracción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de combinación que comprende como componentes activos, en cantidades sinérgicamente eficaces
- (i) una huperzina de origen natural o sintético, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o un extracto vegetal que contenga huperzina,
- 10 (ii) al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en: ácidos hidroxicinámicos, de origen natural o sintético, mezclas de los mismos y un extracto vegetal que los contiene,
- en la que dichos
- 15 ácidos hidroxicinámicos son ácido cafeico y ácido ferúlico y
- en la que la proporción molar huperzina/ácido cafeico/ácido ferúlico está comprendida entre 0.01/0.5/10 a 0.1/5/1000, preferentemente desde 0.01/0.5/10 a 0.1/0.5/1000 o igual a 0.01/50/100 o igual a 0.01/5/100.
- 20 2. La composición de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la huperzina se selecciona del grupo que consiste en huperzina A, huperzina B y mezclas de las mismas.
3. La composición de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proporción molar de huperzina/ácido cafeico/ácido ferúlico es 0.01/0.5/100 o 0.01/5/100.
- 25 4. La composición de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la prevención, inhibición, retraso o tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o afección neurodegenerativa.
5. La composición de combinación para uso según la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad o afección neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer (AD), demencia senil de tipo AD (SDAT) y enfermedades de las neuronas motoras, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).,
- 30 6. Una composición de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable o uno nutracéuticamente aceptable.
- 35 7. Una composición de combinación según las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición de combinación es apropiada para administración oral, transdérmica, tópica o parenteral.
8. Una composición de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la prevención, inhibición, retraso o tratamiento de una enfermedad o afección neurodegenerativa mediante uso
- 40 simultáneo, separado o secuencial.
9. Extracto de *Huperzina serrata* que comprende huperzina A/ácido cafeico/ácido ferúlico en una proporción molar de 1/0.1/0.5.
- 45 10. Extracto de *Huperzina serrata* según la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o prevención, inhibición, retraso o tratamiento de una enfermedad o afección neurodegenerativa.

FIGURA 1a

Efecto de N6001-1 (pretratamiento 1H) en la supervivencia de la neurona después de las lesiones de glutamato (40 μ M, 20 min)

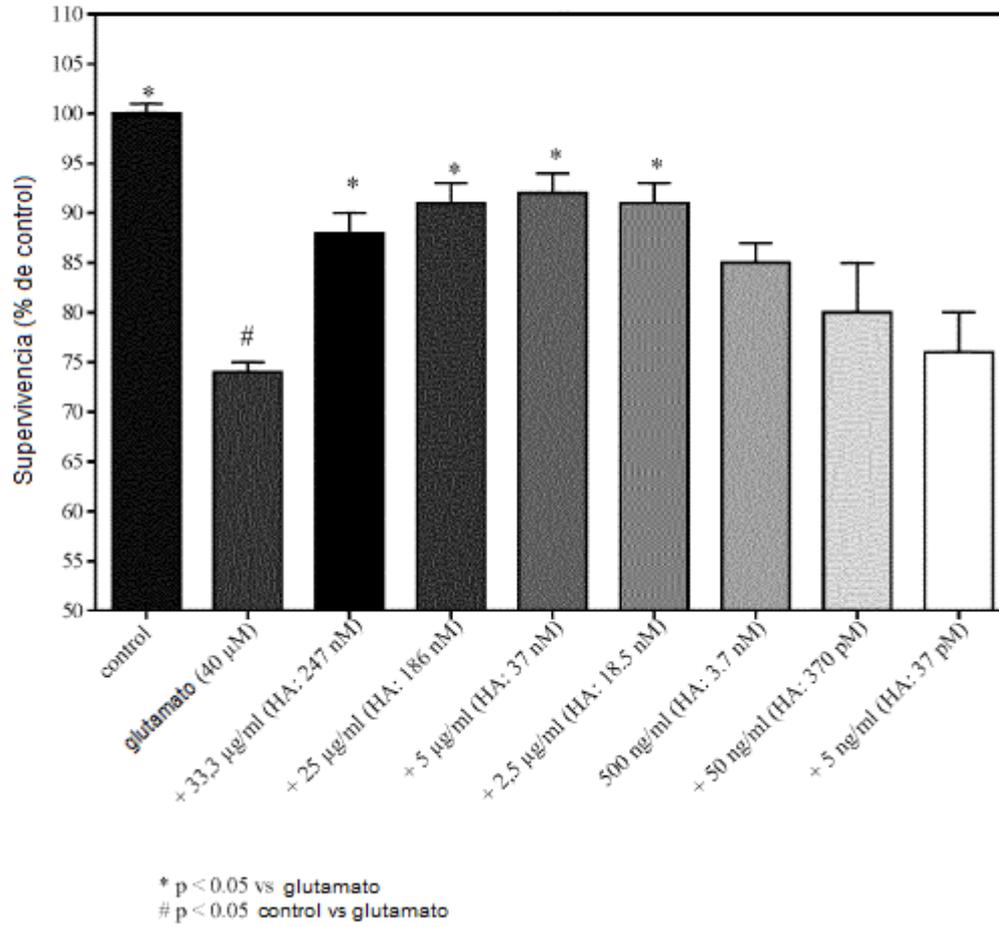


Figura 1b

Efecto de N6001-1 (pretratamiento 1H) en la red de neuritas después de las lesiones de glutamato (40 μ M)

