

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 254**

51 Int. Cl.:

A61K 31/09 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

C07B 63/00 (2006.01)

C07C 41/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2009 PCT/IN2009/000435**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10150271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09846433 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2445488**

54 Título: **Proceso para la obtención de pteroestilbeno purificado y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

22.06.2009 IN 1481MU2009

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

10.12.2020

73 Titular/es:

**INDUS BIOTECH PRIVATE LIMITED (100.0%)
1 Rahul Residency Plot No.6 & 7, Off Salunke
Vihar Road, Kondhwa
Pune 411 048, Maharashtra, IN**

72 Inventor/es:

**BHASKARAN, SUNIL y
VISHWARAMAN, MOHAN**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

Observaciones:

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

ES 2 798 254 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para la obtención de pteroestilbano purificado y métodos de uso del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de extracción y purificación de un estilbenoide, pteroestilbano, a partir de fuentes botánicas. El proceso implica obtener un pteroestilbano que tiene un alto grado de pureza y la presente invención también se refiere a una forma pura del pteroestilbano obtenido. La invención también se refiere a la formación de complejos del pteroestilbano con vehículos, tales como la ciclodextrina, para la mejora de su solubilidad en agua y biodisponibilidad. La presente divulgación también describe un proceso para la inhibición de las histona desacetilasas usando pteroestilbano, junto con medios para el tratamiento del trastorno de repetición de la poli glutamina con pteroestilbano.

15 Antecedentes y técnica anterior de la invención

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno cerebral progresivo, hereditario y degenerativo que produce anomalías físicas, mentales y emocionales en el organismo. Esta enfermedad se denominó anteriormente Corea de Huntington, derivada de la palabra griega '*coreografía*' (en español) o baile. El nombre se refiere a los movimientos involuntarios y espasmódicos que se desarrollan en las últimas fases de esta enfermedad. Esta enfermedad se clasifica como una 'enfermedad rara' según la Oficina de Enfermedades Raras (OER), que forma parte del Instituto Nacional de Salud (NIH en inglés), de EE.UU. Esta enfermedad afecta a hombres y mujeres de manera indiferente y se produce en adultos a edades variables.

La EH es un trastorno hereditario y neurodegenerativo de del SNC que afecta a los núcleos basales del cerebro. Los núcleos basales son la parte del cerebro que controla las acciones del habla, el movimiento y el pensamiento. Esta enfermedad se transmite como rasgo autosómico dominante aumentando su penetración con la edad. La mutación génica se produce en una expansión de secuencias repetidas de trinucleótidos en la composición genética. El defecto genético responsable de la EH es una pequeña secuencia de ADN en el cromosoma 4 en la que se repiten muchas veces varios pares de bases. El gen normal tiene tres bases de ADN, compuestas por la secuencia de CAG que codifica el aminoácido glutamina. En las personas con la EH, la secuencia se repite de manera anómala docenas de veces, causando múltiples repeticiones de glutamina que conducen a una *afección de repetición de la poliglutamina*. Con el paso del tiempo, y con cada generación sucesiva, el número de repeticiones de CAG se puede expandir adicionalmente.

La EH se produce en 3 fases principales y relativamente distintas basándose en la gravedad de la enfermedad: temprana, intermedia y tardía. En todas las fases de la EH, la pérdida de peso es una complicación importante que puede corresponder al agravamiento de los síntomas y se debe contrarrestar mediante el ajuste de la dieta y el mantenimiento del apetito. A nivel de comportamiento, esta enfermedad se manifiesta en forma de irritabilidad, obsesiones, compulsiones, alucinaciones, deterioro de la memoria, demencia y disminución de la capacidad para ejecutar funciones. Debido a la localización del cerebro afectado, estas anomalías cognitivas van acompañadas del deterioro y las anomalías motoras que conducen a (dependiendo de la fase de la enfermedad) la dificultad en el movimiento y la coordinación. Recientemente, se ha mostrado que los pacientes con la enfermedad de Huntington en fase temprana tienen niveles reducidos de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA en inglés) que indican un déficit de energía con consecuencias que van más allá del SNC. Este aspecto de deficiencia de energía que se observa en los pacientes con la EH forma la base de los modelos animales usados en la evaluación de posibles fármacos para la EH.

Histona desacetilasas (HDAC)

Las HDAC son enzimas que afectan el estado de acetilación de las histonas y otras proteínas celulares importantes. La función de la acetilación de proteínas es una modificación postraducciona importante que regula las funciones celulares, incluyendo el remodelado de la cromatina, la regulación de la transcripción, la dinámica microtubular, el transporte intracelular, el metabolismo y el envejecimiento. Los niveles de acetilación se controlan mediante las histona acetilasas (HAT) y las HDAC que añaden o retiran (respectivamente) grupos acetilo de los sustratos. Un aumento de la acetilación (actividad de la HAT) libera la configuración de la cromatina, lo que conduce a un aumento en la expresión génica, mientras que la desacetilación (actividad de la HDAC) condensa la cromatina, lo que conduce a una disminución de la expresión génica y, por tanto, de la traducción. Por tanto, la regulación por incremento de la transcripción se puede lograr mediante la estimulación de la HAT o la inhibición de la HDAC.

Inhibidores de la HDAC y trastornos de repetición de la poliglutamina

La EH es una enfermedad de repetición de la poliglutamina y los inhibidores de la HDAC pueden desempeñar una función terapéutica importante en tales enfermedades. El mecanismo de neurodegeneración en determinadas enfermedades de repetición de la poliglutamina, como la EH, se conoce relativamente bien y se atribuye en gran medida a aspectos específicos de una irregularidad en la homeostasis neuronal. Esta irregularidad se atribuye a una

acetilación anómala de la histona que conduce a un remodelado de la cromatina diferente, lo que conduce, por tanto, a una expresión e interacción irregular de las proteínas. Adicionalmente, el efecto neuroprotector de los inhibidores de la HDAC se ha documentado bien en modelos tanto de invertebrados como de ratones de la EH y otras enfermedades de repetición de la poliglutamina.

5 Otro aspecto que conduce a la evolución de la EH es un defecto en el transporte basado en microtúbulos que contribuye a la toxicidad neuronal. En vista de esto, la inhibición de la HDAC puede compensar la deficiencia de transporte mediante el aumento de la acetilación de la α -tubulina. La HDAC responsable de la desacetilación de la α -tubulina es la HDAC de Clase III denominada Sirtuinas.

10 Sirtuinas

Las desacetilasas de Clase III o sirtuinas tienen el nombre del gen "*regulador de la información silenciosa 2 (Sir2)*" y son estructuralmente diferentes de otras HDAC. Existen 7 tipos diferentes de sirtuinas que se han identificado y caracterizado y la actividad principal de la desacetilación se atribuye a la SIRT1, SIRT2, SIRT3 y SIRT5.

