



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 772**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98923529 .6**

86 Fecha de presentación : **15.05.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1019044**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2000**

54 Título: **Composición y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.**

30 Prioridad: **15.05.1997 US 46602 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **University of Washington
1107 Northeast 45th Street
Seattle, Washington 98105, US**

72 Inventor/es: **Castillo, Gerardo y
Snow, Alan, D.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al uso de materia vegetal de una planta del género *Uncaria* en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis, y a métodos para aislar agentes farmacológicos a partir de materia vegetal; más particularmente, se refiere al uso de materia vegetal de una planta del género *Uncaria* en la fabricación de un medicamento para intervención terapéutica en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis y a métodos para el aislamiento de y la identificación de componentes amiloides en la materia vegetal.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado proteína beta-amiloide o $A\beta$, en forma fibrilar, que existe como placas de amiloide extracelular y como amiloide dentro de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales. Se cree que la deposición de amiloide $A\beta$ fibrilar en la enfermedad de Alzheimer es perjudicial para el paciente y finalmente conduce a toxicidad y muerte de células neuronales, rasgos distintivos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Las pruebas acumuladas implican al amiloide como un factor causante principal de la patología de la enfermedad de Alzheimer.

Una variedad de otras enfermedades humanas demuestran también la deposición de amiloide y normalmente implican órganos sistémicos (es decir, órganos o tejidos situados fuera del sistema nervioso central), conduciendo la acumulación de amiloide a disfunción o insuficiencia orgánica. En la enfermedad de Alzheimer y enfermedades amiloides "sistémicas", no hay actualmente cura ni tratamiento eficaz, y el paciente normalmente muere en el plazo de 3 a 10 años desde la aparición de la enfermedad.

Se ha efectuado mucho trabajo en la enfermedad de Alzheimer, pero se conoce poco de manera convencional sobre compuestos o agentes para regímenes terapéuticos para detener la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide que se produce en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

Por tanto, se necesitan urgentemente nuevos compuestos o agentes para regímenes terapéuticos para detener o revertir la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide que se produce en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

35 **Descripción de la invención**

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso de materia vegetal de una planta del género *Uncaria* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad amiloide.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para aislar constituyentes inhibidores del amiloide en la materia vegetal de *Uncaria tomentosa*, comprendiendo el método las siguientes etapas: a) extraer la materia vegetal con un disolvente orgánico, b) concentrar el extracto, c) eliminar los materiales insolubles, d) precipitar los constituyentes inhibidores del amiloide con disolvente orgánico, e) recuperar y redissolver los constituyentes inhibidores del amiloide obtenidos en disolvente orgánico y f) inyectar y separar mediante HPLC.

Se exponen realizaciones particulares de la invención en las reivindicaciones dependientes.

Un objeto primario de la presente invención es establecer nuevos medicamentos para el tratamiento de las enfermedades amiloides. Las enfermedades amiloides incluyen, pero no se limitan a, el amiloide asociado con la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (en los que el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o $A\beta$), el amiloide asociado con inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (en las que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada con inflamación), el amiloide asociado con mieloma múltiple y otras discrasias de células B (en los que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado con diabetes tipo II (en la que el amiloide específico se denomina amilina o amiloide de los islotes), el amiloide asociado con las enfermedades priónicas, incluyendo enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gertsman-Straussler, kuru y tembladera animal (en los que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado con hemodiálisis a largo plazo y síndrome del túnel carpiano (en los que el amiloide específico se denomina amiloide beta₂-microglobulina), el amiloide asociado con amiloide cardíaco senil y polineuropatía amiloidótica familiar (en los que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmina y el amiloide asociado con tumores endocrinos tales como carcinoma medular del tiroides (en los que el amiloide específico se denomina variantes de procalcitonina).

Otro objeto de la presente invención es usar la corteza interna y/o raíces de *Uncaria tomentosa* (también denominada uña de gato o cat's claw en inglés) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis. *Uncaria tomentosa* o uña de gato se denomina también, pero sin limitarse a, Paraguay, Garaboto, Garbato casha, Tambor huasca, uña de gavián, garra de halcón, uña de gato o uña de gato Schuler.

Otro objeto de la presente invención es usar materia vegetal de una planta del género *Uncaria*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis.

5 Otro objeto de la presente invención es usar extractos y/o derivados de los mismos de materia vegetal relacionada con las diversas especies de *Uncaria*, que pueden incluir pero sin limitarse a, *Uncaria tomentosa*, *Uncaria attenuata*, *Uncaria elliptica*, *Uncaria guianensis*, *Uncaria pteropoda*, *Uncaria bernaysli*, *Uncaria ferra* DC, *Uncaria kawakamii*, *Uncaria rhynocophylla*, *Uncaria calophylla*, *Uncaria gambir* y *Uncaria orientalis*.

10 Otra realización del primer aspecto de la presente invención es usar píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza y/o polvo de corteza disponibles comercialmente que contienen *Uncaria tomentosa* en la fabricación de un medicamento para el
15 tratamiento de una enfermedad amiloide.

Otra realización del primer aspecto de la presente invención es usar *Uncaria tomentosa* y/o los alcaloides de oxindol, glucósidos de ácido quinóvico, proantocianidinas, polifenoles, triterpinos, los esteroides vegetales, betasitosterol, estigmasterol y campesterol, o fitosteroides contenidos en *Uncaria tomentosa* en la fabricación de un medicamento para
20 el tratamiento de una enfermedad amiloide.

Aún otra realización del primer aspecto de la presente invención es usar uno o más de los compuestos fitoquímicos contenidos en *Uncaria tomentosa*, o sus compuestos constituyentes, en la fabricación de un medicamento para el
25 tratamiento de una enfermedad amiloide.

Se cree que estos constituyentes incluyen, pero no se limitan a, ácido 3-beta,6-beta,19-alfa-trihidroxi-urs-12-en-28-oico, 5 alfa-carboxiestricosidina, aloisopteropodina, alopteropodina, angustina, dihidrocorinanteína, n-óxido de dihidrocorinanteína, hirsutina, n-óxido de hirsutina, isomitrafilina, isopteropodina, isorincofilina, n-óxido de isorincofilina, isorotundifolina, mitrafilina, ácido oleanólico, pteropodina, 3-beta-o-(beta-d-glucopiranosil-(1→3)beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosido del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-quinovopiranosido del ácido quinóvico, rincofilina, rotundifolina, especiofilina, uncarina, uncarina F y ácido ursólico.
30

Aún otra realización del primer aspecto de la presente invención es usar otros compuestos fitoquímicos conocidos identificados previamente por Keplinger como posiblemente útiles para estimular el sistema inmunitario humano. Éstos incluyen los compuestos basados en alcaloide, fenol, quinona y terpeno descritos en la patente estadounidense número 4.844.901 y la patente estadounidense número 4.940.725 concedidas a Keplinger *et al*, e incluyen, pero no se limitan a, alcaloides de oxindol tetra y pentacíclicos, alcaloides tales como aloisopteropodina, isómero A que tiene la fórmula $C_{21}H_{24}O_4N_2$, alo-pteropodina, isómero B que tiene la fórmula $C_{21}H_{24}O_4N_2$, normal-isomitrafilina, isómero A que tiene la fórmula $C_{21}H_{24}O_4N_2$, normal-isoricofilina, isómero A que tiene la fórmula $C_{22}H_{28}O_4N_2$, normal-mitrafilina, isómero B que tiene la fórmula $C_{21}H_{24}O_4N_2$, normal-rincofilina, isómero B que tiene la fórmula $C_{22}H_{28}O_4N_2$, y el alcaloide de oxindol especiofilina, cefarantina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), berbamina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), matrina (alcaloide de lupina), pilocarpina (alcaloide de imidazol), fenoles y quinonas tales como ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, anetol, cleistanina (lignano), curculogósido y curculigósido B (fenolglucósidos), urunsiol (derivados de pirocatequina con cadenas laterales de C_{15}/C_{17} , alfa-tocoferol (vitamina E), ubicona (principalmente, Q7, Q8), measanina (quinona con cadena lateral de C_{15}), terpenos tales como zexbrevina A/B (sesquiterpenoacetona del tipo ceramacrano), 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol, TPA (diterpeno tetra-cíclico), saponina con ácido oleónico de aglicona (triterpeno pentacíclico) y cinoncósido (glucósido de esteroide).
45

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a métodos para aislar los principios activos presentes en *Uncaria tomentosa* para su uso como agentes potentes que inhiben la formación de amiloide, deposición de amiloide, acumulación de amiloide, persistencia de amiloide, interacciones proteína amiloide-proteína amiloide, y/o provocan una disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis. Los métodos para aislar los principios activos en *Uncaria tomentosa* incluyen la aplicación de algunas técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía en capa fina usando placas recubiertas con sílice, y separación y aislamiento usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se identificaron principios activos desconocidos en *Uncaria tomentosa* que se encontró que eran potentes inhibidores de la formación de amiloide, deposición de amiloide, acumulación de amiloide, persistencia de amiloide, interacciones de proteína amiloide-proteína amiloide, y/o provocaban una disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis, volviendo a someter a prueba bandas o fracciones identificadas (separadas mediante cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y/o HPLC) usando pruebas de ensayo específicas tal como se describe en los ejemplos de la presente invención. El aislamiento suficiente de estos principios activos contenidos dentro de bandas y/o fracciones individuales puede enviarse entonces para análisis específicos que pueden incluir, pero no se limitan a, microscopio electrónico de barrido equipado con analizador de rayos x de dispersión de energía para detectar y mapear espacialmente algunos elementos presentes en cada muestra, análisis elemental mediante combustión para determinar el % relativo de carbono, hidrógeno y nitrógeno, espectroscopía de masas de alta resolución para determinar el peso molecular y la composición elemental, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier para determinar los
50
55
60
65

grupos funcionales y hacer comparaciones con los espectros de compuestos conocidos, calorimetría diferencial de barrido para determinar el punto de fusión, absorción atómica, cromatografía en gel, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón y ^{13}C para la caracterización del material y para proporcionar información referente a la posición de los átomos unos con respecto a otros, y espectroscopía de UV/VIS. Se espera que se desarrollen técnicas adicionales como parte del aislamiento adicional de principios activos potentes en *Uncaria tomentosa*.

Uncaria tomentosa y/o sus componentes [independientemente de la fuente comercial e independientemente de la forma final para el consumo por seres humanos, es decir, píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza y/o polvo de corteza] pueden usarse para la inhibición de la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide, independientemente de su práctica clínica.

Las composiciones y métodos pueden implicar la administración a un sujeto de una dosis terapéutica de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) que inhibe la deposición de amiloide. Por consiguiente, las composiciones y métodos son útiles para inhibir la amiloidosis en trastornos en los que se produce deposición de amiloide. Los compuestos pueden usarse terapéuticamente para tratar la amiloidosis o pueden usarse profilácticamente en un sujeto propenso a la amiloidosis. Los métodos se basan, al menos en parte, en inhibir directamente la formación de fibrillas de amiloide, inhibir el crecimiento de fibrillas de amiloide, y/o provocar una disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente.

También pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas para tratar la amiloidosis. Las composiciones farmacéuticas incluyen un compuesto terapéutico en una cantidad eficaz para inhibir la deposición de amiloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Puede usarse cualquiera y todos los compuestos sintéticos preparados que son similares funcionalmente a *Uncaria tomentosa* en la aplicación terapéutica, y/o componentes inhibidores del amiloide de *Uncaria tomentosa*, para su uso como agentes para inhibir la formación de amiloide, deposición de amiloide, acumulación de amiloide, persistencia de amiloide, interacciones de proteína amiloide-proteína amiloide, y/o provocar una disolución/ruptura de fibrillas de amiloide formadas previamente o depositadas previamente en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis.

Estos y otros objetos de este tipo de la invención, tal como resultarán evidentes a partir de la descripción a continuación, se cumplen mediante la invención descrita en el presente documento.

La aplicación de la invención a estas necesidades es especialmente beneficiosa porque la invención es el único sistema que proporciona eficazmente el uso de extractos de partes de la corteza interna y la raíz de *Uncaria tomentosa*, y el uso de los componentes contenidos dentro de diversas preparaciones comerciales de *Uncaria tomentosa*, para beneficiar a pacientes humanos con la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis debido a la capacidad recién descubierta de *Uncaria tomentosa* de inhibir la formación de fibrillas de amiloide, inhibir el crecimiento de fibrillas de amiloide, inhibir las interacciones amiloide-proteoglicano, las interacciones amiloide-glucosaminoglucano, y provocar la disolución y/o ruptura de fibrillas de amiloide formadas previamente.