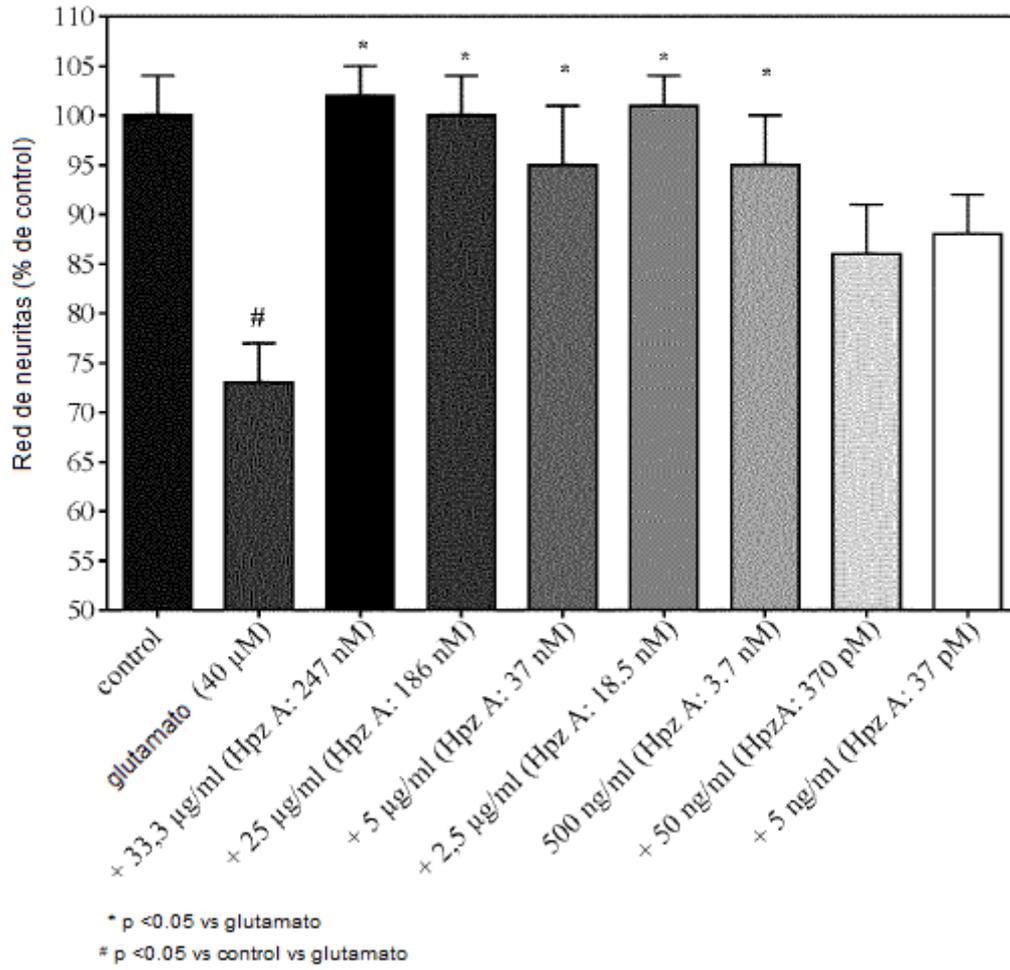


FIGURA 2a

Efecto de huperzina A (HA) en la red de neuritas de neuronas corticales lesionadas con glutamato (40 μ M, 20 h)

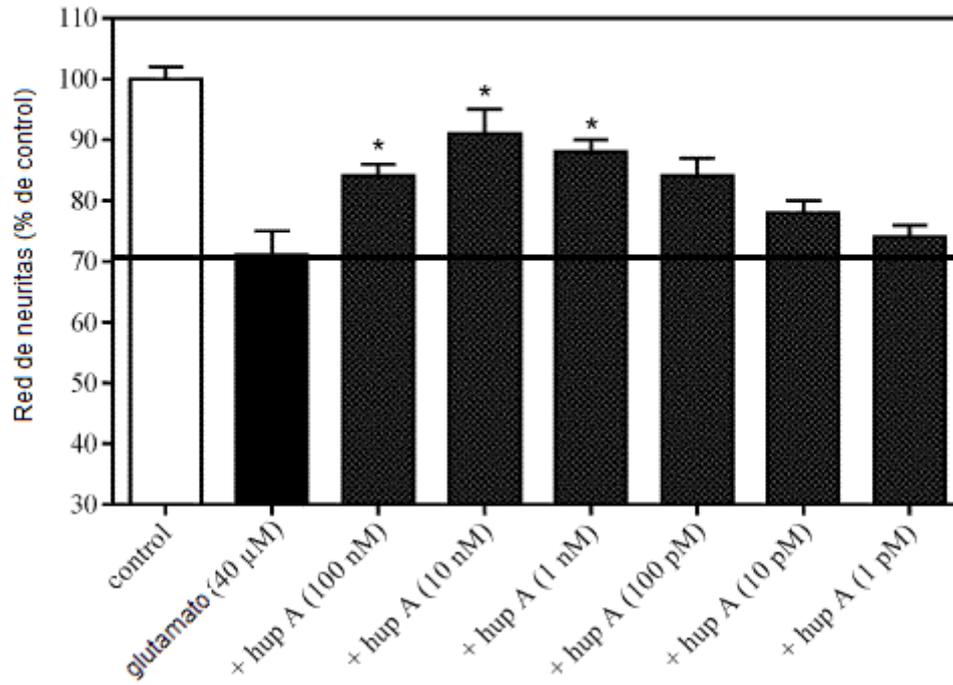


Figura 2b

Efecto de huperzina A (HA) en supervivencia de neuronas corticales lesionadas con glutamato (40 μ M, 20 min)