15 La SIRT2 es una proteína cistólica que desacetila la α -tubulina y los microtúbulos y, en particular, se asocia al SNC, dado que se ha mostrado que esta se localiza en las vainas de mielina y está implicada en la regulación de la mielinización axónica.

20 La SIRT2 es responsable de la desacetilación de la α -tubulina y la evolución de la EH se ve afectada por el estado acetilado de la α -tubulina, una inhibición de la SIRT2 puede resultar terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la EH.

25 Una característica adicional de los inhibidores de la HDAC es que estos son eficaces sobre un espectro de enfermedades, principalmente enfermedades de repetición de la poliglutamina. Asimismo, los inhibidores de la HDAC han mejorado la selectividad, han disminuido la toxicidad y se han convertido en dianas de fármacos importantes.

Pteroestilbeno

30 El pteroestilbeno es un estilbenoide y se halla en el vino, los cacahuetes, las uvas, los frutos del bosque y determinadas especies de *Pterocarpus*. El pteroestilbeno es uno de los muchos hidrocarburos aromáticos denominados 'estilbenos'. Este compuesto tiene potentes propiedades antidiabéticas, propiedades quimioprotectoras y también se está investigando por sus propiedades anticancerígenas. King y col. describen la extracción de pteroestilbeno a partir de materiales vegetales mediante el uso de petróleo (King y col. (1953); (Journal of the Chemical Society, Chemical Society, Letchworth, páginas 3693-3697, DOI: 10.1039/JR9530003693). Medina-Bolivar y col. describen la extracción de pteroestilbeno a partir de materiales vegetales mediante el uso de acetato de etilo (Medina-Bolivar y col. (2007); Phytochemistry, Vol. 68: páginas 1992-2003, DOI: 10.1016/J.Phytochem.2007.04.039). Lopez-Nicolas y col. describen la interacción entre el pteroestilbeno y las ciclodextrinas usando fluorescencia en estado estacionario. Estos observaron que el pteroestilbeno forma un complejo de 1:1 con todas las ciclodextrinas naturales y modificadas que estos sometieron a ensayo (Lopez-Nicolas y col. (2009); J. Agric. Food Chem. Vol. 57: páginas 5294-5300). El documento WO2009/012551 describe complejos de compuestos de resveratrol con ciclodextrina y el uso de los mismos en el tratamiento de varias enfermedades. Se incluyen diversos compuestos en la definición de la expresión compuestos de resveratrol en el documento WO2009/012551. No se desvela, específicamente, un complejo de pteroestilbeno-ciclodextrina.

45 Modelos animales para la evaluación de HP: modelo 3-NP

Está disponible una diversidad de métodos para evaluar y/o controlar la enfermedad de Huntington. Se conoce una diversidad de síntomas clínicos e indicios de la enfermedad. Basándose en los síntomas presentados en la EH, existen varios modelos animales para evaluar posibles candidatos a fármacos de esta enfermedad.

55 Se sabe que el 3-NP (ácido nitropropiónico) causa síntomas de la EH en las ratas. El 3-NP es un inhibidor de la respiración mitocondrial que, en la oxidación, forma un aducto covalente con una arginina de base catalítica. La administración del ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor del ciclo de ácido cítrico mitocondrial, produce una degeneración estriatal muy selectiva y da como resultado un empeoramiento locomotor progresivo en los roedores que se asemeja al de la enfermedad de Huntington.

Publicación de patente estadounidense n.º: S2009/0069444 A1

60 La presente solicitud de patente se refiere a una composición que se usa para someter a tratamiento la agresión oxidativa y, de ese modo, produce una mejora en la memoria de trabajo de un paciente cuando se administra entre los intervalos de dosificación de 2,5 a 20 mg/kg de peso corporal.

65 A fin de establecer el efecto de la composición de la mejora del aprendizaje y la memoria, la presente solicitud usa el ejemplo de Morris Water Maze. Este es un método para someter a ensayo el aprendizaje espacial de la memoria de un paciente y este ensayo depende de la edad y la dieta del paciente. Este ejemplo concluyó los efectos de la dieta

que contiene el pterostilbeno en el rendimiento cognitivo y la memoria de trabajo. Además, este ejemplo reivindica el uso del pterostilbeno en el tratamiento de la agresión oxidativa, mejorando, de ese modo, la función cognitiva.

5 Sin embargo, no se menciona ni se indica el uso del pterostilbeno en la mejora de factores relacionados con trastornos específicos del SNC. Resulta importante señalar que, aunque los trastornos del SNC están relacionados con la edad, estos no se pueden atribuir simplemente a la agresión oxidativa. Puede haber una multitud de otros factores, principalmente genéticos y enzimáticos, que están implicados y, por tanto, conducen a la aparición o evolución de enfermedades del SNC.

10 Publicación de patente estadounidense n.º: US 2007/0249647 A1

15 La presente solicitud de patente se refiere al uso de estilbenos cis o trans sustituidos en el tratamiento del cáncer, afecciones previas al cáncer, afecciones inflamatorias y lesiones isquémicas, como el accidente cerebrovascular. El principal método de acción de la composición reivindicada de la presente solicitud de patente es mediante la inhibición de la actividad del NF-κB. Basándose en esta inhibición, la presente solicitud reivindica el uso de la composición en enfermedades, como la diabetes y el Alzheimer.

Sumario de la invención

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un proceso de obtención de pterostilbeno de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 % de pureza a partir de fuentes botánicas, comprendiendo dicho proceso las etapas de (a) pulverizar y extraer material vegetal con alcohol acuoso para obtener un extracto, (b) filtrar el extracto y someterlo a cromatografía, seguido de la elución con alcohol acuoso, (c) concentrar el disolvente eluido de la Etapa (b) para obtener una pasta, seguido de la redisolución de la pasta en disolvente aromático para obtener una solución, y (d) adsorber en columna la solución para obtener una masa semisólida, seguido del secado para obtener el pterostilbeno; teniendo el pterostilbeno purificado una pureza de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 % sometido a formación de complejos con ciclodextrina, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticos; un proceso para la inhibición de las histona desacetilasas usando pterostilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina, comprendiendo dicho proceso la etapa de poner en contacto la histona desacetilasa con pterostilbeno; y pterostilbeno del 50 % al 99 % de pureza sometido a formación de complejos con ciclodextrina, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticos, para su uso en el tratamiento del trastorno de repetición de la poli glutamina.