La presente invención se refiere a la identificación y descubrimiento sorprendente de que las partes de la corteza interna y la raíz de *Uncaria tomentosa*, conocida de otra manera como uña de gato (o Cat's claw), actúan como un inhibidor de la formación y crecimiento del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Además, *Uncaria tomentosa* también tiene la capacidad de inhibir las interacciones proteína amiloide-proteoglicano (PG)/glucosaminoglucano (GAG), que se cree que son importantes, para la formación y persistencia de todos los depósitos de amiloide en los tejidos. Además, *Uncaria tomentosa* tiene la capacidad de disolver/romper las fibrillas de amiloide formadas previamente de los tipos del Alzheimer y la diabetes tipo II, sugiriendo que este agente puede ser útil para pacientes en los últimos estadios tanto de la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II como otras amiloidosis. Se encontró que *Uncaria tomentosa* extraída de diferentes fuentes comerciales (extractos aislados a partir de cápsulas recubiertas con gelatina, comprimidos oblongos o forma líquida) servía como inhibidores potentes de la fibrillogénesis de amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

Aunque los resultados se ponen como ejemplo con la especie *tomentosa*, se cree que otras especies de *Uncaria* tienen un efecto similar.

Glucosamina (sal de clorhidrato, o la sal de sulfato) disponible comercialmente que contenía *Uncaria tomentosa*, provocó una inhibición significativa marcada de la formación de fibrillas de amiloide $A\beta$ tal como se determinó usando un ensayo de fluorometría de tioflavina T. Este efecto inhibidor se atribuyó a la presencia de *Uncaria tomentosa* (y no debido a la presencia de la sal de clorhidrato de glucosamina o a la sal de sulfato de glucosamina), dado que *Uncaria tomentosa* pura (pero no la sal de clorhidrato de glucosamina pura ni la sal de sulfato de glucosamina) derivada de diferentes fuentes comerciales era un inhibidor potente de la formación de fibrillas de amiloide. *Uncaria tomentosa* (sin otros aditivos) obtenida de diferentes fuentes comerciales inhibió la fibrillogénesis de amiloide $A\beta$ de manera dependiente de la dosis. *Uncaria tomentosa* también inhibió las interacciones $A\beta$ - $A\beta$ en la enfermedad de Alzheimer tal

como se determinó usando un ensayo de unión en fase sólida que demostró que *Uncaria tomentosa* es adicionalmente un inhibidor eficaz del crecimiento de fibrillas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Además, *Uncaria tomentosa* fue eficaz en la inhibición dependiente de la dosis de las interacciones A β -proteoglicano/glucosaminoglicano (PG/GAG) (una importante diana terapéutica para todas las amiloidosis), tal como se determinó usando un inmunoensayo de unión en fase sólida. *Uncaria tomentosa* derivada de diferentes fuentes comerciales también era un potente agente de disolución/inhibición de las fibrillas de amiloide que contienen A β (1-40) o A β (1-42) formadas previamente, tal como se determinó usando ensayos de fluorometría de tioflavina T y tinción con rojo Congo. Este último efecto se produjo de manera dependiente de la dosis, provocando una disolución del 70% significativa ($p < 0,001$) en un periodo de incubación de 2 horas. Además, *Uncaria tomentosa* era un potente agente de disolución de fibrillas de amiloide de los islotes (es decir, amilina), provocando una disolución del 72% en un periodo de incubación de 2 horas, y una disolución del 80% en 4 días. La *Uncaria tomentosa* que fue eficaz en todos los estudios descritos anteriormente derivaba en su totalidad de extractos de *Uncaria tomentosa* obtenidos de formas de píldora, comprimido o líquidas, y estaban todas disponibles comercialmente en la actualidad para uso oral en seres humanos. Por tanto, la presente invención reivindica el uso de *Uncaria tomentosa* (en una forma de píldora, comprimido o líquida) y derivados de la misma a partir de diferentes fuentes comerciales para el tratamiento de la amiloidosis en la enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II y otras amiloidosis. También se describen métodos de aislamiento para identificar y purificar los componentes inhibidores del amiloide claves en el material vegetal. Se prevé que la identificación de los principios "activos" inhibidores del amiloide en los materiales vegetales extraídos conduce al diseño de nuevos fármacos para productos terapéuticos anti-amiloide del futuro. Se prevé que el uso actual de *Uncaria tomentosa* y sus componentes contenidos en diferentes preparaciones comerciales beneficia a pacientes humanos en todos los estadios de la enfermedad de Alzheimer debido a la capacidad inherente de *Uncaria tomentosa* de inhibir la formación de fibrillas de amiloide A β (enfermedad de Alzheimer de estadio temprano a medio), inhibir el crecimiento de fibrillas de amiloide (enfermedad de Alzheimer de estadio temprano a medio), inhibir las interacciones de amiloide-PG/GAG (todos los estadios de la enfermedad de Alzheimer) y provocar la disolución/ruptura de fibrillas de amiloide formadas previamente (estadios medios a tardíos de la enfermedad de Alzheimer). De manera similar, se prevé que *Uncaria tomentosa* beneficia a pacientes con diferentes enfermedades amiloides sistémicas tales como diabetes tipo II, independientemente del estadio de la acumulación de amiloide y el órgano (o tejido) implicado.

En el segundo aspecto de la invención, existe un método de aislamiento para purificar e identificar los componentes inhibidores del amiloide de *Uncaria tomentosa* y/o extractos de los mismos. En un método de este tipo, se prepara un extracto a partir de píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza y/o polvo de corteza obtenidos comercialmente, usando el método que emplea alguna o todas de las siguientes etapas:

- a) extracción de *Uncaria tomentosa* independientemente de la forma descrita anteriormente usando un disolvente orgánico tal como propanol, b) concentración del extracto usando un método tal como evaporación rotatoria, liofilización o precipitación, c) centrifugación del extracto para eliminar materiales insolubles, d) nueva centrifugación del sobrenadante para eliminar adicionalmente material insoluble, e) precipitación de los principios activos usando un disolvente orgánico tal como éter de petróleo seguido por centrifugación, f) volver a disolver el sedimento obtenido en un disolvente orgánico tal como propanol, g) aplicar a una columna de sílice equilibrada con propanol/ácido acético al 10% y eluir con el mismo disolvente, h) recoger la fracción de movilidad más rápida (fracciones de color naranja/marrón amarillento) tal como se determina a simple vista o monitorizando a 490 nm, i) precipitación de los componentes activos usando un disolvente orgánico tal como éter de petróleo, seguido por centrifugación, j) volver a disolver el sedimento obtenido en acetónitrilo/agua/ácido acético, y k) inyectar y separar mediante HPLC, l) identificar los componentes inhibidores del amiloide sometiendo a prueba en ensayos *in vivo* e *in vitro* relevantes, y m) enviarlos para análisis estructural y composición elemental, tal como se describe en el presente documento.

Estas y otras características y ventajas de la presente invención resultarán completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas.

Se describe un agente farmacéutico para tratar una enfermedad amiloide en un paciente, en el que el agente farmacológico comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de materia vegetal de una planta del género *Uncaria*. El agente farmacológico es preferiblemente de una planta del género *Uncaria*, especie *tomentosa*. El agente farmacológico es preferiblemente un extracto obtenido a partir de *Uncaria tomentosa*, derivándose el extracto de la corteza interna o el tejido de la raíz de *Uncaria tomentosa*, y tomado ventajosamente de alguna fuente disponible comercialmente, tal como píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza o polvo de corteza.

En realizaciones preferidas, el agente farmacológico es un componente inhibidor del amiloide seleccionado del grupo que consiste en alcaloides de oxindol, glucósidos del ácido quinóico, proantocianidinas, polifenoles, triterpinos, esteroides vegetales, beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol, fitosteroides, ácido 3-beta,6-beta,19-alfa-trihidroxurs-12-en-28-oico, 5-alfa-carboxiestricosidina, aloisopteropodina, alopteropodina, angustina, dihidrocorinanteína, n-óxido de dihidrocorinanteína, hirsutina, n-óxido de hirsutina, isomitrafalina, isopteropodina, isorincofilina, n-óxido

de isorincofilina, isorotundifolina, curculogósido, curculigósido B, fenolglucósidos, 2-[[2,6-dimetoxibenzoil]oxi]-metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, 2-[[2-hidroxi-6-metoxibenzoil]oxi]metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, mitrafilina, ácido oleanólico, pteropodina, 3-beta-o-(beta-d-glucopiranosil-(1→3)beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosido del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-quinovopiranosido del ácido quinóvico, rincofilina, rotundifolina, especiofilina, uncarina, uncarina F, ácido ursólico, cefarantina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), berbamina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), matrina (alcaloide de lupina), pilocarpina (alcaloide de imidazol), ácido 2,3-dihidrobenczoico, ácido ferúlico, anetol, cleistanina (lignano), fenolglucósidos, urunsiol, alfa-tocoferol (vitamina E), ubicona, maesanina, zexbrevina A/B, 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol, TPA (diterpeno tetracíclico), saponina con ácido oleónico de aglicona (triterpeno pentacíclico) y cinoncosido.

El agente farmacológico tiene preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz de *Uncaria tomentosa* en una dosificación en el intervalo de desde aproximadamente 10 hasta 1.000 mg/kg de peso corporal del paciente, y más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 10 hasta 100 mg/kg de peso corporal del paciente.

La enfermedad amiloide para tratamiento con el agente farmacológico se selecciona del grupo que consiste en el amiloide asociado con la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (en los que el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o A β), el amiloide asociado con la inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (en las que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada a inflamación), el amiloide asociado con mieloma múltiple y otras discrasias de células B (en los que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado con diabetes tipo II (en la que el amiloide específico se denomina amilina o amiloide de los islotes), el amiloide asociado con las enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gertsman-Straussler, kuru y tembladera animal (en los que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado con hemodilálisis a largo plazo y síndrome del túnel carpiano (en los que el amiloide específico se denomina amiloide beta₂-microglobulina), el amiloide asociado con amiloide cardíaco senil y polineuropatía amiloidótica familiar (en los que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmina), y el amiloide asociado con tumores endocrinos tales como carcinoma medular del tiroides (en los que el amiloide específico se denomina variantes de procalcitonina).

Los agentes farmacéuticos preferidos tienen un porcentaje en peso de extracto vegetal en el agente en el intervalo de desde aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 95%, y también pueden tener un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El agente farmacéutico tiene preferiblemente una actividad o eficacia inhibidora del amiloide superior al 50%.

El segundo aspecto de la invención es un método para aislar constituyentes inhibidores del amiloide en la materia vegetal de *Uncaria tomentosa*, comprendiendo el método las siguientes etapas: a) extraer la materia vegetal con un disolvente orgánico, b) concentrar el extracto, c) eliminar materiales insolubles, d) precipitar constituyentes inhibidores del amiloide con disolvente orgánico, e) recuperar y redissolver los constituyentes inhibidores del amiloide obtenidos en disolvente orgánico, y f) inyectar y separar mediante HPLC.

La materia vegetal está compuesta preferiblemente por píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza o polvo de corteza obtenidos comercialmente, que contienen *Uncaria tomentosa*, extractos o derivados de la misma, y pueden tomarse de cápsulas recubiertas con gelatina disponibles comercialmente que contiene polvo seco de *Uncaria tomentosa*, extractos o derivados de la misma.

La etapa de extraer la materia vegetal con un disolvente orgánico comprende además preferiblemente añadir propanol inicialmente a los materiales vegetales que están en polvo, y la mezcla resultante se agita toda la noche. El disolvente usado en la etapa de extraer los componentes inhibidores del amiloide tiene preferiblemente una polaridad que oscila desde la del agua hasta la del pentanol. La etapa de eliminar materiales insolubles se efectúa preferiblemente centrifugando el extracto y recogiendo el sobrenadante. La etapa de concentrar el extracto se efectúa preferiblemente mediante evaporación rotatoria. Tras las etapas de extracción y centrifugación, el procedimiento de extracción y centrifugación se repite preferiblemente 1-5 veces más y se recogen los sobrenadantes.