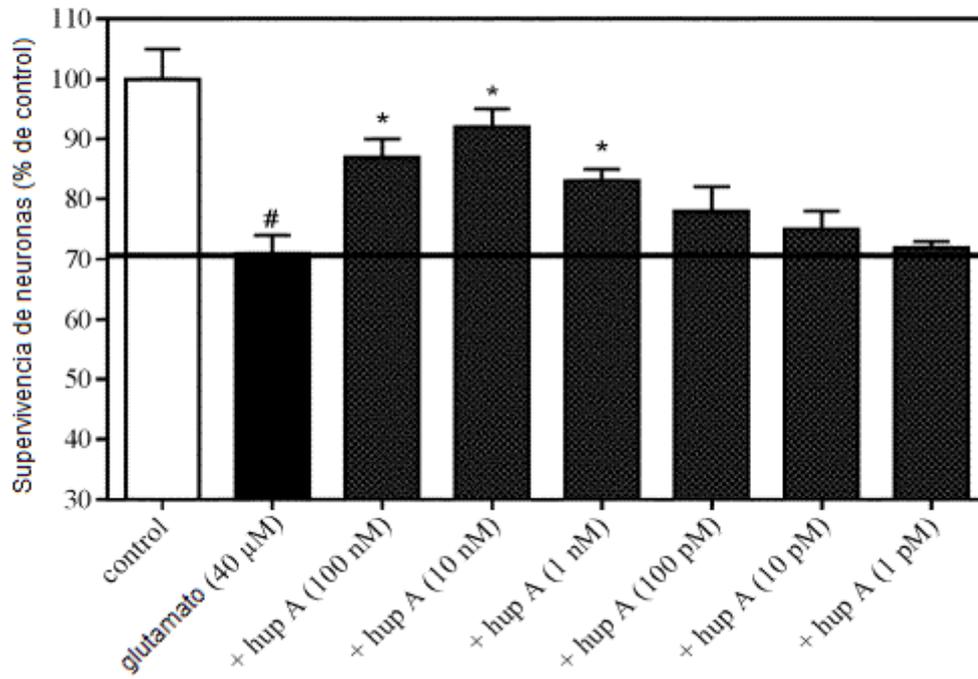


FIGURA 2c

Efecto del ácido cafeico (CA) en la red de neuritas de neuronas corticales lesionadas con glutamato (40 μ M, 20 h)