Breve descripción de las figuras adjuntas

35 **Figura 1:** efecto del pterostilbeno sobre la inhibición de la SIRT1.
Figura 2: efecto del pterostilbeno sobre la inhibición de la SIRT2.
Figura 3: efecto del compuesto de ensayo sobre el peso cerebral de los ratones.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a un proceso de obtención de pterostilbeno de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 % de pureza a partir de fuentes botánicas, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

45 a. pulverizar y extraer la fuente botánica con alcohol acuoso para obtener un extracto;
 b. filtrar el extracto y someterlo a cromatografía, seguido de la elución con alcohol acuoso,
 c. concentrar el disolvente eluido de la Etapa (b) para obtener una pasta, seguido de la redisolución de la pasta en disolvente aromático para obtener una solución; y
 d. adsorber en columna la solución para obtener una masa semisólida, seguido del secado para obtener el pterostilbeno.

50 En otra realización de la presente invención, la fuente botánica se selecciona de un grupo que comprende el género *Pterocarpus*, *Anogeissus* y *Vaccinium* o la familia *Vitaceae*.

55 En otra realización más de la presente invención, la pulverización se realiza con un tamaño de malla de aproximadamente 0,40 mm (malla 40) a aproximadamente 0,25 mm (malla 60) para obtener material pulverizado.

60 En otra realización más de la presente invención, el material pulverizado se extrae a un intervalo de temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C durante un tiempo de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 h para obtener un extracto, preferentemente a 50 °C durante 10 h.

En otra realización más de la presente invención, el extracto se filtra a través de una malla limpia de acero inoxidable o una tela limpia.

65 En otra realización más de la presente invención, en donde el alcohol acuoso se selecciona de un grupo que comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol butílico o cualquier forma isomérica de los mismos.

En otra realización más de la presente invención, la cromatografía es cromatografía en columna.

5 En otra realización más de la presente invención, la columna es una columna de adsorbente polimérico.

En otra realización más de la presente invención, el disolvente eluido se concentra a un intervalo de temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C al vacío, preferentemente a 40 °C.

10 En otra realización más de la presente invención, el disolvente aromático se selecciona de un grupo que comprende benceno, tolueno y xileno o cualquier homólogo de los mismos.

En otra realización más de la presente invención, la columna usada en la adsorción en columna es una columna de alúmina neutra.

15 En otra realización más de la presente invención, el pteroestilbeno está en forma de polvo de flujo libre.

En otra realización más de la presente invención, la pureza preferida varía de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 %.

20 En otra realización más de la presente invención, el proceso comprende, además, formar complejos de pteroestilbeno con un vehículo.

En otra realización más de la presente invención, el vehículo es ciclodextrina.

25 En otra realización más de la presente invención, la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina.

30 La presente invención se refiere a pteroestilbeno purificado que tiene una pureza de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 % sometido a formación de complejos con ciclodextrina, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticos.

35 En una realización de la presente invención, la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina. La presente invención se refiere a un proceso para la inhibición de las histona desacetilasas usando pteroestilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina, comprendiendo dicho proceso la etapa de poner en contacto la histona desacetilasa con pteroestilbeno.

En otra realización de la presente invención, la histona desacetilasa es SIRT1 o SIRT2.

40 El pteroestilbeno de la presente invención actúa como inhibidor de las histona desacetilasas.

Para tal uso, la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina.

45 La presente invención se refiere a un pteroestilbeno del 50 % al 99 % de pureza sometido a formación de complejos con ciclodextrina, opcionalmente junto con excipientes farmacéuticos, para su uso en el tratamiento del trastorno de repetición de la poli glutamina.

50 En otra realización de la presente invención, el trastorno de repetición de la poli glutamina es la enfermedad de Huntington.

55 En otra realización más de la presente invención, el trastorno de repetición de la poli glutamina comprende ataxias espinocerebelosas (SCA en inglés) 1, ataxias espinocerebelosas (SCA) 2, ataxias espinocerebelosas (SCA) 3, ataxias espinocerebelosas (SCA) 6, ataxias espinocerebelosas (SCA) 7, ataxias espinocerebelosas (SCA) 17, atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA en inglés) y atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRPLA en inglés).

En otra realización más de la presente invención, el pteroestilbeno actúa como inhibidor de las histona desacetilasas en el tratamiento del trastorno de repetición de la poli glutamina.

60 En otra realización más de la presente invención, la histona desacetilasa es SIRT1 o SIRT2, preferentemente SIRT2.

En otra realización más de la presente invención, la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina.

65 En otra realización más de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz de pteroestilbeno varía de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del paciente.

Una realización de la presente invención también se refiere a la extracción de pteroestilbena a partir de fuentes botánicas. Otra realización de la presente invención se refiere a la preparación de pteroestilbena biodisponible con la formación de complejos con ciclodextrina. Otra realización de la presente invención es obtener pteroestilbena a partir de fuentes botánicas con una pureza de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 %. En una realización de la presente invención, el pteroestilbena se extrae a partir de fuentes botánicas de la especie *Pterocarpus*, *Anogeissus* y frutas frescas de *Vitis* y otros frutos del bosque.

En una realización del proceso de extracción de pteroestilbena a partir de fuentes botánicas, el proceso comprende las siguientes etapas:

1. Basándose en la fuente botánica usada:

- a. se usaron virutas de una longitud de 10 mm x 10 mm para la extracción y se pulverizaron en un molino de martillos con un tamaño de malla de 0,40 mm (malla 40) a 0,25 mm (malla 60). El material pulverizado se cargó, a continuación, en un extractor vertical; o
- b. las frutas y los frutos del bosque usados para la extracción eran de origen agrícola o se congelaron y redujeron a pasta y, a continuación, se cargaron para extraerse.

2. Se hizo circular una mezcla caliente de alcohol acuoso (que variaba del 60 % de alcohol prótico alifático al 10 % en volumen) en el extractor a entre 50 y 60 °C durante 8 a 12 h para lograr el máximo extraíble en el líquido. El alcohol prótico alifático usado comprendía metilo, etilo, propilo, butilo, alcohol y/o sus formas isoméricas.

3. El extracto transparente de la etapa anterior se filtró a través de una tela o malla limpia de acero inoxidable para obtener un líquido transparente que se enfrió hasta temperatura ambiente para retirar el material resinoso que se cae fuera al enfriar.

4. Este líquido transparente se hizo pasar a través de una columna de adsorbente que comprendía Dowex-L-493 DOW CHEMICALS o su equivalente Amberlite XAD-4 fabricado por ROHM-HAAS.

5. La salida de columna se controló para detectar la ausencia del fármaco usando técnicas cromatográficas de capa fina con una fase móvil de éter de petróleo y acetato de etilo en la relación de 7:3 en una placa de gel de sílice recubierta previamente.

6. Después del agotamiento completo de la columna, la columna se lavó para eliminar las impurezas adherentes y la materia coloreada con el disolvente que comprendía alcohol acuoso (variando el porcentaje de alcoholes próticos alifáticos del 60 % al 10 % en volumen).