Tras las etapas repetidas de extracción y concentración, se combinan y se concentran preferiblemente los sobrenadantes usando un evaporador rotatorio. Tras la etapa de concentración, y después de que el volumen sea de aproximadamente 500 ml o menos, se vuelve a centrifugar preferiblemente el extracto para eliminar adicionalmente materiales insolubles. Tras la etapa de nueva centrifugación, se obtiene preferiblemente y se precipita preferiblemente el sobrenadante con éter de petróleo, preferiblemente 4 volúmenes. Tras la precipitación con éter de petróleo, se recoge preferiblemente el precipitado en un sedimento tras la centrifugación adicional. El sedimento se disuelve entonces preferiblemente en propanol y se aplica a una columna de sílice equilibrada con propanol que contiene ácido acético. Tras la aplicación del material a una columna de sílice, se usa propanol que contiene ácido acético para eluir, y se recogen las fracciones de color marrón amarillento de movilidad más rápida con un colector de fracciones. Los eluyentes de la columna se monitorizan preferiblemente de manera espectroscópica a 490 nm y se recogen las fracciones en un colector de fracciones. Tras la recogida de las fracciones de color marrón amarillento de movilidad más rápida, se precipitan preferiblemente las fracciones con éter de petróleo, y se recoge el precipitado tras centrifugación. Tras

la nueva precipitación y la nueva centrifugación, se disuelve preferiblemente el sedimento en acetonitrilo/ácido acético/agua para la inyección en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El sedimento disuelto se divide preferiblemente en partes iguales y se inyecta en una HPLC. La HPLC usada contiene preferiblemente una columna C₁₈ de 1 X 25 cm, aunque puede hacerse que sirvan otros tamaños, y se mantiene a 30°C con una velocidad de flujo de 2 ml/min. Las partes de la muestra inyectadas en la HPLC se eluyen con gradientes de A y B, tales como el 0% de B durante 5 minutos, el 0-15% de B desde 5-10 minutos, el 15-45% de B desde 10-70 minutos y el 45-100% de B desde 70-85 minutos; en los que B = un 95% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada y A = un 5% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada. Los eluyentes de la HPLC se monitorizan preferiblemente a 490 nm y se recogen fracciones de 4 ml en un colector de fracciones y se obtienen picos combinados a diversos tiempos de retención (desde 0 hasta 85 minutos). Las fracciones obtenidas pueden concentrarse mediante liofilización después de que se elimine la mayor parte del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria.

Las fracciones concentradas obtenidas se someten entonces a prueba en ensayos *in vitro* relevantes para identificar inhibidores potentes de la formación de fibrillas de amiloide, el crecimiento de fibrillas de amiloide o la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente. Los componentes inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa* se retiran preferiblemente de la HPLC a tiempos de retención de HPLC aproximados de 13-45 minutos, y más preferiblemente de 26 minutos.

También se describe un método que no está dentro del alcance de la invención para tratar una enfermedad amiloide en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de materia vegetal de una planta del género *Uncaria*, especie *tomentosa*. La materia vegetal se administra preferiblemente por vía oral o mediante pulverizador de aerosol o en una forma inyectable o que se puede infundir por vía parenteral.

La cantidad terapéuticamente eficaz de materia vegetal es preferiblemente un componente inhibidor del amiloide seleccionado del grupo que consiste en alcaloides de oxindol, glucósidos del ácido quinóvico, proantocianidinas, polifenoles, triterpinos, esteroides vegetales, beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol, fitosteroides, ácido 3-beta,6-beta,19-alfa-trihidroxi-urs-12-en-28-oico, 5-alfa-carboxiestricosidina, aloisopteropodina, alopteropodina, angustina, dihidrocorinanteína, n-óxido de dihidrocorinanteína, hirsutina, n-óxido de hirsutina, isomitrafalina, isopteropodina, isorincofilina, n-óxido de isorincofilina, isorotundifolina, curculigósido, curculigósido B, fenolglucósidos, 2-[[2,6-dimetoxibenzoil]oxi]-metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, 2'-[[2-hidroxi-6-metoxibenzoil]oxi]metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, mitrafalina, ácido oleanólico, pteropodina, 3-beta-o-(beta-d-glucopiranosil-(1→3))beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosido del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-quinovopiranosido del ácido quinóvico, rincofilina, rotundifolina, especiofilina, uncarina, uncarina F, ácido ursólico, cefarantina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), berbamina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), matrina (alcaloide de lupina), pilocarpina (alcaloide de imidazol), ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, anetol, cleistanina (lignano), fenolglucósidos, urunsiol, alfa-tocoferol (vitamina E), ubicona, maesanina, zexbrevina A/B, 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol, TPA (diterpeno tetracíclico), saponina con ácido oleónico de aglicona (triterpeno pentacíclico) y cinoncosido.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T de 1 semana utilizado para identificar inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide Aβ (1-40) de la enfermedad de Alzheimer. Se muestra que la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* es un potente inhibidor de la formación de fibrillas de amiloide Aβ (1-40).

La figura 2 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T de 1 semana utilizado para identificar inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide Aβ (1-40) de la enfermedad de Alzheimer. Se muestra que la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700), la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700 < 30 kDa) que se ha hecho pasar a través de un filtro con un punto de corte del peso molecular de 30 kDa (PTI-00700 < 30 kDa), la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00701), y la *Uncaria tomentosa* pura (PTI-00703) son todos inhibidores eficaces de la formación de fibrillas de amiloide Aβ de la enfermedad de Alzheimer.

La figura 3 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de unión en fase sólida utilizado para identificar compuestos líder que inhiben las interacciones Aβ-Aβ de la enfermedad de Alzheimer (es decir, el crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer). La glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) se identifica como un inhibidor potente del crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

La figura 4 es un gráfico en blanco y negro de un inmunoensayo de unión en fase sólida utilizado para determinar los posibles efectos dependientes de la dosis de la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) sobre la inhibición de las interacciones Aβ-proteoglicano/glucosaminoglicano (PG/GAG). Se observa una inhibición dependiente de la dosis significativa de las interacciones Aβ-PG/GAG con tratamiento de glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa*.

La figura 5 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T utilizado para determinar los posibles efectos dependientes de la dosis del extracto de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) sobre la disolución/ruptura

de las fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer en un periodo de incubación de 2 horas. El extracto de *Uncaria tomentosa* provoca la disolución de las fibrillas de amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente de una manera dependiente de la dosis.

La figura 6 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T utilizado para mostrar que el extracto de *Uncaria tomentosa* obtenido de otra fuente comercial (denominado PTI-00703-02), y de *Uncaria tomentosa* en forma líquida, también puede provocar una disolución/ruptura significativa de las fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente en un periodo de incubación de 2 horas.

La figura 7 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T utilizado para mostrar que el extracto de *Uncaria tomentosa* obtenido de aún otra fuente comercial (denominado PTI-00703-R) puede provocar disolución/ruptura dependiente de la dosis significativa de las fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente en un periodo de incubación de 2 horas. 1/10.000 del extracto de *Uncaria tomentosa* contenido dentro de una única píldora recubierta con gelatina provocó una disolución del 58% significativa ($p < 0,001$), mientras que 1/1.000 de un extracto de *Uncaria tomentosa* de una única píldora provocó una disolución del 81% significativa ($p > 0,001$), 1/500 de un extracto de *Uncaria tomentosa* de una única píldora provocó una disolución del 93% significativa ($p < 0,001$), y 1/250 de un extracto de *Uncaria tomentosa* de una única píldora provocó una disolución del 97% significativa ($p < 0,001$).

La figura 8 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T utilizado para mostrar que un extracto de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) también puede provocar una disolución significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amiloide A β (1-42) de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente (es decir, la forma más larga y más fibrillogénica de amiloide de la enfermedad de Alzheimer) en todos los puntos del tiempo, con una disolución/inhibición observada del 63% en tan sólo 2 horas de incubación.

La figura 9 es un gráfico en blanco y negro de un ensayo de fluorometría de tioflavina T utilizado para mostrar que un extracto de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) también puede provocar una disolución significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amiloide de los islotes (es decir, amilina) formadas previamente en todos los puntos del tiempo, con una disolución/inhibición del 72% observada en tan sólo 2 horas de incubación.

La figura 10 son gráficos en blanco y negro que demuestran la separación del extracto de *Uncaria tomentosa* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y purificación inicial de los componentes inhibidores del amiloide. El panel A representa una HPLC monitorizada a 490 nm y eluida con un gradiente de acetonitrilo/agua, que demuestra que el extracto de *Uncaria tomentosa* contenía múltiples componentes que eluyeron de la columna, con un pico ancho observado a los 13-45 minutos, y un pico observado a los 80 minutos. El panel B demuestra una fracción a los 26 minutos que se volvió a inyectar y se obtuvo un pico simétrico, indicando que la polidispersidad del cromatograma del panel A no se debe a un artefacto de la columna, sino que se debe a la presencia de componentes individuales en el extracto de *Uncaria tomentosa*. En el panel C, se incubaron 60 μ l de A β 1-40 fibrilizado previamente 25 μ M durante 2 horas en presencia o ausencia de 0,0005 unidades de DO de la fracción 26 y la fracción 80. La fracción 26 (pero no la fracción 80) mostró una potente actividad inhibidora del amiloide provocando una disolución/ruptura del 85% del amiloide de la enfermedad de Alzheimer en un periodo de incubación de 2 horas.

Volviendo ahora a los dibujos, la invención se describirá en una realización preferida en referencia a los números de las figuras del dibujo en las que números similares indican partes similares.

Amiloide y amiloidosis

Amiloide es un término genérico que se refiere a un grupo de diversos depósitos de proteína extracelular pero específicos que tienen todas las propiedades morfológicas, características de tinción y espectros de difracción de rayos x comunes. Independientemente de la naturaleza de la proteína amiloide depositada, todos los amiloides tienen las siguientes características: 1) un aspecto amorfo al nivel del microscopio óptico y aspecto eosinófilo usando tinciones de hematoxilina y eosina; 2) todos se tiñen con rojo Congo y demuestran una birrefringencia roja/verde cuando se observa bajo luz polarizada (Puchtler *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 10:355-364, 1962), 3) todos contienen una estructura secundaria de lámina plegada beta predominante, y 4) de manera ultraestructural, el amiloide consiste normalmente en fibrillas que no se ramifican de longitud indefinida y con un diámetro de 7-10 nm.

El amiloide se clasifica actualmente según la proteína amiloide específica depositada. Las enfermedades amiloides incluyen, pero no se limitan a, el amiloide asociado con la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (en los que el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o A β), el amiloide asociado con la inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (en las que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada a inflamación), el amiloide asociado con el mieloma múltiple y otras discrasias de células B (en los que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado con diabetes tipo II (en la que el amiloide específico se denomina amilina o amiloide de los islotes), el amiloide asociado con las enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gertsman-Straussler, kuru y tembladera animal (en los que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado con hemodilísis a largo plazo y síndrome del túnel carpiano (en los que el amiloide específico se denomina amiloide beta₂-microglobulina), el amiloide asociado con amiloide cardíaco senil y polineuropatía amiloidótica familiar (en los que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmi-

na), y el amiloide asociado con tumores endocrinos tales como carcinoma medular del tiroides (en los que el amiloide específico se denomina variantes de procalcitonina).

Aunque los depósitos de amiloide en estados clínicos comparten propiedades físicas comunes que se refieren a la presencia de una conformación de lámina plegada beta, está claro ahora que existen muchos tipos químicos diferentes y es probable que se describan otros adicionales en el futuro. Se cree actualmente que existen varios mecanismos patogénicos comunes que pueden estar funcionando en las amiloidosis en general. En muchos casos, una proteína precursora circulante puede resultar de la sobreproducción de o bien moléculas intactas o bien aberrantes (por ejemplo, discrasias de células plasmáticas), degradación o excreción reducidas (amiloide A sérico en algunos síndromes amiloides secundarios y beta₂-microglobulina en hemodiálisis a largo plazo), o anomalías genéticas asociadas con proteínas variantes (por ejemplo, polineuropatía amiloidótica familiar). Se produce en muchos tipos de amiloidosis la proteólisis de una molécula precursora proteica más grande, dando como resultado la producción de fragmentos de peso molecular inferior que polimerizan y adoptan una conformación de lámina plegada beta como depósitos en el tejido, normalmente en una ubicación extracelular. En la mayoría de los amiloides, no se conocen cuáles son los mecanismos exactos implicados, y las causas aberrantes que conducen a cambios en el procesamiento proteolítico y/o modificaciones traduccionales.