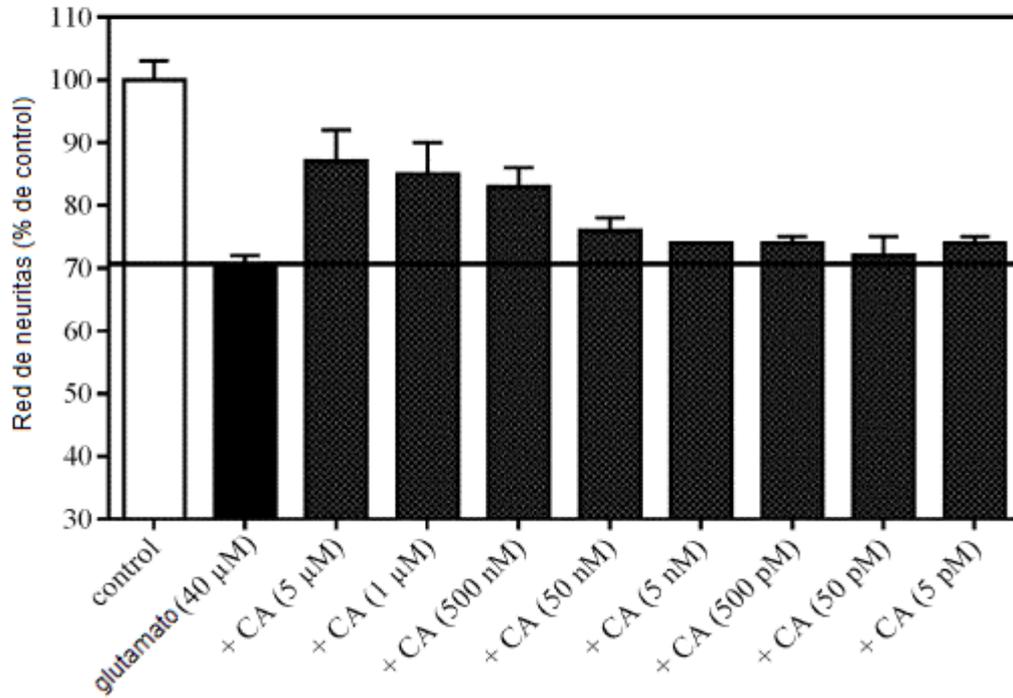


Figura 2d

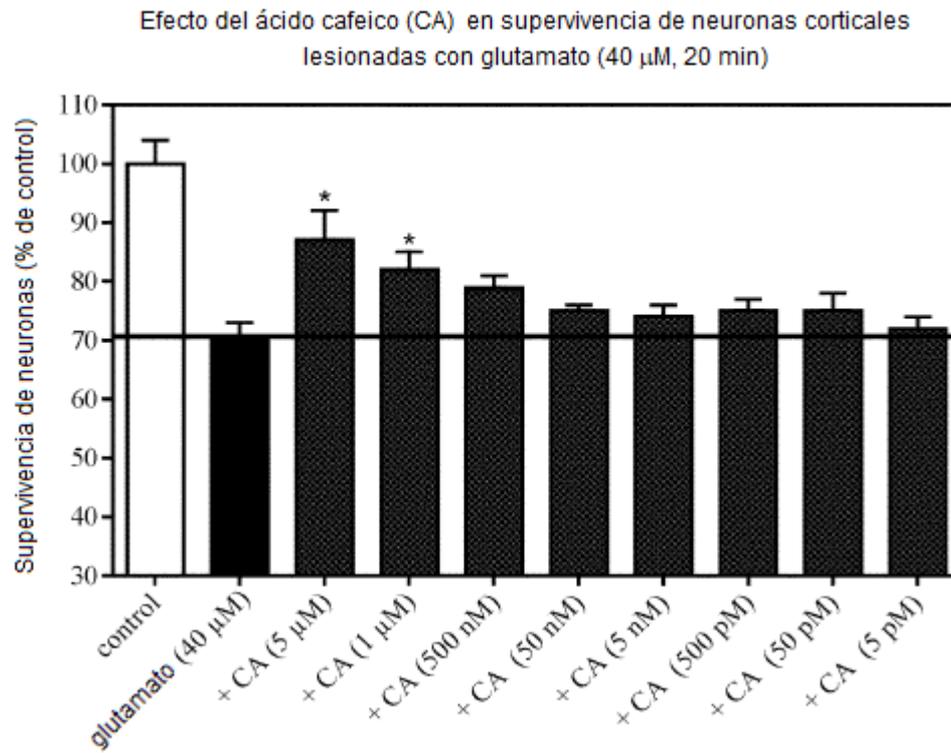


FIGURA 2e

Efecto del ácido ferúlico (FA) en supervivencia de neuronas corticales lesionadas con glutamato (40 μ M, 20 min)