7. La columna se eluyó con el mismo alcohol que se usó para el ciclo de adsorción y el ciclo de lavado, pero la pureza del alcohol se aseguró por encima del 99 %.

8. La finalización de la elución se controló mediante la técnica cromatográfica de capa fina que se usó para el ciclo de absorción.

9. El disolvente eluido, junto con el compuesto, se concentró en un evaporador rotatorio al vacío a entre 40 °C y 60 °C para obtener una pasta. Como alternativa, se puede diluir directamente con agua de manera adecuada para un tratamiento adicional.

10. La pasta se disolvió, a continuación, en una mezcla de disolvente de alcohol acuoso, donde el alcohol era uno prótico alifático que comprendía una combinación o una unidad separada de alcohol etílico, metílico, propílico o butílico en la relación de 1:1, y se extrajo en contracorriente con un disolvente aromático que comprendía benceno y/o sus homólogos, preferentemente un disolvente aromático, como tolueno o xileno.

11. El disolvente extraído se lavó con agua para retirar los colores y se hizo pasar a través de una columna que comprendía alúmina neutra (polvo de óxido de aluminio de 0,40 mm a 0,15 mm (tamaño de malla 40 a 100)). La columna se controló mediante la técnica de cromatografía de capa fina y se recogieron fracciones puras y se concentraron para obtener una masa semisólida.

12. La masa semisólida se secó al vacío a entre 60 y 80 °C para obtener un polvo de flujo libre. El polvo mencionado anteriormente se analizó para determinar el contenido de pteroestilbena trans usando HPLC.

13. El polvo de pteroestilbena aislado se sometió a análisis mediante HPLC, tal como se menciona a continuación:

columna:	Kromasil C-18 RP, 5 µ, 250 mm X 4,6 mm
detector:	313 nm UV
caudal:	1 ml/min

fase móvil:	una mezcla de ácido ortofosfórico al 0,1 % en agua:acetonitrilo que se mezcló, filtró, desgasificó
patrón de referencia:	pieza Chromadex n.º 16995-10, lote n.º 16995-102, reactivo de pureza al 99,9 %.

El pterostilbino aislado se obtiene con altos niveles de pureza y esta pureza se obtiene debido a la combinación de diversos disolventes y columnas de resina usadas en el proceso. La secuencia de todo el proceso también es un factor crítico que contribuye a los altos niveles del pterostilbino puro obtenido.

5 La pureza del pterostilbino aislado varía de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 %, preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 99 %, más preferentemente de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 % y lo más preferentemente de aproximadamente el 92 % a aproximadamente el 99 %.

10 El pterostilbino aislado, opcionalmente, se somete a formación de complejos con vehículos adecuados para hacer que el compuesto sea más soluble en agua y biodisponible. Los vehículos adecuados incluyen diversas formas de ciclodextrina, seleccionadas del grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina.

15 La presente invención se elabora, adicionalmente, con la ayuda de los Ejemplos y las Figuras que se adjuntan. Sin embargo, no se debe interpretar que los Ejemplos limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1:

20 Se cortaron 100 kg de madera dura de *Pterocarpus marsupium* en trozos pequeños de 10 mm de longitud. Estos trozos se pulverizaron en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se apilaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente.

25 La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol etílico (acuoso) a 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía Dowex L-493 y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con alcohol etílico al 60 % en agua hasta que no hubo color.

30 El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con 50 litros de tolueno X3 veces y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 10 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 96 % puro.

40 Ejemplo 2:

Se cortaron 100 kg de madera dura de *Pterocarpus marsupium* en trozos pequeños de 10 mm de longitud. Estos trozos se pulverizaron en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se apilaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente.

45 La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol isopropílico (acuoso) a 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía Amberlite XAD-4 y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con isopropilo al 60 % en agua hasta que no hubo color.

50 El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con 50 litros de tolueno X 3 veces y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 10 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 99 % puro.

Ejemplo 3:

Se cortaron 100 kg de virutas de madera de *Anogeissus acuminata* (fassi) en trozos pequeños de 10 mm de longitud. Estos trozos se pulverizaron en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se apilaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente.

La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol metílico (acuoso) a 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía Amberlite XAD-4 y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con alcohol metílico al 60 % en agua hasta que no hubo color.

El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con tolueno y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 10 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 92 % puro.

Ejemplo 4:

Se tomaron 256 g del pterostilbeno al 96 % (del Ejemplo 1) junto con 2.500 cm³ de alcohol etílico. Esta solución se calentó en agitación a 70 °C para obtener una solución transparente. A esta solución una solución acuosa de hidróxido de sodio que comprendía 40 g de hidróxido de sodio y 400 cm³ de agua. Esta solución se calentó a reflujo durante 2 h a 75 °C y, a esta, se añadieron 1,25 kg de β-ciclodextrina y se calentó a reflujo durante más tiempo hasta que se formó una solución transparente. Esta solución se agitó y enfrió lentamente y se removió a temperatura ambiente durante 6 h y se filtró. Los cristales filtrados se secaron al vacío durante 6 h a 60 °C. Este se analizó mediante HPLC y se halló que la pureza era del 15,3 % de pterostilbeno. Este es soluble en agua y se puede administrar en ensayos.

Ejemplo 5:

El arándano congelado deshuesado se redujo a pasta en una máquina de reducción a pasta. La pasta se extrajo con alcohol etílico al 60 % en agua a temperatura ambiente durante 5 h y se filtró limpia de cualquier fibra y trozo de cáscara. El filtrado transparente se sometió a la columna de adsorbente usando Amberlite XAD-4 y se lavó a fondo con alcohol etílico al 60 % hasta que el eluyente estaba libre de colores. La columna se sometió adicionalmente a una elución alcohólica pura y el eluido se diluyó con agua, seguido de filtración y dilución para lograr un contenido de alcohol del 50 % en el líquido. Este líquido se sometió a extracción en contracorriente con tolueno y, finalmente, se sometió a una columna de alúmina neutra y se concentró y se secó. Este polvo se analizó para determinar el pterostilbeno trans y contiene el 96 %.

Ejemplo 6:

Se pulverizaron virutas de madera dura de *Pterocarpus santalinoso* (raktha chandan) de 8 a 10 mm de espesor en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se empaquetaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente.

La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol etílico (acuoso) a 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía Amberlite XAD-4 y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con alcohol metílico al 60 % en agua hasta que no hubo color.

El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con tolueno y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 10 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 94 %.