Los amiloides sistémicos que incluyen el amiloide asociado con la inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (es decir, amiloide AA o amiloidosis asociada a inflamación) (Benson y Cohen, *Arth. Rheum.* 22:36-42, 1979; Kamei *et al*, *Acta Path. Jpn.* 32:123-133, 1982; McAdam *et al*, *Lancet* 2:572-573, 1975; Metaxas, *Kidney Int.* 20:676-685, 1981), y el amiloide asociado con el mieloma múltiple y otras discrasias de células B (es decir, amiloide AL) (Harada *et al*, *J. Histochem. Cytochem.* 19:1-15, 1971), como ejemplos, se sabe que están implicados en la deposición de amiloide en una variedad de órganos y tejidos diferentes que se encuentran normalmente fuera del sistema nervioso central. La deposición de amiloide en estas enfermedades puede producirse, por ejemplo, en el hígado, corazón, bazo, tracto gastrointestinal, riñón, piel y/o pulmones (Johnson *et al*, *N. Engl. J. Med.* 321:513-518, 1989). Para la mayoría de estas amiloidosis, no existe cura evidente ni tratamiento eficaz y las consecuencias de la deposición de amiloide pueden ser perjudiciales para el paciente. Por ejemplo, la deposición de amiloide en el riñón puede conducir a insuficiencia renal, mientras que la deposición de amiloide en el corazón puede conducir a insuficiencia cardíaca. Para estos pacientes, la acumulación de amiloide en órganos sistémicos conduce finalmente a la muerte en general en un plazo de 3-5 años. Otras amiloidosis pueden afectar a órganos o tejidos únicos tal como se observa con los depósitos de amiloide A β encontrados en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down: los depósitos de amiloide PrP encontrados en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler y kuru; los depósitos de amiloide de los islotes (amilina) encontrados en los islotes de Langerhans en el páncreas del 90% de los pacientes con diabetes tipo II (Johnson *et al*, *N. Engl. J. Med.* 321:513-518, 1989; Lab. Invest. 66:522-535, 1992); los depósitos de amiloide beta₂-microglobulina en el nervio medial que conducen al síndrome del túnel carpiano tal como se observa en pacientes que se someten a hemodiálisis a largo plazo (Geyjo *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 129:701-706, 1985; *Kidney Int.* 30:385-390, 1986); el amiloide de prealbúmina/transtiretina observado en los corazones de pacientes con amiloide cardíaco senil; y el amiloide de prealbúmina/transtiretina observado en los nervios periféricos de pacientes que tienen polineuropatía amiloidótica familiar (Skinner y Cohen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99:1326-1332, 1981; Saraiva *et al*, *J. Lab. Clin. Med.* 102:590-603, 1983; *J. Clin. Invest.* 74:104-119, 1984; Tawara *et al*, *J. Lab. Clin. Med.* 98:811-822, 1989).

Enfermedad de Alzheimer y población envejecida

La enfermedad de Alzheimer es una causa principal de demencia en los ancianos, que afecta al 5-10% de la población con más de 65 años de edad (A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders, editado por Jorm, New York University Press, Nueva York, 1987). En la enfermedad de Alzheimer, las partes del cerebro esenciales para procesos cognitivos tales como memoria, atención, lenguaje y razonamiento degeneran, privándoles a las víctimas de mucho de lo que nos hace humanos, incluyendo la independencia. En algunas formas heredadas de la enfermedad de Alzheimer, la aparición es a mediada edad, pero más comúnmente, los síntomas aparecen desde mediados los 60 años hacia delante. La enfermedad de Alzheimer afecta actualmente a 4-5 millones de americanos, recibiendo ligeramente más de la mitad de estas personas cuidados en sus hogares, mientras que los demás están en muchas instituciones de atención sanitaria diferentes. La prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias se dobla cada 5 años más allá de la edad de 65 años, y estudios recientes indican que casi el 50% de todas las personas de 85 años de edad y más ancianas tienen síntomas de la enfermedad de Alzheimer (1997 Progress Report on Alzheimer's Disease, National Institute on Aging/National Institute of Health). El 13% (33 millones de personas) de la población total de los Estados Unidos tiene 65 años de edad o más, y este % ascenderá al 20% en el año 2025 (1997 Progress Report on Alzheimer's Disease, National Institute on Aging/National Institute of Health).

La enfermedad de Alzheimer también conlleva una carga económica pesada a la sociedad. Un estudio reciente estimó que el coste de los cuidados de un paciente con la enfermedad de Alzheimer con insuficiencias cognitivas graves en su hogar o en un asilo, es superior a 47.000 dólares al año (A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders, editado por Jorm, New York University Press, Nueva York, 1987). Para una enfermedad que puede abarcar desde 2 hasta 20 años, el coste global de la enfermedad de Alzheimer para las familias y la sociedad es asombroso. El coste económico anual de la enfermedad de Alzheimer en los Estados Unidos en cuanto a gastos de cuidados sanitarios y salarios perdidos tanto de los pacientes como de sus cuidadores se estima en de 80 a 100 mil millones de dólares (1997 Progress Report on Alzheimer's Disease, National Institute on Aging/National Institute of Health).

El clorhidrato de tacrina (“Cognex”), el primer fármaco aprobado por la FDA para la enfermedad de Alzheimer es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (Cutler y Sramek, N. Engl. J. Med. 328:808-810, 1993). Sin embargo, se ha mostrado que este fármaco tiene un éxito limitado en la mejora cognitiva en pacientes con la enfermedad de Alzheimer e inicialmente tenía efectos secundarios importantes tales como toxicidad hepática. El segundo fármaco aprobado más recientemente por la FDA, donepezilo (también conocido como “Aricept”), que es también un inhibidor de la acetilcolinesterasa, es más eficaz que la tacrina, demostrando una ligera mejora cognitiva en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Barner y Gray, Ann. Pharmacotherapy 32:70-77, 1998; Rogers y Friedhoff, Eur. Neuropsych. 8:67-75, 1998), pero no se cree que sea una cura. Por lo tanto, está claro que existe una necesidad de tratamientos más eficaces para los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Amiloide como una diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la deposición y acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado la proteína beta-amiloide, A β o β /A4 (Glennner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120:885-890, 1984; Masters *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4245-4249, 1985; Husby *et al*, Bull WHO 71:105-108, 1993). A β deriva de proteínas precursoras más grandes denominadas proteínas precursoras del beta-amiloide (o β PP) de las cuales existen varias variantes de corte y empalme alternativo. Las formas más abundantes de las β PP incluyen proteínas que consisten en 695, 751 y 770 aminoácidos (Tanzi *et al*, Nature 331:528-530, 1988; Kitaguchi *et al*, Nature 331:530-532, 1988; Ponte *et al*, Nature 331:525-527, 1988).

El péptido A β pequeño es un componente principal que compone los depósitos de amiloide de las “placas” en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Además, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de numerosas “marañas” neurofibrilares, que consisten en filamentos helicoidales apareados que se acumulan de manera anómala en el citoplasma neuronal (Grundke-Iqbal *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4913-4917, 1986; Kosik *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4044-4048, 1986; Lee *et al*, Science 251:675-678, 1991). Por tanto, los rasgos distintivos patológicos de la enfermedad de Alzheimer son la presencia de “placas” y “marañas”, depositándose amiloide en el núcleo central de las placas. El otro tipo principal de lesión encontrado en el cerebro con enfermedad de Alzheimer es la acumulación de amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos, tanto dentro del parénquima cerebral como en las paredes de los vasos meníngeos que se encuentran fuera del cerebro. Los depósitos de amiloide ubicados en las paredes de los vasos sanguíneos se denominan amiloide cerebrovascular o angiopatía congofílica (Mandybur, J. Neuropath. Exp. Neurol. 45:79-90, 1986; Pardridge *et al*, J. Neurochem. 49:1394-1401, 1987).

Durante muchos años ha existido un debate científico en curso respecto a la importancia del “amiloide” en la enfermedad de Alzheimer y si las “placas” y “marañas” características de esta enfermedad, eran una causa o simplemente las consecuencias de la enfermedad. En los últimos años, los estudios indican ahora que el amiloide es de hecho un factor causante de la enfermedad de Alzheimer y no debe considerarse simplemente un testigo inocente. Se ha mostrado que la proteína A β de la enfermedad de Alzheimer en cultivo celular provoca la degeneración de células nerviosas en cortos periodos de tiempo (Pike *et al*, Br. Res. 563:311-314, 1991; J. Neurochem. 64:253-265, 1995). Los estudios sugieren que es la estructura fibrilar (que consiste en una estructura secundaria de lámina plegada β predominante), característica de todos los amiloides, la que es responsable de los efectos neurotóxicos. Se ha encontrado también que A β es neurotóxico en cultivos de cortes de hipocampo (Harrigan *et al*, Neurobiol. Aging 16:779-789, 1995) e induce la muerte de células nerviosas en ratones transgénicos (Games *et al*, Nature 373:523-527, 1995; Hsiao *et al*, Science 274:99-102, 1996). La inyección de A β de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro de ratas también provoca deterioro de la memoria y disfunción neuronal (Flood *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:3363-3366, 1991; Br. Res. 663:271-276, 1994).

Probablemente, la prueba más convincente de que el amiloide A β está implicado en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer proviene de estudios genéticos. Se ha descubierto que la producción de A β puede resultar de mutaciones en el gen que codifica para su precursor, la proteína precursora del beta-amiloide (Van Broeckhoven *et al*, Science 248:1120-1122, 1990; Murrell *et al*, Science 254:97-99, 1991; Haass *et al*, Nature Med. 1:1291-1296, 1995). La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora del beta-amiloide que provocan una enfermedad de Alzheimer familiar de aparición temprana es el argumento más fuerte de que el amiloide es fundamental en el proceso patogenético que subyace a esta enfermedad. Se han descubierto ahora cuatro mutaciones que provocan la enfermedad notificadas que demuestran la importancia de A β para provocar la enfermedad de Alzheimer familiar (tratado en Hardy, Nature Genet. 1:233-234, 1992). Todos estos estudios sugieren que proporcionar un fármaco para reducir, eliminar o prevenir la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de A β fibrilar en los cerebros de pacientes humanos se cree que sirve como un agente terapéutico eficaz.

Uncaria tomentosa

La planta *Uncaria tomentosa*, también conocida como “uña de gato” (en español) o “Cat’s claw” (en inglés) se refiere a una parra leñosa que crece en la selva tropical del Amazonas peruano. Esta parra de crecimiento lento tarda 20 años en alcanzar la madurez, y puede crecer más de 100 pies de longitud a medida que se une y se enrolla por sí misma alrededor de árboles nativos. Se encuentra abundantemente a pie de monte, a altitudes de dos a ocho mil pies. La parra se denomina “uña de gato” debido a sus espinas similares a uñas curvadas distintivas que la protegen a partir de la base de sus hojas. Tradicionalmente, las tribus indias nativas han hervido la corteza interna y la raíz de la hierba para preparar una decocción de té y consideraban a *Uncaria tomentosa* como una planta medicinal sagrada. Se

cree que las propiedades altamente eficaces contenidas dentro de la corteza interna de esta planta tienen una influencia profunda y positiva sobre el cuerpo, aunque se carece generalmente de datos médicos científicos sobre sus posibles beneficios en seres humanos. Los alcaloides y compuestos fitoquímicos de la corteza interna de *Uncaria tomentosa* son casi idénticos a los encontrados en la raíz, y la cosecha de esta forma conserva a la planta y mantiene el futuro de la selva tropical.

Algunas de las sustancias activas presentes en *Uncaria tomentosa* son alcaloides (véanse las patentes de Keplinger a las que se hizo referencia anteriormente), que se producen en la planta y su extracto acuoso como un complejo unido a taninos. De esta forma, pocos de ellos pueden activarse. Los complejos se separan por el medio ácido del estómago; los alcaloides se transforman en su forma de clorhidrato, y de esta manera, se absorben bien. Un extracto de *Uncaria tomentosa* más oscuro significa que está presente más tanino y los alcaloides beneficiosos están bloqueados con los taninos, que han formado un complejo no biodisponible y que se absorbe escasamente. Un color dorado claro de *Uncaria tomentosa* sugiere que hay menos taninos, y están disponibles más alcaloides en el extracto.

Además de la presencia de alcaloides, se cree que *Uncaria tomentosa* contiene también otros compuestos fitoquímicos beneficiosos incluyendo glucósidos de ácido quinóico, proantocianidinas, polifenoles, triterpinos y los esteroides vegetales beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol (P. Steinberg "Uncaria tomentosa (Cat's Claw) a wondrous herb from the Peruvian rain forest", Townsend Letter for Doctors, mayo, 1994; P. Steinberg, "Cat's claw update-Uncaria tomentosa: that wondrous herb from the Peruvian rain forest", Townstead Letter for Doctors, agosto/septiembre de 1995, "Cat's Claw Miracle Herb from the Rain Forest of Peru", Woodland Publ. Inc., Pleasant Grove, VT, EE.UU.).