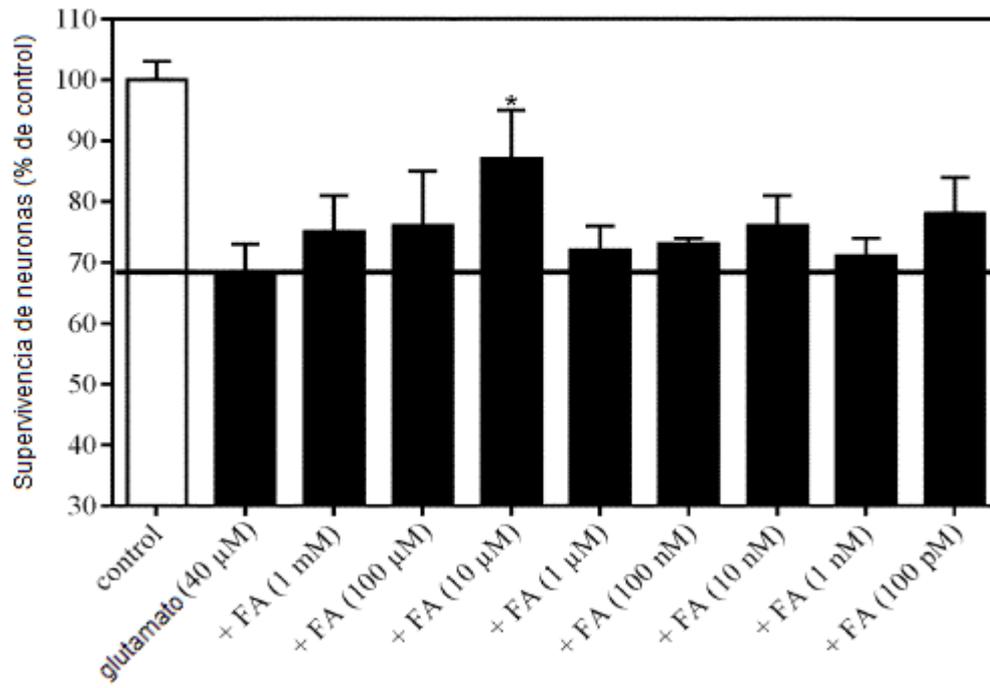


Figura 2f

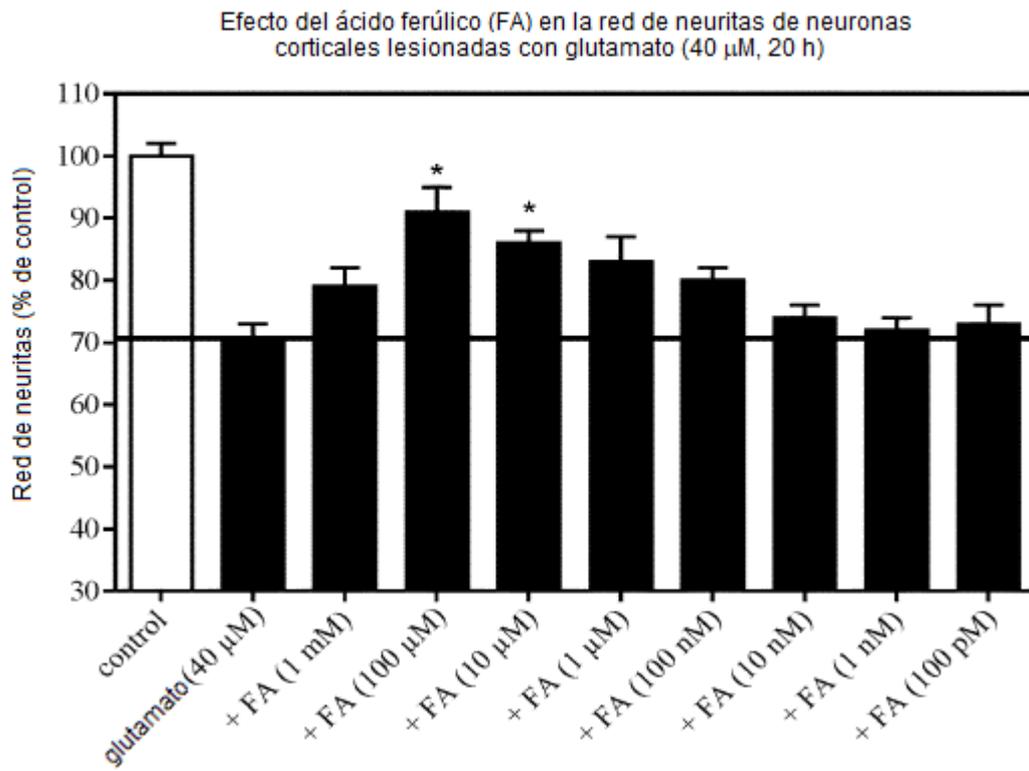


FIGURA 3a

Efecto sinérgico de HA, CA y FA en neuronas corticales lesionadas con glutamato

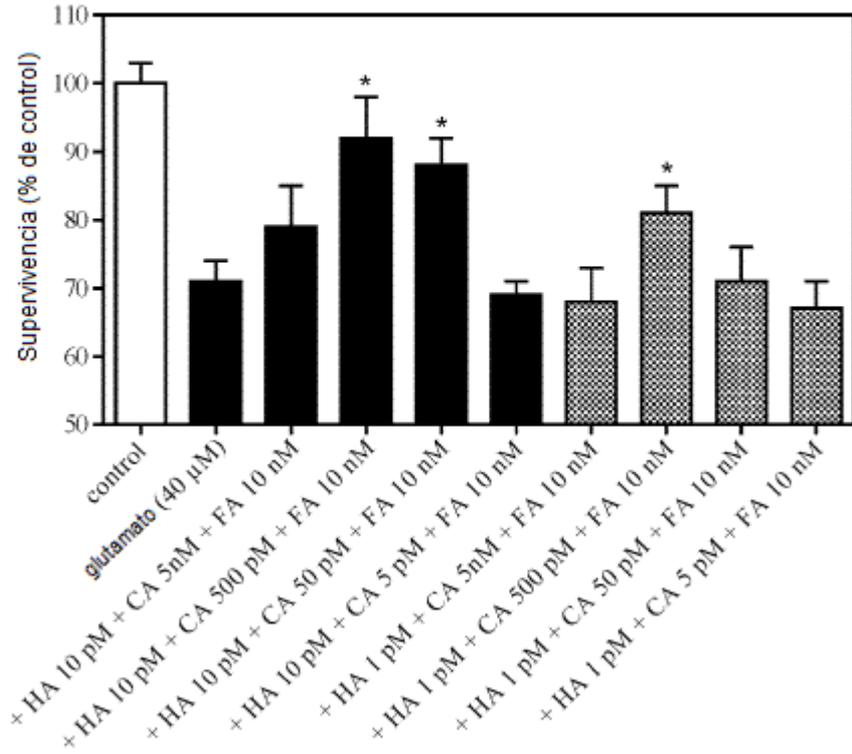


Figura 3b

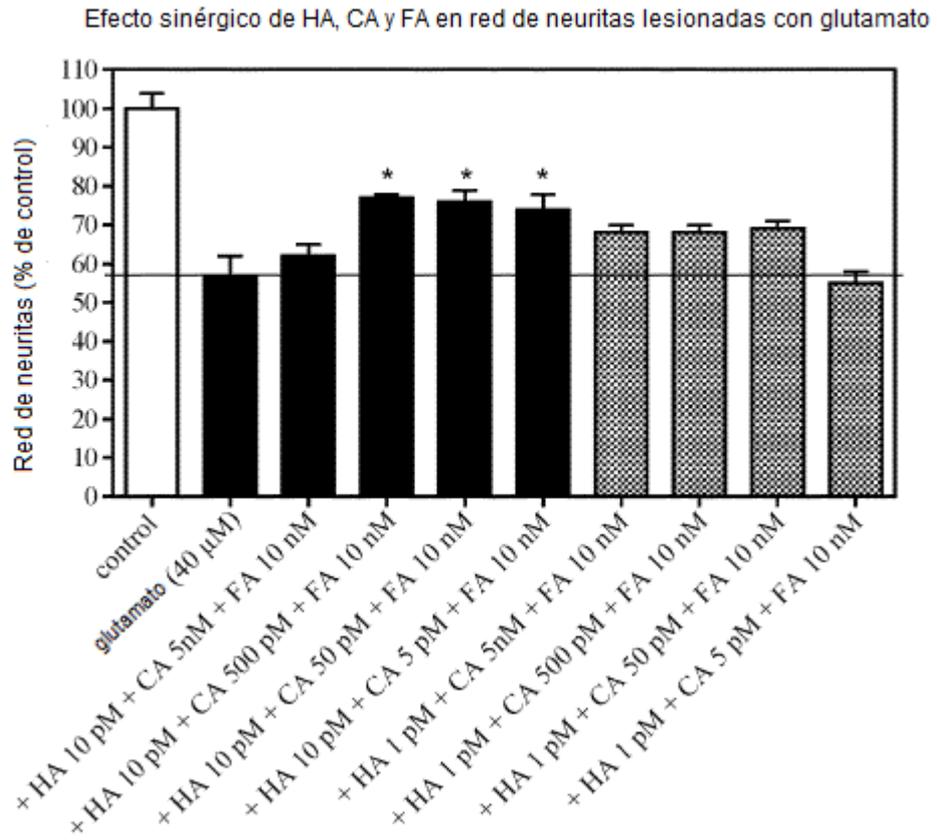


FIGURA 4a