Ejemplo 7:

El polvo de pterostilbena del Ejemplo 1 se disolvió en alcohol, preferentemente alcohol etílico o alcohol isopropílico, a una temperatura de reflujo. A este se añadió un equivalente de una base, preferentemente hidróxido de sodio, en solución acuosa y se calentó a reflujo durante un mínimo de 2 h y se pudo prolongar hasta 6 h a temperatura de reflujo. A la solución caliente anterior, se añadió lentamente un equivalente de β -ciclodextrina en agitación a temperatura de reflujo.

La mezcla anterior se calentó a reflujo adicionalmente durante 3 horas más y se enfrió en agitación. La mezcla anterior se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 3 h y se filtró. Los sólidos se recogieron y se secaron al vacío a 60 °C durante un mínimo de 6 h hasta alcanzar un peso constante. El material anterior se espolvoreó y se analizó para determinar el contenido de pterostilbena usando HPLC.

Ejemplo 8: proceso de extracción de pterostilbena comercialmente escalable

Se cortaron 1.000 kg de madera dura de *Pterocarpus marsupium* en trozos pequeños de 10 mm de longitud. Estos trozos se pulverizaron en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se apilaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente.

La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol etílico (acuoso) a 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía 275 litros de Dowex L-493 o su equivalente y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con alcohol etílico al 60 % en agua hasta que no hubo color.

El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con 500 litros de tolueno X3 veces y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 100 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío para obtener 5,3 kg de polvo de color blanquecino. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 96 %.

Ejemplo 9: efecto sobre las enzimas SIRT1 y SIRT2 (*in vitro*): inhibición de SIRT 1 y 2

Se han identificado siete homólogos (SIRT1-7) en el genoma humano. A pesar de su actividad enzimática en sustratos de histona *in vitro*, la evidencia sugiere que las proteínas de la SIRT se dirigen predominantemente a proteínas que no son histona para la desacetilación tanto en el núcleo como en el citoplasma.

Las proteínas de la histona desacetilasa HDAC humana se organizan en clases basándose en su similitud con las proteínas de la HDAC de levadura. Las HDAC de Clase III, también denominadas sirtuinas (SIRT), son homólogas del regulador de la información silenciosa del represor de transcripción de levadura 2p (Sir2p).

Este ejemplo evalúa el efecto del compuesto de ensayo sobre las enzimas SIRT 1 y 2.

Se usó la desacetilasa sirtuina SIRT2 recombinante humana expresada en *E. coli*. El compuesto de ensayo (1, 10, 100 y 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de conc.) y/o vehículo se incubó previamente con una enzima de 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de Tris-HCl a pH 8,0 durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se inicia mediante la adición de Fluor de Lys-SIRT1 25 μM y NAD 150 μM durante otro período de incubación de 120 minutos y se termina mediante la adición adicional de desarrollador Fluor de Lys. La determinación de la cantidad de Fluor de Lys de desacetato formado se lee espectrofluorimétricamente con excitación a 360 nm y emisión a 465 nm. La curva de concentración-respuesta (% de inhibición) se representó y se calculó la CI_{50} .

Los resultados de este ejemplo se muestran en el gráfico representado en la FIG. 1 y la FIG. 2, respectivamente.

- Se halló que la CI_{50} de la SIRT1 era de 12,1 $\mu\text{g/ml}$ (es decir, 0,047 $\mu\text{M/ml}$) = 47 nM/ml
- Se halló que la CI_{50} de la SIRT2 era de 11,7 $\mu\text{g/ml}$ (es decir, 0,045 $\mu\text{M/ml}$) = 45 nM/ml

Ejemplo 10: efecto sobre la EH inducida con 3-NP en ratas *in vivo*

Se ha mostrado que el 3-NP (ácido 3-nitropropiónico) causa síntomas de la enfermedad de Huntington en las ratas expuestas. La administración del ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor del ciclo de ácido cítrico mitocondrial, produce una degeneración estriatal muy selectiva y da como resultado un empeoramiento locomotor progresivo en los roedores que se asemeja al de la enfermedad de Huntington.

Se administró 3-NP (20 mg/kg por vía intraperitoneal, diariamente en 2 dosis divididas) a todas las ratas Wistar de un

intervalo de peso de 250-300 g en dos dosis divididas a intervalos de 12 h durante 9-11 días hasta que se indujo la enfermedad (dolencia aguda). Este tardó 12 días en inducir completamente los síntomas de la enfermedad. El 3-NP se diluyó con agua y el pH se ajustó hasta 7,4 con NaOH. Este se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg cada 12 h (8:00 a. m. y 8:00 p. m.) durante 12 días (dosis diaria total de 20 mg/kg). Las observaciones se realizaron los días 0, 7, 9, 11 y 13. El compuesto de ensayo se administró durante el mismo período por vía oral una hora antes de la inyección de 3-NP (a las 7:00 a. m. diariamente) a una dosis de 30 mg/kg, por vía oral. Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) control sano: sin tratamiento, 2) control con EH (3-NP + ciclodextrina) y 3) COMPUESTO DE ENSAYO (30 mg/kg, por vía oral, diariamente, sometido a formación de complejos con ciclodextrina) sometido a tratamiento.

El resultado de este ejemplo se evaluó basándose en los siguientes parámetros:

2) Peso corporal

Tabla 1: efecto del compuesto de ensayo sobre el % de diferencia de los pesos corporales de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA. (el n.º de animales en cada grupo fue de 6)

Día de tratamiento	Control sano	Ciclo + 3-NPA	Ensayo (30) + 3-NPA
Día 7	4,59 ± 2,82	-5,37 ± 2,80	1,90 ± 3,72
Día 9	2,74 ± 2,79	-10,75 ± 2,96	-0,82 ± 3,77
Día 11	3,12 ± 2,83	-12,48 ± 3,49	-2,53 ± 3,70
Día 13	3,64 ± 2,72	-14,81 ± 3,15	-6,08 ± 4,10

2) Problemas neurológicos

Los cambios de comportamiento se registraron diariamente e inmediatamente antes de sacrificarse, graduados de acuerdo con la escala neurológica descrita. Se incluyeron 6 grados en total:

- Grado 0: comportamiento normal;
- Grado 1: lentitud general en el movimiento debido a un deterioro leve de las extremidades posteriores;
- Grado 2: anomalía notable de la marcha con una coordinación deficiente;
- Grado 3: parálisis casi completa de las extremidades posteriores;
- Grado 4: incapacidad para moverse debido a un deterioro de las cuatro extremidades; y
- Grado 5: decúbito.

Después de 12 días de tratamiento con 3-NPA (20 mg/kg, al día), el tratamiento aumentó los problemas neurológicos de 0 a 17, mientras que el tratamiento de ensayo restringió los problemas a 13. El COMPUESTO DE ENSAYO pudo reducir los problemas neurológicos en el 23,52 % en comparación con el grupo de vehículo (ciclo + 3-NPA). Los resultados se dan tal como se refleja en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: efecto del compuesto de ensayo sobre los cambios de comportamiento neurológicos después de la inducción de la EH con 3-NPA.