Uncaria tomentosa es una de las plantas más importantes de la selva tropical peruana de América del sur. Se han aislado ya varios alcaloides de oxindol a partir de la corteza interna de esta planta. Dos patentes estadounidenses (patente estadounidense número 4.844.901 y patente estadounidense número 4.940.725 concedidas a Keplinger) describen el aislamiento y uso de seis alcaloides de oxindol de *Uncaria tomentosa*, que se cree que son "adecuados para la estimulación no específica del sistema inmunológico". Se cree que estos alcaloides de oxindol proporcionan un refuerzo general al sistema inmunitario así como que tienen un profundo efecto sobre la capacidad de los glóbulos blancos y los macrófagos para fagocitar microorganismos nocivos y materia extraña. El alcaloide más activo inmunológicamente parece ser la aloisopteropodina, isómero A, un alcaloide de oxindol pentacíclico (patente estadounidense 4.940.725).

Aunque algunos profesionales sanitarios han sugerido que *Uncaria tomentosa* puede usarse para tratar una variedad de dolencias, en ningún lugar se ha usado, o se ha sugerido el uso de este compuesto para el tratamiento de la formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide, tal como el que se produce en las amiloidosis, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. La presente invención demuestra claramente la eficacia de *Uncaria tomentosa* y sus extractos y derivados obtenidos de diferentes fuentes comerciales para la 1) inhibición de la formación de fibrillas de amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer (importante para pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadio temprano a medio), 2) inhibición del crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer (importante para pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadio temprano a medio), 3) inhibición de las interacciones amiloide-PG/GAG (importante para pacientes en todos los estadios de la enfermedad de Alzheimer) y 4) provocar la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente. Además, la presente invención demuestra que *Uncaria tomentosa* es eficaz para provocar la disolución de las fibrillas de amiloide de los islotes (es decir, amilina) y por lo tanto sirve como un tratamiento eficaz para el 90% de los pacientes diabéticos tipo II que tienen acumulación de amiloide de los islotes en el páncreas.

Ejemplos

Se exponen los siguientes ejemplos de modo que proporcionen a los expertos en la técnica la divulgación y descripción de la identificación y uso *Uncaria tomentosa* comercialmente disponible para inhibir la formación de fibrillas de amiloide, inhibir el crecimiento de fibrillas de amiloide, inhibir las interacciones amiloide-PG/GAG, y provocar la disolución/ruptura de fibrillas de amiloide formadas previamente. Sin embargo, no debe interpretarse que la invención se limita a estos ejemplos específicos.

Ejemplo 1

Laglucosamina (sal de sulfato) que contiene Uncaria tomentosa es un potente inhibidor de la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer

Se empleó inicialmente un método descrito previamente para medir la formación de fibrillas de amiloide utilizando fluorometría de tioflavina T (H Naiki *et al.*, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; H Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; H Levine III, Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, Lab. Invest. 74:374-383, 1996) para identificar compuestos terapéuticos potenciales que pudiesen inhibir la formación de fibrillas de amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer. Usando este ensayo sensible, se demostró previamente que cualquier descenso o aumento en la fluorescencia se correlacionaba con un descenso o aumento en la cantidad de fibrillas de amiloide (H Naiki *et al.*, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; H Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; H Levine III, Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995; H Naiki y K. Nakakuki, Lab. Invest. 74:374-383, 1996), permitiendo determinar la identificación y grado de los posibles inhibidores y/o potenciadores de la formación de fibrillas de amiloide.

Nuestros estudios de selección sugirieron en primer lugar la detección de un potente agente inhibidor del amiloide de la enfermedad de Alzheimer que estaba presente como un componente añadido en uno de los compuestos que se sometió a prueba inicialmente. En un estudio, se evaluaron los efectos de diversos compuestos sobre la formación de fibrillas de A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer mediante fluorometría de tioflavina T. Se conoce que la tioflavina T se une a proteínas amiloides fibrilares, y un aumento en la fluorescencia se correlaciona con un aumento en la formación de fibrillas de amiloide, mientras que un descenso en la fluorescencia se correlaciona con un descenso en la formación de fibrillas de amiloide. La proteína A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer, cuando se incubaba a 37°C, tiende a formar espontáneamente fibrillas de amiloide que aumentan en cantidad con el tiempo. En este estudio, se realizaron pruebas para detectar compuestos que tenían el potencial de inhibir la formación de fibrillas a partir de proteína amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer durante un periodo de 1 semana. Por tanto, los compuestos identificados tienen la capacidad de inhibir la formación de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Para estos estudios, se incubaron 25 μ M de A β (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WM365) en tubos de microcentrífuga a 37°C durante 1 semana (por triplicado), o bien solos, o bien en presencia de 1,25 mM (es decir, razón 1:50 de A β :compuesto de prueba) (excepto PTI-00700, que se aisló y se usó tal como se describe a continuación) de diversos componentes en Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, pH 7,0 (TBS). Los compuestos sometidos a prueba incluían PTI-07499 (pentasulfato de manosa, sal de potasio), PTI-20049 (2,3,4,6-tetrasulfato de metil-alfa-D-glucopiranosido, sal de potasio), PTI-20814 (2,3,4,6-tetrasulfato de metil-alfa-D-mannopiranosido, sal de potasio), PTI-70936 (heptasulfato de sacarosa, sal de potasio), PTI-70946 (hexasulfato de sacarosa, sal de potasio), PTI-70011 (octasulfato de sacarosa, sal de potasio) PTI-00800 (glucosamina, sal de sulfato, de Enzymatic Therapy, Green Bay, Wisconsin y conocida comercialmente como "sulfato de glucosamina"), PTI-00900 (glucosamina, sal de sulfato, de Jarrows Formulas, Los Angeles, CA y conocida comercialmente como "sulfato de glucosamina 500") y PTI-00700, (glucosamina, sal de sulfato, con *Uncaria tomentosa*). PTI-00700 se derivó de cápsulas libres de conservante que contenían 400 mg de combinación de glucosamina (sal de sulfato) y 50 mg de corteza interna de *Uncaria tomentosa*. Para estos estudios, se extrajo el polvo del interior de una cápsula de PTI-00700 en 5 ml de agua destilada y se sedimentó por gravedad. Se obtuvo entonces la fracción soluble y se usó en estos estudios a una dilución final de 1:227 en solución salina tamponada con Tris (TBS) (comparable a la concentración de los otros compuestos sometidos a prueba en cuanto a la glucosamina).

Para evaluar los efectos de cada compuesto sobre la formación de fibrillas de A β (1-40), se tomaron alícuotas de 50 μ l de cada tubo para el análisis a 1 h, 1 día, 3 días y 1 semana. Para cada determinación descrita anteriormente, tras cada periodo de incubación, se añadieron 50 μ l de compuestos de prueba A β +/- a 1,2 ml de tioflavina T 100 μ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO₄ 50 mM (pH 6,0). Los estudios indicaron que el aumento de las concentraciones de A β dio un aumento proporcional en fluorescencia en presencia de tioflavina T 100 μ M, descartando la presencia de cualquier efecto de filtro interno desproporcionado en estos estudios. Se midió la emisión de fluorescencia a 482 nm en un fluorómetro Turner instrument modelo 450 a una longitud de onda de excitación de 450 nm. Para cada determinación, se calibró el fluorómetro poniéndolo a cero en presencia del reactivo tioflavina T solo, y ajustando la riboflavina 50 ng/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) en el reactivo tioflavina T a 1800 unidades de fluorescencia. Todas las determinaciones de la fluorescencia se basaron en estas referencias y se restó siempre cualquier fluorescencia emitida por cualquiera de los compuestos en presencia de reactivo tioflavina T de todas las lecturas pertinentes.

Para todos los estudios de fibrillogénesis que utilizan fluorometría de tioflavina T, tal como se describe en el presente documento, las comparaciones de proteína amiloide en presencia o ausencia de compuestos de prueba se basaron en pruebas de la t de Student para datos emparejados mostrando los datos la media +/- la desviación estándar. Se notificó una significación en los niveles de confianza del 95% ($p < 0,05$), del 99% ($p < 0,01$) y 99,999% ($p < 0,001$).

Tal como se muestra en la figura 1, se evaluaron los efectos de estos diversos compuestos de prueba sobre la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer durante un periodo de incubación de 1 semana. A β (1-40) recién suspendido solo, tras una incubación de 1 hora a 37°C, mostró una fluorescencia inicial de 75 +/- 9 unidades de fluorescencia. Durante el periodo de incubación de 1 semana, hubo un aumento gradual en la fluorescencia de A β (1-40) solo, aumentando 6,1 veces desde 1 hora hasta 1 semana, con una fluorescencia máxima de 459 +/- 18 unidades de fluorescencia observada en la semana 1 (figura 1), que concuerda con estudios previos (Castillo *et al*, J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997). De todos los compuestos sometidos a prueba, solo la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (es decir, PTI-00700) inhibió de manera significativa la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40). La glucosamina (sal de sulfato) derivada de dos fuentes diferentes (es decir, PTI-00800 y PTI-00900) que no contenía *Uncaria tomentosa* no inhibió de manera significativa la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40) (figura 1). Esto indicó que el agente inhibidor del amiloide activo era lo más probablemente *Uncaria tomentosa*. Se detectó la inhibición significativa de la formación de fibrillas de amiloide A β por glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (es decir, PTI-00700) con tan sólo 1 hora de incubación. Se observó una inhibición significativa ($p < 0,001$) por glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* sobre la formación de fibrillas de amiloide A β en todos los puntos del tiempo incluyendo 1 hora, 1 día, 3 días y 1 semana. Tras 1 semana, la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* era eficaz para inhibir de manera significativa ($p < 0,001$) la formación de fibrillas de amiloide en un 78%. Estos datos iniciales indicaron que la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* era un potente inhibidor de la formación de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 2

Uncaria tomentosa es el principio activo y un potente inhibidor de la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer

Se diseñaron los siguientes estudios para reproducir algunos de los datos adquiridos inicialmente y para determinar si el principio activo que inhibía la formación de fibrillas de amiloide A β era en realidad *Uncaria tomentosa*. En estos estudios, se evaluaron de nuevo los efectos de diversos compuestos sobre la fibrillogénesis de A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer usando fluorometría de tioflavina T. Para estos estudios, se incubaron 25 μ M de A β (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WM365) en tubos de microcentrífuga a 37°C durante una semana (por triplicado), o bien solos, o bien en presencia de 1,25 mM (es decir, una razón 1:50 de A β :compuesto de prueba) de diversos compuestos (excepto PTI-00700, PTI-00701 y PTI-00703 que se aislaron y se usaron tal como se describe a continuación) en Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, pH 7,0 (TBS). Los compuestos sometidos a prueba incluían glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00700), glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* que se filtró a través de un filtro que contenía un punto de corte de 30 kilodalton (PTI-00700 < 30 kDa), glucosamina (sal de clorhidrato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00701), glucosamina pura (PTI-00712; peso molecular = 216; obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.), galactosamina pura (PTI-00713; peso molecular = 216; obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.), sulfato de sodio (PTI-00725; peso molecular = 142; obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.), y *Uncaria tomentosa* (PTI-00703; obtenida de una fuente comercial). Para estos estudios, se extrajo el polvo del interior de una cápsula recubierta con gelatina de sulfato de glucosamina que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) en 5 ml de agua destilada y se usó para las pruebas tal como se describe en el ejemplo 1. Se extrajo el polvo del interior de una cápsula recubierta con gelatina de glucosamina (sal de clorhidrato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00701) en 5 ml de agua destilada y se usó a una dilución final de 1:40 en TBS (que representaba el extracto total derivado de 250 μ g de *Uncaria tomentosa* por ml), mientras que se extrajo el polvo del interior de una cápsula recubierta con gelatina de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) en 5 ml de agua destilada y se usó a una dilución final de 1:250 en TBS (que representaba el extracto total derivado de 350 μ g de *Uncaria tomentosa* por ml).