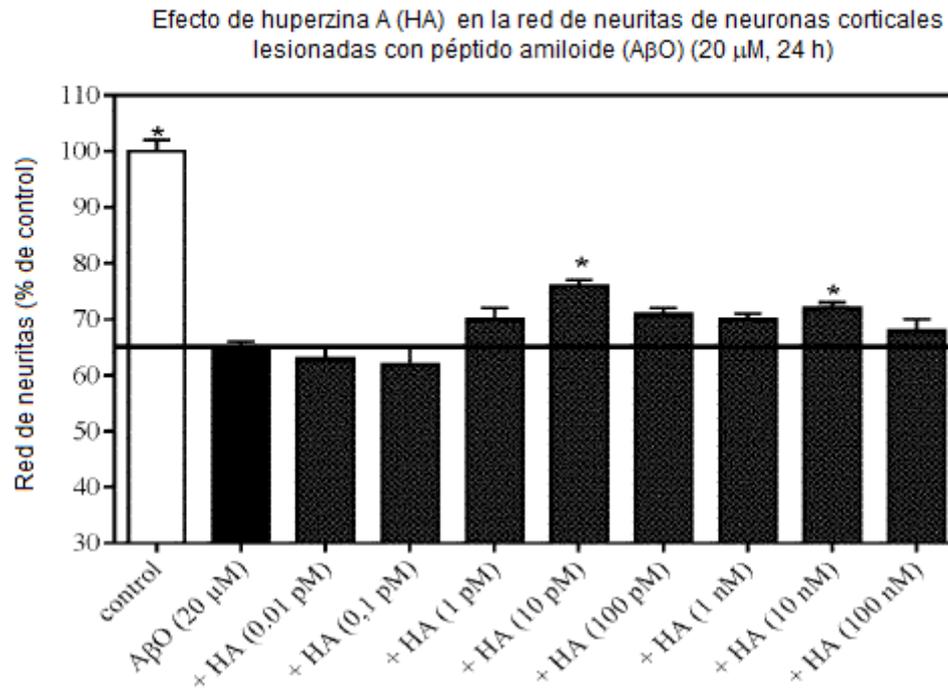


Figura 4b

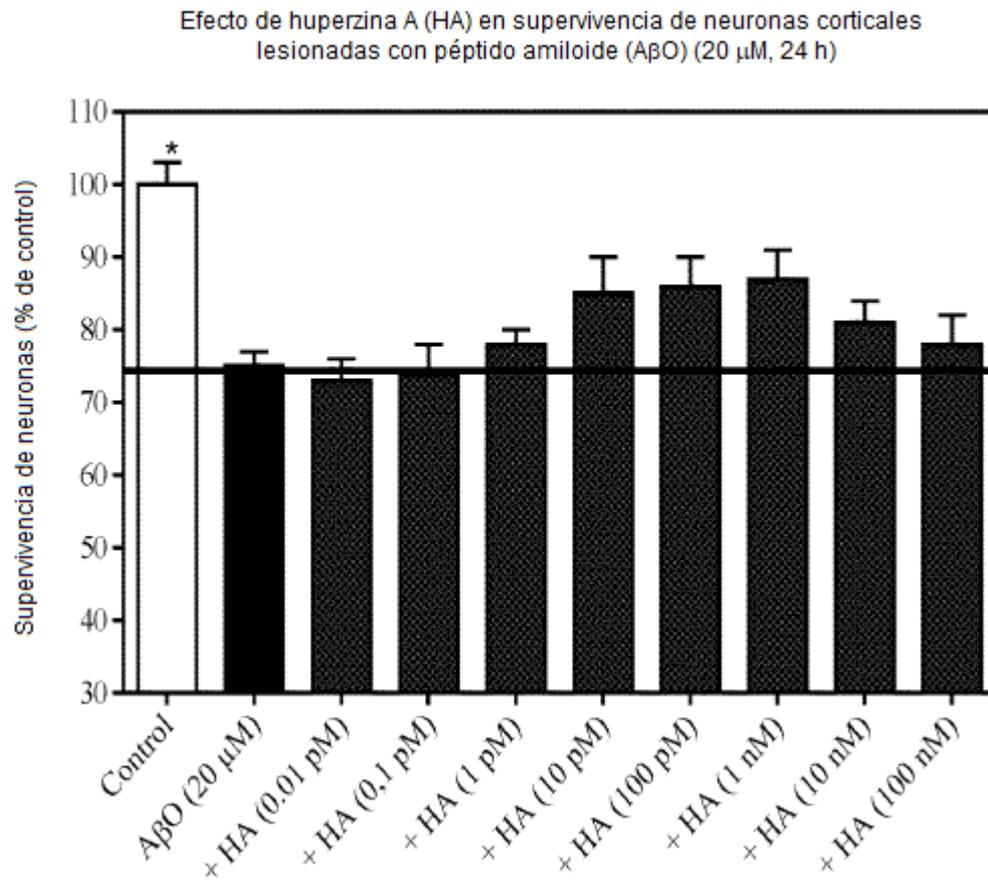


FIGURA 4c

Efecto del ácido cafeico (CA) en la red de neuritas de neuronas corticales lesionadas con péptido amiloide (A β O) (20 μ M, 24 h)

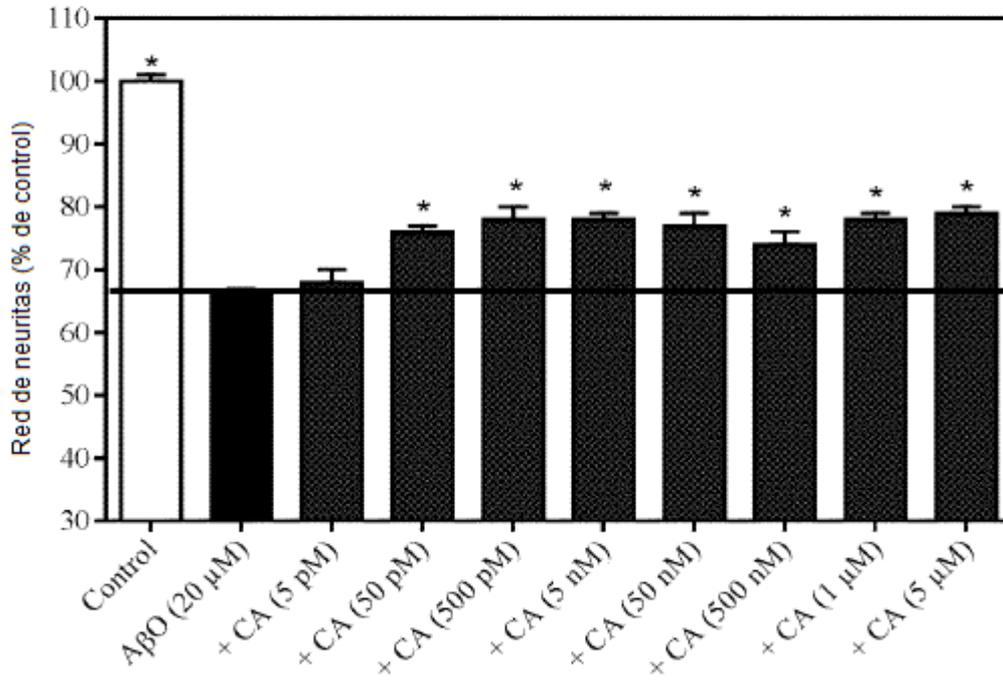


Figura 4d)