Día de tratamiento	Control sano	Ciclo + 3-NPA	Ensayo (30) + 3-NPA (% de cambio del tratamiento con ciclo + 3-NPA)
Día 7	0	6	0
Día 9	0	6	1 (-83,33 %)
Día 11	0	10	7 (-30 %)
Día 13	0	17	13 (-23,52 %)

3) N.º de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto

Efecto del compuesto de ensayo sobre el número de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA

Tabla 3: efecto del compuesto de ensayo sobre el número de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA

Día de tratamiento	Control sano	Ciclo + 3-NPA	Ensayo (30) + 3-NPA
Día 7	167,50 ± 10,93	146,83 ± 5,88	144,17 ± 7,47
Día 9	170,33 ± 8,53	90,00 ± 6,74###	125,67 ± 6,22*
Día 11	166,50 ± 12,74	63,67 ± 7,43###	109,00 ± 13,72**
Día 13	158,33 ± 13,21	55,33 ± 7,68###	77,83 ± 6,92*

4) **Peso cerebral**

5 El día 13, los cerebros de las ratas se diseccionaron y limpiaron. Se registró el peso en húmedo de los cerebros de cada rata. Los resultados también se representan gráficamente en la FIG. 3.

Tabla 4: efecto del compuesto de ensayo sobre el peso cerebral (g) de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA

Día de tratamiento	Peso cerebral (g)-Media ± SEM		
	Control sano	Ciclo + 3-NPA	Ensayo (30) + 3-NPA
Día 13	1,675 ± 0,0472	1,323 ± 0,0521###	1,605 ± 0,0659***

15 Basándose en el Ejemplo 10, se puede concluir que el compuesto de ensayo revierte significativamente los síntomas de la EH inducida con 3-NP. Después de 11 días, el 3-NP induce una reducción del 12,48 % del peso corporal, mientras que el compuesto de ensayo detiene la reducción del peso corporal y causa solo una reducción del 2,53 % del peso corporal. Por otra parte, la puntuación neurológica (indicativa de la evolución de la EH) fue significativamente menor (en el 23,52 %) en el grupo de compuesto de ensayo. El daño neuronal por 3-NP se revirtió mediante el compuesto de ensayo, que resulta evidente por el aumento significativo en el número de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto.

20 La contracción del cerebro es un parámetro clínico importante que se puede observar después de la inducción de la EH con 3-NP en ratas. El 3-NP redujo el peso del cerebro de 1,675 a 1,323, mientras que el compuesto de ensayo revirtió esta pérdida de peso del cerebro.

Ejemplo 11:

25 Se cortaron 100 kg de madera dura de *Pterocarpus marsupium* en trozos pequeños de 10 mm de longitud. Estos trozos se pulverizaron en polvo de 0,40 mm (malla 40) en un molino de martillos y se apilaron en un extractor tubular vertical. La parte inferior del extractor comprende una placa perforada sobre la que se fijó la tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a un receptor, que a su vez se puede usar como depósito, para el bombeo del extracto, así como la circulación del extracto en el tubo en contracorriente o de manera concurrente. La masa mencionada anteriormente se extrajo con seis volúmenes de lecho del 60 % de volumen en volumen de alcohol etílico (acuoso) a 30 55 °C. El lecho se volvió a extraer de tal manera que se recogió un extracto en la parte inferior y se hizo circular de nuevo en condiciones calientes durante 8 h y, después de 8 h, este se filtró de forma transparente. El filtrado transparente se hizo pasar por la parte inferior de una columna de adsorbente que comprendía Dowex L-493 y el flujo de salida de líquido se controló mediante cromatografía en capa fina usando una fase móvil de éter de petróleo:acetato de etilo en la relación de 7:3. Después de lograr la saturación de columna, la columna se lavó con alcohol etílico al 35 60 % en agua hasta que no hubo color.

40 El lecho se eluyó con alcohol etílico puro a temperatura ambiente y los eluidos se recogieron en la parte inferior. El disolvente eluido se diluyó con agua para obtener el producto en forma de solución en una solución alcohólica al 50 %. Este se extrajo con 50 litros de tolueno X3 veces y la capa superior de tolueno se recogió y se hizo pasar a través de 10 kg de columna de alúmina neutra y se concentró a 60 °C al vacío. El polvo resultante se analizó mediante HPLC y se halló que era el 96 % puro.

45 Se tomaron 256 g del pteroesilbino purificado anterior junto con 2.500 cm³ de alcohol etílico. Esta solución se calentó en agitación a 70 °C para obtener una solución transparente. A esta solución una solución acuosa de hidróxido de sodio que comprendía 40 g de hidróxido de sodio y 400 cm³ de agua. Esta solución se calentó a reflujo durante 2 h a 75 °C y, a esta, se añadieron 1,25 kg de β-ciclodextrina y se calentó a reflujo durante más tiempo hasta que se formó una solución transparente. Esta solución se agitó y enfrió lentamente y se removió a temperatura ambiente durante 50 6 h y se filtró. Los cristales filtrados se secaron al vacío durante 6 h a 60 °C. Este se analizó mediante HPLC y se halló que la pureza era del 15,3 % de pteroesilbino. Este es soluble en agua y se puede administrar en ensayos.

Efecto sobre las enzimas SIRT1 y SIRT2 (in vitro): inhibición de SIRT 1 y 2

55 Se han identificado siete homólogos (SIRT1-7) en el genoma humano. A pesar de su actividad enzimática en sustratos

de histona *in vitro*, la evidencia sugiere que las proteínas de la SIRT se dirigen predominantemente a proteínas que no son histona para la desacetilación tanto en el núcleo como en el citoplasma.

Las proteínas de la histona desacetilasa HDAC humana se organizan en clases basándose en su similitud con las proteínas de la HDAC de levadura. Las HDAC de Clase III, también denominadas sirtuinas (SIRT), son homólogas del regulador de la información silenciosa del represor de transcripción de levadura 2p (Sir2p).

Este ejemplo evalúa, por tanto, el efecto del compuesto de ensayo sobre las enzimas SIRT 1 y 2.

Se usó la desacetilasa sirtuina SIRT2 recombinante humana expresada en *E. coli*. El compuesto de ensayo (1, 10, 100 y 1.000 µg/ml de conc.) y/o vehículo se incubó previamente con una enzima de 2 µg/ml en tampón de Tris-HCl a pH 8,0 durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se inicia mediante la adición de Fluor de Lys-SIRT1 25 µM y NAD 150 µM durante otro período de incubación de 120 minutos y se termina mediante la adición adicional de desarrollador Fluor de Lys. La determinación de la cantidad de Fluor de Lys de desacetato formado se lee espectrofluorimétricamente con excitación a 360 nm y emisión a 465 nm. La curva de concentración-respuesta (% de inhibición) se representó y se calculó la CI_{50} .