Para evaluar los efectos de cada compuesto sobre la formación de fibrillas de A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer, se tomaron alícuotas de 50 μ l de cada tubo para analizar a 1 hora, 1 día, 3 días y 1 semana usando fluorometría de tioflavina T tal como se describió anteriormente. Tal como se muestra en la figura 2, se evaluaron los efectos de estos diversos compuestos de prueba sobre la formación de fibrillas de amiloide A β (1-40) durante un periodo de incubación de 1 semana. A β (1-40) recién suspendido solo, tras una incubación de 1 hora a 37°C, mostró una fluorescencia inicial de 113 $\pm$ 7 unidades de fluorescencia. Durante el periodo de incubación de 1 semana, hubo un aumento gradual en la fluorescencia de A β (1-40) solo, aumentando 2,2 veces desde 1 hora hasta 1 semana, con una fluorescencia máxima de 250 $\pm$ 50 unidades de fluorescencia observada en 1 semana. La glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00700), y glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* que se filtró a través de un filtro que contenía un punto de corte de 30 kilodalton (PTI-00700 < 30 kDa), eran ambas potentes inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide A β provocando una inhibición del 68% y del 72% en 1 semana, respectivamente (figura 2). Se observó una inhibición incluso más potente de la formación de fibrillas de amiloide con glucosamina (sal de clorhidrato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00701), que provocó una inhibición del 90% de la formación de fibrillas de amiloide A β en 1 semana. Cada uno de estos potentes compuestos inhibió de manera significativa la formación de fibrillas de amiloide tan sólo 1 hora tras la incubación. El principio activo que se consideró que provocaba este potente efecto inhibidor sobre la formación de fibrillas de amiloide era *Uncaria tomentosa* contenida dentro de estas preparaciones comerciales. Esto se debía al hecho de que la glucosamina (PTI-00712) que no contenía *Uncaria tomentosa* no tenía absolutamente nada de efecto inhibidor sobre la formación de fibrillas de amiloide. Además, la *Uncaria tomentosa* pura (PTI-00703) provocó un efecto inhibidor similar (inhibición del 73% en 1 semana; y una inhibición del 93% en 1 hora) sobre la formación de fibrillas de amiloide a la observada con glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa*. Estos datos indicaron que el principio activo que era un potente inhibidor de la formación de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer era la *Uncaria tomentosa*.

Ejemplo 3

La glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) inhibe el crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer

En la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis, se cree que el crecimiento de fibrillas de amiloide implica autointeracciones de la proteína amiloide (es decir, interacciones A β -A β). Cualquier posible agente terapéutico eficaz para la deposición, acumulación y/o persistencia amiloide también debe poder provocar una inhibición de las autointeracciones de la proteína amiloide. Esto es importante para prevenir cualquier nueva formación de fibrillas de amiloide cuando se trata a pacientes de la enfermedad de Alzheimer en estadios tempranos de la enfermedad. Por tanto, se usaron metodologías de ELISA (es decir, ensayos de unión en fase sólida) para identificar compuestos que podían inhibir las interacciones A β -A β (es decir, el crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer).

En primer lugar, se marcó A β (1-40) con biotina según el siguiente protocolo. Se disolvió 1 mg de A β (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WL934) en 200 μ l de PBS (pH 8,0) y se incubó durante 1 semana a 37°C. Se añadió entonces la solución de A β fibrilar a 0,2 mg de agente de biotilación [(hexanoato (sulfosuccinimidil-6-(biotinamido)) (sulfo-NHS-LC-biotina) y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente (según el protocolo

del fabricante; Pierce). Para eliminar la sulfo-NHS-LC-biotina en exceso no incorporada a A β , se añadieron a la solución 25 μ l de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol, se agitó en vórtex y se centrifugó después a 14.000 Xg durante 20 minutos. Se descartó entonces el sobrenadante y volvió a suspenderse el sedimento en 200 μ l de agua destilada, y volvió a precipitarse con etanol que contenía el 2,5% de acetato de sodio 3 M. Se repitieron entonces las etapas de centrifugación (descritas anteriormente). Entonces volvió a suspenderse el sedimento que contenía A β fibrilado que se biotiniló (en la región de A β que no autointeracciona) en 1 ml de agua desionizada destilada. Se determinó entonces la cantidad de biotina incorporada usando el método HABA (ácido 2-(4'-hidroxiazo-benceno) benzoico) (según el protocolo del fabricante, Pierce).

Se dejó que se unieran durante la noche 2 μ g de A β no marcado en 40 μ l de solución salina tamponada con Tris que contenía Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, NaN₃ 3 mM, pH 7,0 (TBS) a 4°C a pocillos de microtitulación (placas Nunc, Maxisorb). Al día siguiente, se bloquearon todos los pocillos de microtitulación durante 2 horas incubando con 300 μ l de TBS con Tween-20 al 0,05% (TTBS) más albúmina de suero bovino al 2% (BSA) obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.). Entonces, se colocaron (por triplicado) 100 μ l de A β 1-40 biotinilada en TTBS, en presencia o ausencia de 1,25 mM de compuestos de prueba (descritos a continuación), en pocillos que contenían A β no marcada unida al sustrato o el blanco, y se dejó que se unieran durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se aclararon los pocillos 3 veces con TTBS, y entonces se exploraron con sondas durante 2 horas con 100 μ l de estreptavidina-peroxidasa o anticuerpo anti-biotinperoxidasa (dilución 1:500 de una solución de 2 μ g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en TBS que contenía BSA al 0,1%. Se aclararon entonces los pocillos 3 veces con TTBS y se añadieron 100 μ l de una solución de sustrato (OPD-Sigma Fast de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a cada pocillo y se dejó que se desarrollara durante 5 minutos o hasta que se observó un cambio de color significativo. Se paró la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 4 N y se leyó en un lector de microplacas modelo 450 (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) a 490 nm.

Los compuestos sometidos a prueba incluían octasulfato de sacarosa (PTI-70011), hexasulfato de sacarosa (sal de potasio) (PTI-70946), heptasulfato de sacarosa (sal de potasio) (PTI-70936), 2,3,4,6-tetrasulfato de metil-alfa-D-mannopiranosido (sal de potasio) (PTI-20814), 2,3,4,6-tetrasulfato de metil-alfa-D-glucopiranosido (sal de potasio) (PTI-20049), glucosamina (sal de sulfato) (Enzymatic Therapy, Green Bay, Wisconsin) (PTI-00800), glucosamina (sal de sulfato de Jarrows Formulas, Los Angeles, CA, conocida comercialmente como "sulfato de glucosamina 500") (PTI-00900), glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700), heparina (PTI-H98546), condroitin-4-sulfato (PTI-C45770), y dermatán sulfato (PTID58901). Se aisló glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) y se usó a una dilución de 1:227 en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 al 0,05% (TTBS), tal como se describió en el ejemplo 2.

Tal como se muestra en la figura 3, sólo la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) fue eficaz para provocar una reducción del 70% significativa ($p < 0,001$) en las interacciones A β -A β . El principio activo que provocó esta inhibición fue la *Uncaria tomentosa*, dado que la glucosamina pura (sal de sulfato) obtenida de dos fuentes diferentes (es decir, PTI-00800 y PTI-00900) no tuvieron absolutamente nada de efecto inhibidor sobre el crecimiento de fibrillas de amiloide (figura 3). Estos datos demuestran que la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* era un inhibidor eficaz de las interacciones A β -A β , y que el principio activo que era un potente inhibidor del crecimiento de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer era la *Uncaria tomentosa*.

Ejemplo 4

La glucosamina (sal de sulfato) que contiene Uncaria tomentosa inhibe las interacciones A β -proteoglicano/glucosaminoglicano de una manera dependiente de la dosis

Se puso en práctica un estudio para determinar si la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* era un inhibidor eficaz de las interacciones A β -proteoglicano/glucosaminoglicano (PG/GAG). Dado que se ha encontrado que PG/GAG se acumula en depósitos de amiloide y se cree que impiden la capacidad natural del cuerpo para eliminar el "amiloide" no deseado (tratado en Snow y Wight, *Neurobiology Aging* 10:481-497, 1989), un inhibidor de las interacciones A β -PG/GAG es una diana adicional deseable para un agente terapéutico amiloide. En este estudio, se utilizó un inmunoensayo de unión en fase sólida para determinar si la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) era un inhibidor eficaz de las interacciones A β -PG/GAG y si esta inhibición se producía de una manera dependiente de la dosis.

Se dejó que se unieran 12 mg de perlecano (aislado del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm) (Castillo *et al*, *J. Biochemistry* 120:433-444, 1996), heparina (peso molecular = 5 kDa; obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.) o heparán sulfato (peso molecular $\approx$ 70 kDa; obtenido de Seikagaku America, Rockville, Maryland) en 80 μ l de solución salina tamponada con Tris que contenía Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, NaN₃ 3 mM, pH 9,0 (TBS) durante toda la noche a 4°C a pocillos de microtitulación (placas Nunc, Maxisorb). Al día siguiente, se bloquearon todos los pocillos de microtitulación durante 2 horas incubando con 300 μ l de TBS con Tween-20 (TTBS) al 0,05% más albúmina de suero bovino al 1% (BSA) (obtenida de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE.UU.). Entonces, se colocaron (por triplicado) 100 μ l de A β 1-40 (5 μ M) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WM365) en TTBS que contenía albúmina al 0,05% en presencia o ausencia de 5 μ l de glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) en pocillos que contenían PG/GAG unido al sustrato o el blanco, y se dejó que se unieran durante la noche a 4°C. Para el estudio, se derivó un extracto acuoso de glucosamina (sal de

sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (es decir, PTI-00700) tomando el polvo de una cápsula/píldora recubierta con gelatina (que contiene 50 mg de *Uncaria tomentosa*) y se extrajo dos veces con 2,5 ml de agua destilada doble y entonces se reunieron los dos extractos acuosos juntos (denominados la “solución PTI-00700”). Se usó entonces la solución PTI-00700 sin diluir (que representaba un 1/1000 de una píldora única) o se diluyó a razones de 1:3 (es decir, un 1/3.000 de una píldora única), 1:9 (es decir, un 1/9.000 de una píldora única) o 1:27 (un 1/27.000 de una píldora única), con agua destilada. Al día siguiente, se aclararon los pocillos una vez con TTBS, y entonces se exploraron con sondas durante 45 minutos con 100 µl de anticuerpo anti-6E10 (Senetek, Maryland Heights, Missouri) (que reconoce a Aβ 1-17) diluido 1:1000 con TTBS. A esto le siguió un aclarado con TTBS y se exploró con sondas durante 45 minutos con anticuerpo de cabra anti-ratón biotinilado (diluido 1:1000) que contenía estreptavidina-peroxidasa o anticuerpo anti-biotinperoxidasa (dilución 1:500 de una solución de 2 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en TTBS que contenía BSA al 0,1%. Se aclararon entonces los pocillos 3 veces con TTBS y se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (OPD-Sigma Fast de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a cada pocillo y se dejó desarrollar durante 5 minutos o hasta que se observó un cambio de color significativo. Se paró la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 4 N y se leyó en un lector de microplacas modelo 450 (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.) a 490 nm.

Tal como se muestra en la figura 4, la glucosamina (sal de sulfato) que contenía *Uncaria tomentosa* (PTI-00700) no diluida (que representaba un 1/1.000 de una píldora única) fue muy eficaz (el 64%) en la inhibición de las interacciones Aβ-heparina/heparán sulfato. También se observó una inhibición del 49% significativa (p<0,001) con una dilución 1:3 (es decir, un 1/3.000 de una píldora única) de PTI-00700, mientras que una dilución 1:9 (un 1/19.000 de una píldora única) de PTI-00700 todavía provocó una inhibición del 35% (p<0,01) significativa. Se encontró que una dilución 1:27 (es decir, un 1/27.000 de una píldora única) de PTI-00700 no provocaba una inhibición significativa de la unión de Aβ-heparina/heparán sulfato. Estos datos demuestran que la glucosamina (sal de sulfato) que contiene *Uncaria tomentosa* también podía inhibir las interacciones Aβ-PG/GAG de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 5

La Uncaria tomentosa provoca una disolución de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente de una manera dependiente de la dosis y en el plazo de 2 horas

Se puso en práctica un estudio para determinar si un extracto de *Uncaria tomentosa* relativamente puro era capaz de provocar una “disolución” o “ruptura” de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente. Este tipo de actividad sería importante para cualquier posible fármaco anti-amiloide que puede usarse en pacientes que ya tienen deposición de amiloide sustancial en órganos y/o tejidos. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de Alzheimer en un estadio de la enfermedad de medio a tardío tienen abundantes depósitos de amiloide en sus cerebros como parte tanto de las placas neuríticas como de los depósitos de amiloide cerebrovasculares. Un agente terapéutico natural que pueda provocar una disolución del amiloide preexistente sería ventajoso para su uso en estos pacientes que están en estadios tardíos del proceso de la enfermedad.

Para este estudio, se disolvió 1 mg de Aβ (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WM365) en 1,0 ml de agua destilada doble (solución de 1 mg/ml) y se incubó entonces a 37°C durante 1 semana para provocar una abundante formación de fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Entonces se incubaron 6 µl (25 µM) de Aβ fibrilado durante 2 horas a 37°C, en presencia o ausencia de 1,5 µl de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) (descrito a continuación) disueltos en 37,5 µl de agua destilada doble, y 15 µl que contenían Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, pH 7,0. Tras una incubación de 2 horas, se añadieron alícuotas de 50 µl a 1,2 ml de tioflavina T 100 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO₄ 50 mM (pH 6,0) para lecturas de fluorometría tal como se describió en el ejemplo 1 anterior.