Efecto del ácido cafeico (CA) en supervivencia de neuronas corticales lesionadas con péptido amiloide (A β O) (20 μ M, 24 h)

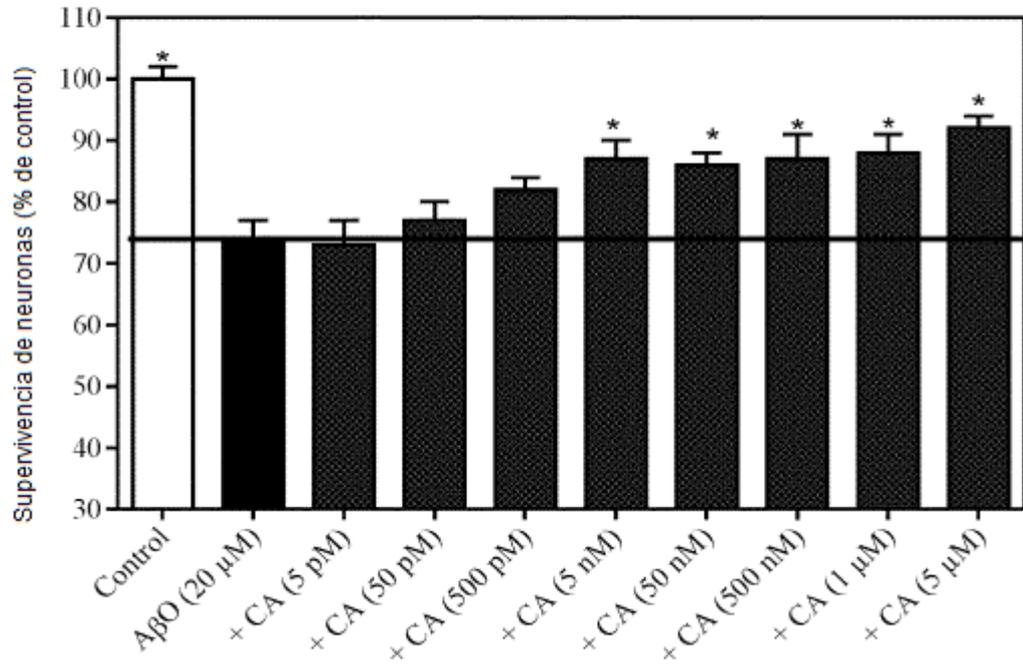


FIGURA 4e

Efecto del ácido ferúlico (FA) en la red de neuritas de neuronas corticales lesionadas con péptido amiloide ($A\beta$ O) (20 μ M, 24 h)