Los resultados de este ejemplo se muestran en el gráfico representado en la FIG. 1 y la FIG. 2, respectivamente.

- Se halló que la CI_{50} de la SIRT1 era de 12,1 µg/ml (es decir, 0,047 µM/ml) = 47 nM/ml
- Se halló que la CI_{50} de la SIRT2 era de 11,7 µg/ml (es decir, 0,045 µM/ml) = 45 nM/ml

20 Efecto sobre la EH inducida con 3-NP en ratas *in vivo*

Se ha mostrado que el 3-NP (ácido 3-nitropropiónico) causa síntomas de la enfermedad de Huntington en las ratas expuestas. La administración del ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor del ciclo de ácido cítrico mitocondrial, produce una degeneración estriatal muy selectiva y da como resultado un empeoramiento locomotor progresivo en los roedores que se asemeja al de la enfermedad de Huntington.

Se administró 3-NP (20 mg/kg por vía intraperitoneal, diariamente en 2 dosis divididas) a todas las ratas Wistar de un intervalo de peso de 250-300 g en dos dosis divididas a intervalos de 12 h durante 9-11 días hasta que se indujo la enfermedad (dolencia aguda). Este tardó 12 días en inducir completamente los síntomas de la enfermedad. El 3-NP se diluyó con agua y el pH se ajustó hasta 7,4 con NaOH. Este se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg cada 12 h (8:00 a. m. y 8:00 p. m.) durante 12 días (dosis diaria total de 20 mg/kg). Las observaciones se realizaron los días 0, 7, 9, 11 y 13. El compuesto de ensayo se administró durante el mismo período por vía oral una hora antes de la inyección de 3-NP (a las 7:00 a. m. diariamente) a una dosis de 30 mg/kg, por vía oral. Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) control sano: sin tratamiento, 2) control con EH (3-NP + ciclodextrina) y 3) COMPUESTO DE ENSAYO (30 mg/kg, por vía oral, diariamente, sometido a formación de complejos con ciclodextrina) sometido a tratamiento.

El resultado de este ejemplo se evaluó basándose en los siguientes parámetros:

40 **1) Peso corporal**

La Tabla 1 anterior indica el efecto del compuesto de ensayo sobre el % de diferencia de los pesos corporales de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA. (*el n.º de animales en cada grupo fue de 6*)

45 **2) Problemas neurológicos**

Los cambios de comportamiento se registraron diariamente e inmediatamente antes de sacrificarse, graduados de acuerdo con la escala neurológica descrita. Se incluyeron 6 grados en total:

- 50 Grado 0: comportamiento normal;
 Grado 1: lentitud general en el movimiento debido a un deterioro leve de las extremidades posteriores;
 Grado 2: anomalía notable de la marcha con una coordinación deficiente;
 Grado 3: parálisis casi completa de las extremidades posteriores;
 Grado 4: incapacidad para moverse debido a un deterioro de las cuatro extremidades; y
 55 Grado 5: decúbito.

Después de 12 días de tratamiento con 3-NPA (20 mg/kg, al día), el tratamiento aumentó los problemas neurológicos de 0 a 17, mientras que el tratamiento de ensayo restringió los problemas a 13. El COMPUESTO DE ENSAYO pudo reducir los problemas neurológicos en el 23,52 % en comparación con el grupo de vehículo (ciclo + 3-NPA). Los resultados se reflejan en la Tabla 2 anterior.

60 **3) N.º de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto**

El efecto del compuesto de ensayo sobre el número de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA se resume en la Tabla 3 anterior.

4) Peso cerebral

5 El día 13, los cerebros de las ratas se diseccionaron y limpiaron. Se registró el peso en húmedo de los cerebros de cada rata. Los resultados también se representan gráficamente en la FIG. 3. La Tabla 4 anterior muestra el efecto del compuesto de ensayo sobre el peso cerebral (g) de ratas después de la inducción de la EH con 3-NPA.

10 Basándose en el Ejemplo 10, se puede concluir que el compuesto de ensayo revierte significativamente los síntomas de la EH inducida con 3-NP. Después de 11 días, el 3-NP induce una reducción del 12,48 % del peso corporal, mientras que el compuesto de ensayo detiene la reducción del peso corporal y causa solo una reducción del 2,53 % del peso corporal. Por otra parte, la puntuación neurológica (indicativa de la evolución de la EH) fue significativamente menor (en el 23,52 %) en el grupo de compuesto de ensayo. El daño neuronal por 3-NP se revirtió mediante el compuesto de ensayo, que resulta evidente por el aumento significativo en el número de cuadrados cruzados en el ensayo de campo abierto.

15 La contracción del cerebro es un parámetro clínico importante que se puede observar después de la inducción de la EH con 3-NP en ratas. El 3-NP redujo el peso del cerebro de 1,675 a 1,323, mientras que el compuesto de ensayo revirtió esta pérdida de peso del cerebro.