Para este estudio, los compuestos sometidos a prueba incluían un extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* que se derivó tomando el polvo de 10 cápsulas recubiertas con gelatina de *Uncaria tomentosa* (que contenían ~350 mg de *Uncaria tomentosa* por cápsula) y extrayendo dos veces con 25 ml de agua destilada doble, y reuniendo entonces los dos extractos acuosos juntos (denominados “solución de *Uncaria tomentosa*”). Entonces se usó la solución de *Uncaria tomentosa* o bien sin diluir (que representa un 1/3.333 de una píldora única), o bien diluida adicionalmente en agua destilada a razones de 1:3 (es decir, un 1/10.000 de una píldora única), 1:9 (es decir, un 1/30.000 de una píldora única) o 1:27 (un 1/90.000 de una píldora única).

Tal como se muestra en la figura 4, la *Uncaria tomentosa* sin diluir (es decir, un 1/3.333 de una píldora única) (PTI-00703) fue extremadamente eficaz, y provocó una disolución del 70% de fibrillas de amiloide Aβ de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente en el plazo de incubación de 2 horas. También se observó una disolución del 63% (p<0,001) significativa de fibrillas de amiloide Aβ de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente con una dilución 1:3 (es decir, un 1/10.000 de una píldora única) de toda la solución de *Uncaria tomentosa*, mientras que una dilución 1:9 (es decir, un 1/30.000 de una píldora única) de una solución de *Uncaria tomentosa* provocó todavía una disolución del 60% (p<0,01) significativa. Por otra parte, una dilución 1:27 (es decir, un 1/90.000 de una píldora única) de una solución de *Uncaria tomentosa* no provocó una disolución significativa de las fibrillas de amiloide Aβ formadas previamente. Estos datos demuestran que *Uncaria tomentosa* provoca la disolución de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente de una manera dependiente de la dosis. Se demostró la confirmación del “efecto de disolución” de *Uncaria tomentosa* sobre las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer mediante ensayos de tinción con rojo Congo, mediante los cuales se observó una reducción marcada de la congofilia (es decir, birrefringencia rojo/verde cuando se observó a la luz polarizada, y que representa una

disolución/ruptura de la estructura fibrilar del amiloide) cuando se trataron las fibrillas de amiloide A β con *Uncaria tomentosa* durante 2 horas (no mostrado).

Ejemplo 6

La Uncaria tomentosa en forma líquida y de otra fuente comercial también provoca la disolución de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente

El siguiente estudio determinó si la *Uncaria tomentosa* derivada de otra fuente comercial (denominada PTI-00703-2) también era eficaz para provocar la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide A β (1-40) de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente. Este estudio también abordó si un extracto derivado de *Uncaria tomentosa* en forma líquida (disponible comercialmente para su consumo oral por seres humanos) provocaba una disolución similar de las fibrillas de amiloide A β formadas previamente tal como se observó usando *Uncaria tomentosa* derivada de formas de cápsula recubierta con gelatina. Para este estudio, se usó el protocolo descrito en el ejemplo 5 tal como se describió anteriormente. En resumen, se disolvió 1 mg de A β (1-40) (Bachem Inc., Torrance, CA, EE.UU.; lote número WM365) en 1,0 ml de agua destilada doble (solución de 1 mg/ml) y entonces se incubó a 37°C durante 1 semana. Se incubaron entonces 6 μ l (25 μ M) de A β fibrilado durante 2 horas a 37°C, en presencia o ausencia de 1,5 μ l de *Uncaria tomentosa* derivada de líquido (PTI-00703-2) disueltos en 37,5 μ l de agua destilada doble, y 15 μ l que Tris HCl 150 mM, NaCl 10 mM, pH 7,0. Tras una incubación de 2 horas, se añadieron alícuotas de 50 μ l a 1,2 ml de tioflavina T 100 μ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en NaPO₄ 50 mM (pH 6,0) para lecturas de fluorometría tal como se describió en el ejemplo 1.

Tal como se muestra en la figura 6, la *Uncaria tomentosa* derivada de líquido fue extremadamente eficaz para provocar una disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide A β formadas previamente. Se observó una disolución del 70% significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amiloide A β formadas previamente usando *Uncaria tomentosa* derivada de líquido en un periodo de incubación de 2 horas. Este estudio demostró que *Uncaria tomentosa* era un disolvente eficaz de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente independientemente de la fuente de *Uncaria tomentosa*, e independientemente de si *Uncaria tomentosa* se usaba en forma líquida o sólida (es decir, cápsula).

Ejemplo 7

Disolución dependiente de la dosis de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente mediante extracto de Uncaria tomentosa obtenido a partir de una tercera fuente comercial

El siguiente estudio determinó si *Uncaria tomentosa* obtenida de aún otra fuente comercial también era eficaz para provocar la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente. Para este estudio, se obtuvo *Uncaria tomentosa* del polvo del interior de cápsulas recubiertas con gelatina de una tercera fuente comercial (denominada PTI-00703-R) y se usó tal como se describe a continuación. Para este estudio, se abrió una única cápsula recubierta con gelatina que contenía *Uncaria tomentosa* pura y se extrajo el contenido de polvo marrón con 1 ml de propanol seguido por centrifugación (14.000 Xg durante 15 minutos). Se midieron 0,1 μ l del extracto de propanol a 490 nm y se encontró que mostraban 0,0004 unidades de DO. Se usó el ensayo de disolución de fibrillas tal como se describió en el ejemplo 5 usando 0,1 μ l (es decir, se diluyó 1 μ l con agua destilada doble a una dilución 1:10 y se usó 1 μ l), 1 μ l, 2 μ l y 4 μ l del extracto PTI-00703-R. Estas cantidades representaban un 1/10.000, 1/1.000, 1/500, y 1/250 del extracto total de una píldora única, respectivamente.

Tal como se muestra en la figura 7, la *Uncaria tomentosa* obtenida de una única cápsula o píldora recubierta con gelatina provocó una disolución/ruptura dependiente de la dosis de las fibrillas de amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer y en un periodo de incubación de 2 horas. Una parte de 1/10.000 obtenida de una cápsula única provocó una disolución del 58% significativa ($p < 0,001$), mientras que una parte de 1/1.000 obtenida de una cápsula única provocó una disolución del 81% significativa ($p < 0,001$). Una parte de 1/500 de una cápsula única provocó una disolución del 93% significativa ($p < 0,001$), mientras que una parte de 1/250 de una píldora única provocó una disolución del 97% significativa ($p < 0,001$). Este estudio demostró que la *Uncaria tomentosa* obtenida de aún otra fuente era un potente agente que provocaba una disolución dependiente de la dosis de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente. Además, los contenidos diluidos de una única cápsula/píldora recubierta con gelatina de *Uncaria tomentosa* (que actualmente se consume por vía oral por seres humanos) eran todavía extremadamente eficaces para provocar una disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 8

El extracto de Uncaria tomentosa provoca una disolución de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer A β (1-42)

Las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer consisten principalmente en A β en una forma que contiene los residuos 1-40 o 1-42. La variante más larga de A β contiene dos residuos hidrófobos que provocan la formación de fibrillas sustancial casi inmediatamente (Castillo *et al.*, J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997). También se cree que A β 1-42 es la forma predominante de A β que existe en las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer, mientras que

se cree que A β 1-40 es la forma predominante de A β que existe en los depósitos de amiloide cerebrovasculares de la enfermedad de Alzheimer (Tamaoka *et al.*, Br. Res. 679:151-156,1995; Biochem. Biophys. Res. Comm. 205:834-842, 1994). Por tanto, se puso en práctica el siguiente estudio para determinar si la *Uncaria tomentosa* también provoca la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide A β (1-42) y si este efecto era duradero.

Para este estudio, se usó el método de fluorometría de tioflavina T tal como se describió en el ejemplo 5. En resumen, se mezclaron 30 μ l de A β (1-42) 250 μ M (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA, EE.UU.; lote número 508780) con 7,5 μ l de una solución madre de *Uncaria tomentosa* (tal como se describe a continuación), 75 μ l de 4X TBS y 187,5 μ l de agua destilada doble (pH 7,0) y se incubaron en tubos de microcentrífuga a 37°C durante 4 días (por triplicado), o bien solos, o bien en presencia de *Uncaria tomentosa*. Se derivó el extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) tomando los contenidos en polvo de 10 cápsulas recubiertas con gelatina de *Uncaria tomentosa* y extrayendo dos veces con 25 ml de agua destilada doble. Se diluyó entonces el extracto a 1:250 en agua destilada doble (1 ml de solución madre representaba el extracto total derivado de 350 μ g de *Uncaria tomentosa*) para generar una solución madre de *Uncaria tomentosa*.

Tal como se muestra en la figura 8, A β (1-42) de la enfermedad de Alzheimer recién suspendido solo, tras una incubación de 2 horas a 37°C, mostró una fluorescencia inicial de 409 $\pm$ 46 unidades de fluorescencia. Durante el periodo de incubación de 4 días, los niveles de fibrillas de amiloide A β (1-42) determinados mediante fluorescencia de tioflavina T se mantuvieron aproximadamente iguales (figura 10). La *Uncaria tomentosa* provocó una disolución/ruptura significativa de la formación de fibrillas de amiloide A β (1-42) en todos los puntos de tiempo durante el experimento de 4 días. Dado que A β (1-42) puede formar espontáneamente abundantes fibrillas de amiloide en solución, la inhibición inicial mediante *Uncaria tomentosa* sobre las fibrillas de A β (1-42) a las 2 horas, reflejaba realmente la capacidad de *Uncaria tomentosa* de disolver fibrillas de amiloide formadas previamente. A las 2 horas de incubación, la *Uncaria tomentosa* provocó una disolución del 63% significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amiloide A β (1-42). Se observó una inhibición similar en todos los puntos de tiempo (figura 8). A los 4 días, se observó todavía una disolución del 69% significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amiloide A β (1-42), indicando que la capacidad de disolución de *Uncaria tomentosa* sobre las fibrillas de amiloide A β (1-42) era duradera.

Se determinó la confirmación del efecto inhibitor del extracto de *Uncaria tomentosa* sobre las fibrillas de amiloide A β (1-42) mediante tinción con rojo Congo de alícuotas tomadas de las soluciones de ensayo anteriores. Se observó una reducción marcada de la congofilia (es decir, birrefringencia rojo/verde a la luz polarizada) cuando las fibrillas de amiloide A β se trataron con *Uncaria tomentosa* durante 2 horas (no mostrado).

Ejemplo 9

La Uncaria tomentosa provoca la disolución de las fibrillas de amiloide de los islotes (amilina)

El 90% de los pacientes con diabetes tipo II muestran la deposición y acumulación de fibrillas de amiloide en los islotes de Langerhans en el páncreas (Cooper *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8628-8632, 1987). Esta proteína amiloide implicada consiste en una proteína de 37 aminoácidos conocida como polipéptido de amiloide de los islotes o amilina. Se cree que el amiloide de los islotes contribuye a la destrucción de las células beta del páncreas, conduciendo así finalmente a que muchos pacientes sean dependientes de insulina (es decir, diabetes tipo I). La amilina tiene la capacidad de formar también fibrillas de amiloide sustanciales inmediatamente cuando se pone en solución. Por tanto, se puso en práctica el siguiente estudio para determinar si la *Uncaria tomentosa* provoca también la disolución/ruptura de otro tipo de amiloidosis, y si este efecto también era duradero.

Para este estudio, se usó el método de fluorometría de tioflavina T tal como se describió en el ejemplo 5. En resumen, se incubaron 30 μ l de amilina humana 250 μ M (Bachem Inc, Torrance, CA, EE.UU.; lote número WL934) en tubos de microcentrífuga a 37°C durante 4 días (por triplicado), o bien solos, o bien en presencia de 1,5 μ l de *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) (tal como se describió en el ejemplo 8).