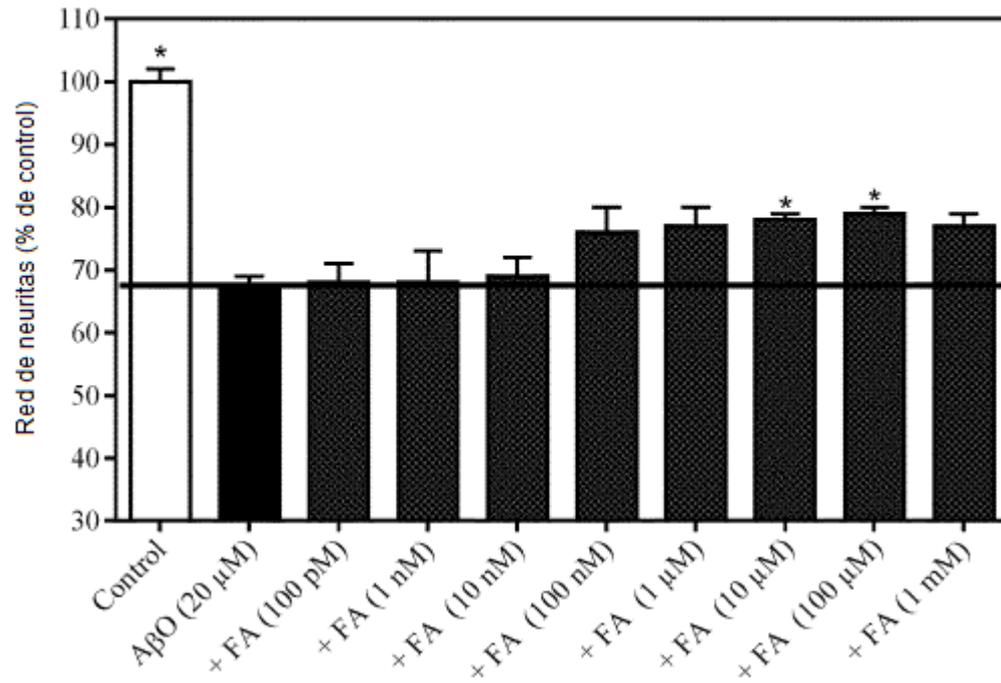


Figura 4f

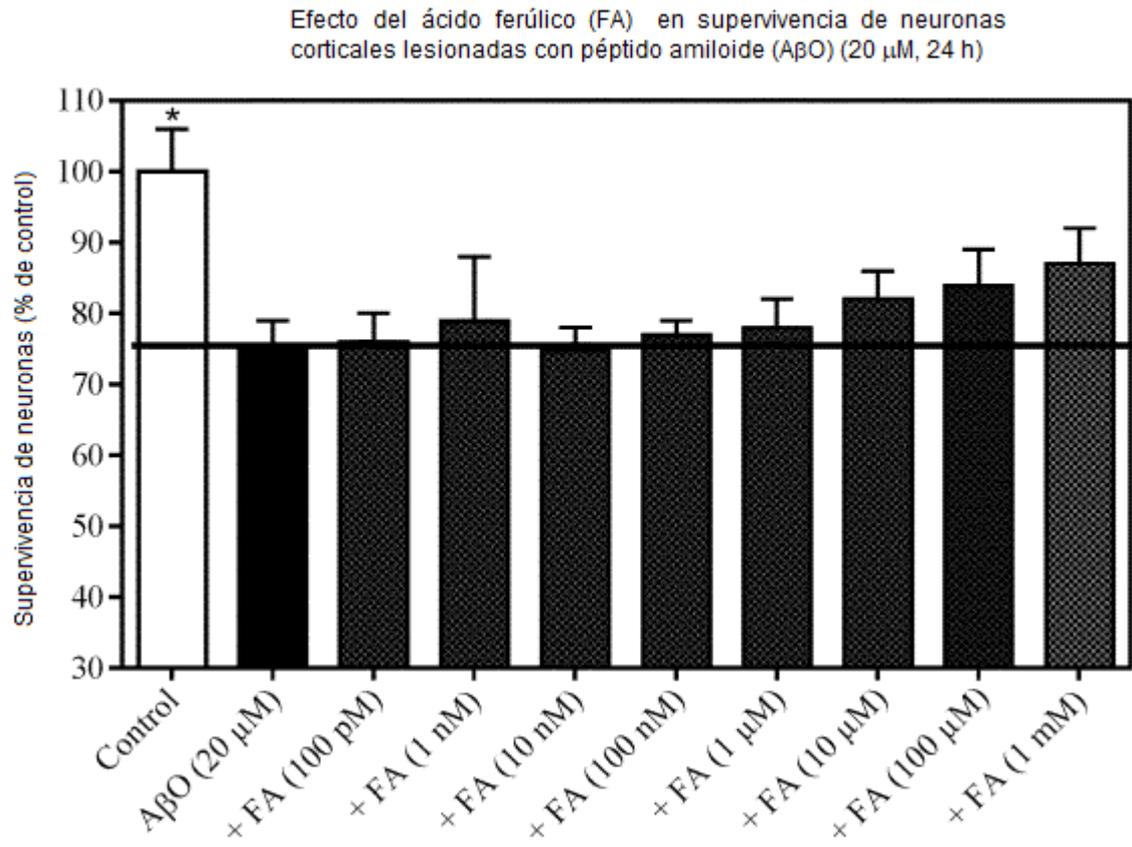


FIGURA 5a

Efecto sinérgico de la mezcla de HA, CA y FA en neuronas corticales lesionadas con A β

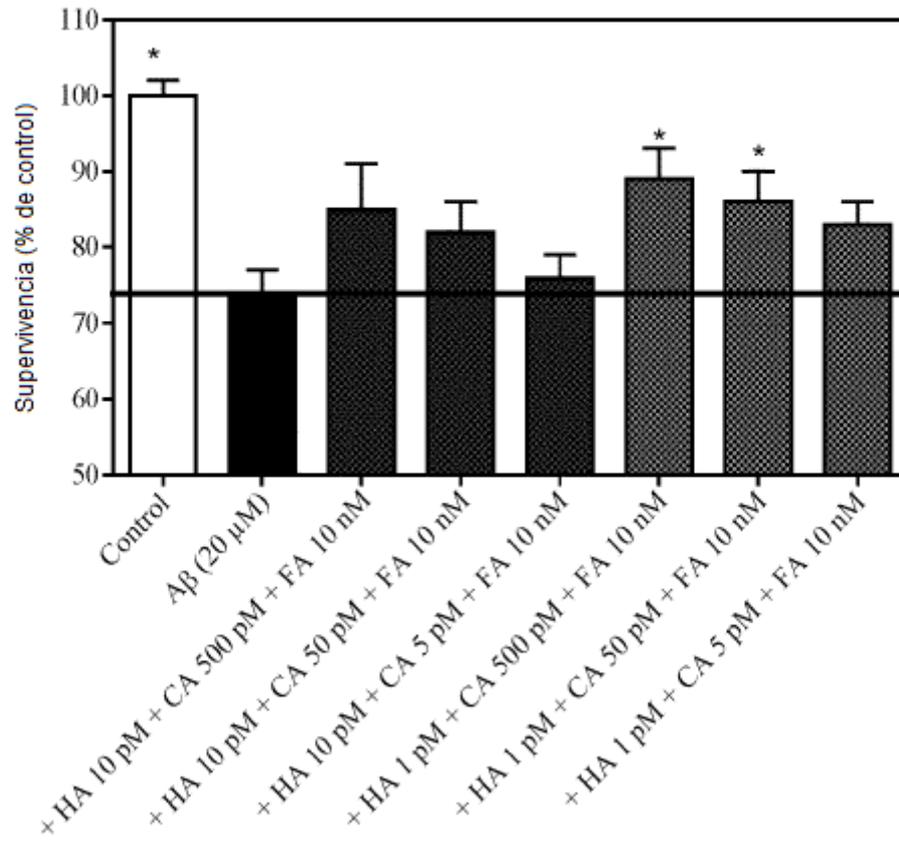


Figura 5b

Efecto sinérgico de la mezcla de HA, CA y FA en red de neuritas lesionadas con péptido amiloide