20 Los Ejemplos 9, 10 y 11, en combinación, muestran el efecto terapéutico del fármaco de ensayo en el tratamiento de enfermedades del SNC, en particular, la enfermedad de Huntington. Específicamente, los estudios *in vitro* sobre la inhibición de la SIRT2 muestran que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la SIRT2. La SIRT2 es una HDAC de Clase III. Tal como se ha descrito anteriormente, los inhibidores de la HDAC tienen una variedad de actividades farmacológicas específicas en los trastornos de repetición de la poliglutamina. Por tanto, el compuesto de ensayo, además de ser útil específicamente en la EH, tiene actividad terapéutica en otros trastornos de repetición de la
25 poliglutamina.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de obtención de pteroestilbano del 50 % al 99 % de pureza a partir de fuentes botánicas, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
- 5 a. pulverizar y extraer la fuente botánica con alcohol acuoso para obtener un extracto;
 b. filtrar el extracto y someterlo a cromatografía, seguido de la elución con alcohol acuoso,
 c. concentrar el disolvente eluido de la Etapa (b) para obtener una pasta, seguido de la redisolución de la pasta en disolvente aromático para obtener una solución; y
 10 d. adsorber en columna la solución para obtener una masa semisólida, seguido del secado para obtener el pteroestilbano.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente botánica se selecciona de un grupo que comprende el género *Pterocarpus*, *Anogeissus* y *Vaccinium* o la familia *Vitaceae*.
- 15 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pulverización se realiza con un tamaño de malla de 0,25 mm (malla 60) a 0,40 mm (malla 40) para obtener material pulverizado; y en donde el material pulverizado se extrae a un intervalo de temperatura de 50 °C a 60 °C durante un período de 8 a 12 h para obtener un extracto.
- 20 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el material pulverizado se extrae a 50 °C durante 10 h.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto se filtra a través de una malla limpia de acero inoxidable o una tela limpia.
- 25 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alcohol acuoso se selecciona de un grupo que comprende alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol butílico o cualquier forma isomérica de los mismos.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía es cromatografía en columna; la columna es una columna de adsorbente polimérico; y en donde la columna usada en la adsorción en columna es una columna de alúmina neutra.
- 30 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1(c), en donde el disolvente eluido se concentra a un intervalo de temperatura de 40 °C a 60 °C al vacío; y en donde el disolvente aromático se selecciona de un grupo que comprende benceno, tolueno y xileno o cualquier homólogo de los mismos.
- 35 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1(c), en donde el disolvente eluido se concentra a una temperatura de 40 °C al vacío.
- 40 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pteroestilbano está en forma de polvo de flujo libre; y en donde la pureza varía del 80 % al 99 %.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, formar complejos de pteroestilbano con un vehículo; y en donde el vehículo es ciclodextrina seleccionada de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina.
- 45 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, formar complejos de pteroestilbano con un vehículo; y en donde el vehículo es β -ciclodextrina.
13. Pteroestilbano purificado que tiene una pureza del 50 % al 99 % obtenido de acuerdo con el proceso de la reivindicación 1, sometido a formación de complejos con ciclodextrina.
- 50 14. El pteroestilbano de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el pteroestilbano sometido a formación de complejos con ciclodextrina está presente junto con excipientes farmacéuticos.
- 55 15. El pteroestilbano de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina.
16. El pteroestilbano de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la ciclodextrina es β -ciclodextrina.
- 60 17. Pteroestilbano del 50 % al 99 % de pureza sometido a formación de complejos con ciclodextrina, para su uso en el tratamiento del trastorno de repetición de la poli glutamina.
- 65 18. El pteroestilbano sometido a formación de complejos con ciclodextrina para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el trastorno de repetición de la poli glutamina es la enfermedad de Huntington o dicho trastorno de la poli glutamina comprende ataxias espinocerebelosas (SCA en inglés) 1, ataxias espinocerebelosas (SCA) 2, ataxias espinocerebelosas (SCA) 3, ataxias espinocerebelosas (SCA) 6, ataxias espinocerebelosas (SCA) 7, ataxias

espinocerebelosas (SCA) 17, atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA en inglés) y atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRPLA en inglés).

5 19. El pteroestilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el pteroestilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina está presente junto con excipientes farmacéuticos.

10 20. El pteroestilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la ciclodextrina se selecciona de un grupo que comprende α -ciclodextrina, β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina.

21. El pteroestilbeno sometido a formación de complejos con ciclodextrina para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la ciclodextrina es β -ciclodextrina.

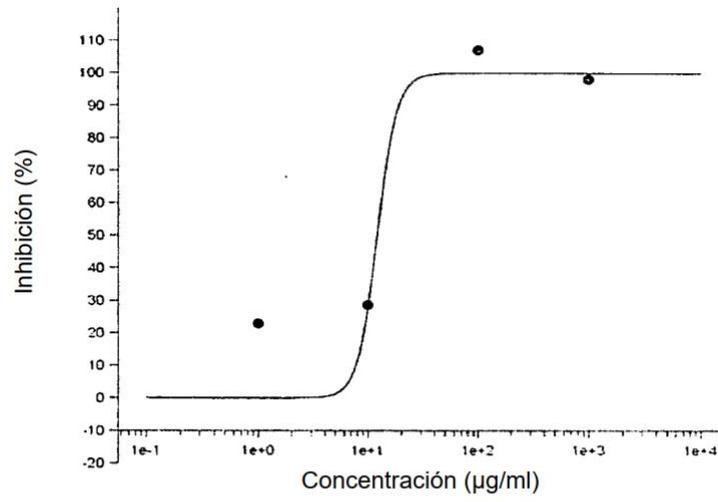


FIGURA 1

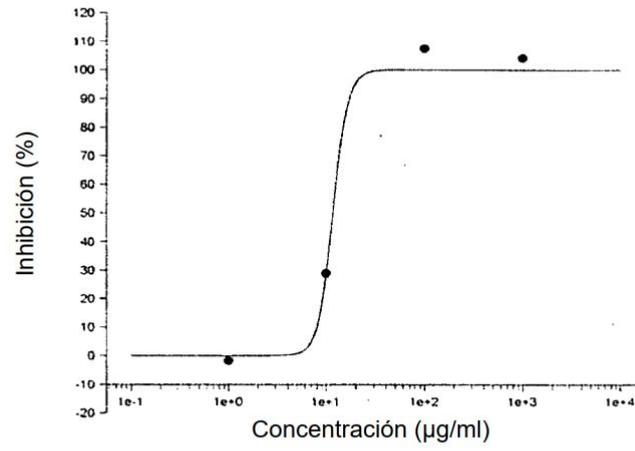


FIGURA 2

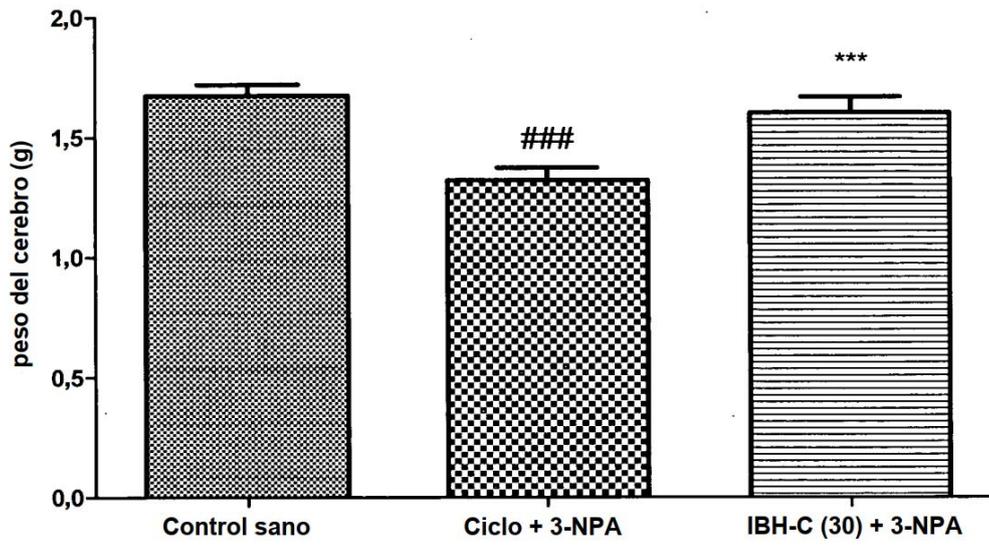


FIGURA 3