Tal como se muestra en la figura 9, amilina recién suspendida sola, tras una incubación de 2 horas a 37°C, mostró una fluorescencia inicial de 1115 $\pm$ 171 unidades de fluorescencia. Durante el periodo de incubación de 4 días, se encontró que los niveles de fibrillas de amiloide de los islotes determinados mediante fluorescencia de tioflavina T disminuían alcanzando niveles de 660 $\pm$ 123 unidades de fluorescencia a los 4 días (figura 9), lo que concuerda con estudios previos (Castillo *et al.*, Diabetes 47: 612-620, 1998). Se encontró que *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) provocó una inhibición de la formación de fibrillas de amilina en todos los puntos de tiempo durante el experimento de 4 días. Dado que la amilina puede formar espontáneamente abundantes fibrillas de amiloide en solución, la inhibición inicial mediante *Uncaria tomentosa* sobre las fibrillas de amilina a las 2 horas, reflejaba de nuevo la capacidad de *Uncaria tomentosa* de disolver/romper las fibrillas de amiloide formadas previamente. A las 2 horas de incubación, la *Uncaria tomentosa* (PTI-00703) provocó una disolución del 72% significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amilina, mientras que a los 4 días, se observó todavía una disolución del 80% significativa ($p < 0,001$) de las fibrillas de amilina (figura 9). Este estudio demostró que la *Uncaria tomentosa* puede provocar una disolución significativa de otras formas de amiloide (tales como amiloidosis de los islotes) y que este efecto era de nuevo duradero.

Ejemplo 10

Métodos de aislamiento de los componentes inhibidores del amiloide en Uncaria tomentosa

5 También se describen métodos para el aislamiento e identificación de los principios activos inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa* obtenida de varias fuentes comerciales diferentes. Para el aislamiento de los principios activos inhibidores del amiloide a partir de cápsulas de *Uncaria tomentosa* recubiertas con gelatina, se recogen 400 cápsulas (por serie) que contienen materiales vegetales secos en un recipiente de polipropileno de 1 litro, al que se le añaden 800 ml de propanol (Fisher, Fair Lawn, NJ, EE.UU.) y se agita durante toda la noche a 4°C usando un agitador magnético. Para el aislamiento de los principios activos inhibidores del amiloide de *Uncaria tomentosa* a partir de comprimidos sólidos, se muele el material en 400 comprimidos (por serie) usando un mortero y una mano de mortero, y se extrae con propanol tal como se describió anteriormente. Entonces se centrifuga entonces el extracto a 17.000 Xg (Sorvall) durante 20 minutos y se recoge el sobrenadante. Se repite el procedimiento de extracción y centrifugación 5 veces más y se recogen los sobrenadantes, y se concentran entonces usando un evaporador rotatorio (Rotavapor-R, Brinkman, Westbury, NJ, EE.UU.) a 60°C. Cuando el volumen es suficientemente pequeño (es decir, 500 ml), vuelve a centrifugarse el extracto a 17.000 Xg para eliminar cualquier material insoluble. Entonces se precipita el sobrenadante obtenido con 4 volúmenes de éter de petróleo (Fischer) y se recoge el precipitado tras la centrifugación a 3.000 Xg durante 20 minutos usando una centrífuga Benchtop. Se lava entonces el sedimento obtenido mediante nueva suspensión en 100 ml de agua destilada, y entonces se centrifuga de nuevo a 3.000 Xg durante 20 minutos. 20 Entonces se disuelve el sedimento resultante en 50-100 ml (dependiendo del tamaño del sedimento) de propanol y se aplica a una columna de sílice de 300 ml equilibrada con propanol que contiene ácido acético al 0,5% (v/v). Entonces se usa el mismo disolvente para eluir, y se recogen las fracciones de color marrón amarillento y/o naranja de movilidad más rápida con un colector de fracciones, y se precipitan con 4 volúmenes de éter de petróleo tal como se describió anteriormente. Entonces se disuelve el sedimento en acetonitrilo/ácido acético/agua (50:0,5:49,5; v/v/v) para la inyección para HPLC. 25

Entonces se divide el sedimento disuelto en aproximadamente 30 partes iguales para la inyección en una HPLC (serie Hewlett-Packard 1050 con detector de múltiples longitudes de onda e integrador serie HP 3396, Hewlett-Packard, Wilmington, DE) con una columna C₁₈ de 1 x 25 cm (218TP1010, Vydac, Hesperia, CA), mantenida a 30°C con una velocidad de flujo de 2 ml/min. También pueden usarse otras columnas para la aplicación de HPLC, y las velocidades de flujo y los eluyentes usados para eluir y purificar los materiales inyectados pueden ajustarse en consecuencia. Usando la columna y las velocidades de flujo tal como se describió anteriormente, tras la inyección, se eluye la muestra con gradientes de A y B, tales como el 0% de B durante 5 minutos, el 0-15% de B desde 5-10 min., el 15-45% desde 10-70 min., y el 45-100% de B desde 70-85 min.; en los que B = un 95% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada y A = un 5% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada. Se monitorizan los efluentes a 490 nm y se recogen fracciones de 4 ml en un colector de fracciones y se obtienen picos combinados a diversos tiempos de retención, desde 0 hasta 85 minutos. Entonces se concentran las fracciones mediante liofilización tras eliminar la mayor parte del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria. Se requieren 20-30 inyecciones para obtener suficiente material (50-100 mg a partir de 4 botellas de píldoras) para las pruebas en ensayos relevantes, o para la identificación de la muestra. 40

Otro modo de aislamiento de los principios activos inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa* obtenida de diferentes fuentes comerciales, es similar al descrito anteriormente, excepto que se omite el uso de la etapa de columna de sílice. Éste es un método más rápido que también permite un rendimiento mucho mayor (es decir, 300-400 mg por preparación, en lugar de 50-100 mg por preparación). Para este método, tras la extracción con propanol, precipitación y lavado tal como se describió anteriormente, se disuelven entonces los sedimentos lavados en acetonitrilo/ácido acético/agua (50:0,5:49,5; v/v/v) para la inyección para HPLC. 45

Entonces se divide el sedimento disuelto en aproximadamente 40 partes iguales para la inyección en la HPLC (serie Hewlett-Packard 1050 con detector de múltiples longitudes de onda e integrador serie HP 3396, Hewlett-Packard, Wilmington, DE) con una columna C₁₈ de 1 x 25 cm (218TP1010, Vydac, Hesperia, CA), mantenida a 30°C con una velocidad de flujo de 2 ml/min. Tras la inyección, se eluye la muestra con gradientes de A y B, tales como el 0% de B durante 5 minutos, el 0-15% de B desde 5-10 min., el 15-45% desde 10-70 min., y el 45-100% de B desde 70-85 min.; en los que B = un 95% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada y A = un 5% de acetonitrilo con un 0,5% de ácido acético en agua destilada. Se monitorizan los efluentes a 490 nm y se recogen fracciones de 4 ml en un recolector de fracciones y se obtienen picos combinados a diversos tiempos de retención, desde 0 hasta 85 minutos. Entonces se concentran las fracciones mediante liofilización tras eliminar la mayor parte del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria. Se requieren 40-50 inyecciones para obtener suficiente material (300-400 mg a partir de 4 botellas de píldoras) para las pruebas en ensayos relevantes, o para la identificación de la muestra. 50 55 60

La figura 10 muestra que este método es eficaz para la separación, purificación e identificación de los principios activos inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa*. Tal como se muestra en la figura 10A, la HPLC en fase inversa monitorizada a 490 nm (debido a la actividad que se correlaciona con el color marrón amarillento y/o naranja) y eluida con un gradiente tal como se describió anteriormente demostró que el extracto de *Uncaria tomentosa* contenía múltiples componentes que eluían de la columna con un pico ancho observado a los 13-45 minutos, y un pico observado a los 80 minutos. Volvió a inyectarse la fracción 26, como ejemplo, en la HPLC y se obtuvo un pico simétrico (figura 10B), indicando que la polidispersidad del pico ancho observado en la figura 10A no se debe a un artefacto de la columna, sino que se debe a la presencia de componentes individuales en el extracto de *Uncaria tomentosa*. Entonces 65

se sometieron a prueba los picos a los 26 minutos y a los 80 minutos, para detectar la posible disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide A β de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente (tal como se describió en el ejemplo 5) para determinar si estos picos contenían principios activos inhibidores del amiloide (figura 10C). La fracción a los 26 minutos (pero no a los 80 minutos) mostró una potente actividad inhibidora que provocó una disolución/ruptura del 85% de las fibrillas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer formadas previamente en un periodo de 2 horas. También se obtuvieron y se sometieron a prueba otros picos (desde 13 hasta 45 minutos de tiempo de retención) tal como se describió anteriormente, y también se encontró que contenían componentes inhibidores del amiloide (no mostrado), sugiriendo que estaban presentes componentes inhibidores del amiloide en el pico ancho desde 13 hasta 45 minutos de tiempo de retención. Este estudio indica que este método de aislamiento y pruebas puede usarse para purificar y aislar principios activos inhibidores del amiloide en extractos de *Uncaria tomentosa*.

Para identificar las estructuras químicas y la composición elemental de los principios activos inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa*, pueden ponerse en práctica diversos análisis, conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a: a) uso de un microscopio electrónico de barrido equipado con un analizador de rayos x de energía dispersiva para detectar y mapear espacialmente algunos elementos presentes en cada muestra, b) espectroscopía de masas de alta resolución para determinar el peso molecular y la composición elemental, 3) calorimetría diferencial de barrido para determinar el punto de fusión, 4) espectroscopia FTIR para determinar los grupos funcionales, y se realizan comparaciones con bibliotecas de espectros, 5) espectroscopia de RMN de C¹³ y de protón para la caracterización adicional del material proporcionando información con respecto a la posición de los átomos entre sí, y 6) análisis elemental mediante combustión para determinar el % relativo de carbono, hidrógeno y nitrógeno.

Usos y aspectos adicionales de la invención

Aplicaciones terapéuticas

Una realización de la presente invención es formular antes de la administración a un paciente, una formulación farmacéutica que comprende *Uncaria tomentosa* (y/o sus principios activos) en uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida, un paciente que tiene enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo II o cualquier otra amiloidosis, consumiría por vía oral *Uncaria tomentosa* comercialmente disponible en forma de píldora, comprimido, comprimido oblongo, cápsula de gelatina dura y blanda, pastilla para chupar, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, solución, jarabe, bolsita de té, y/o polvo de corteza.

En otra realización preferida, *Uncaria tomentosa* obtenida comercialmente de cualquier forma, podría modularse adicionalmente usando vehículos, excipientes y diluyentes adecuados que incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, goma tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe acuoso, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de modo que proporcionen una respuesta rápida, sostenida o retrasada del principio activo tras la administración al paciente. Las composiciones se formulan preferiblemente en una forma farmacéutica unitaria, conteniendo cada dosis desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10.000 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), de manera más normal de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 2.000 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos). Sin embargo, se entenderá que la dosificación terapéutica administrada se determinará por el médico a la luz de las circunstancias relevantes incluyendo el estado clínico que va a tratarse, el órgano o tejidos afectados o que se sospecha que están afectados por la acumulación de amiloide, y la vía de administración elegida. Por tanto, no se pretende que los intervalos de dosificación anteriores limiten el alcance de la invención de ninguna manera. El término "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un vehículo farmacéuticamente adecuado.

Los siguientes ejemplos de formulación son sólo ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna manera. Para cada formulación proporcionada como ejemplo, la disminución o aumento de la concentración de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) provocará una disminución o aumento proporcional de los otros componentes tal como se indica. Pueden prepararse cápsulas de gelatina dura usando 500 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 400 mg de almidón, y 20 mg de estearato de magnesio. Los componentes anteriores se mezclan y se cargan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 920 mg.

Se prepara un comprimido usando 500 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 800 mg de celulosa microcristalina, 20 mg de dióxido de silicio pirogénico y 10 mg de ácido esteárico. Se combinan los componentes y se comprimen para formar comprimidos que pesan cada uno 1230 mg.

Se prepara una solución de aerosol usando 0,25 de principio activo, 29,75 de etanol, y 70 de propelente 22 (clorodifluorometano). Se mezcla la *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) con etanol. Se añade la muestra a una parte de propelente 22 enfriado hasta -30°C y se transfiere a un dispositivo de carga. Entonces se alimenta la cantidad requerida a un recipiente de acero inoxidable y se diluye con el resto del propelente. Entonces se ajustan al recipiente las unidades de valor (enumeradas anteriormente). Una forma de aerosol de este tipo de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) puede ser útil para el tratamiento de amiloides que implican al cerebro (tales como la enfermedad

de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedades priónicas, etc) usando un aerosol o pulverizador nasal. Los estudios previos han sugerido que en estas amiloidosis del sistema nervioso central la forma de entrada inicial de un posible agente ambiental que puede desempeñar un papel en la patogénesis puede derivar del entorno exterior a través de las fosas nasales.

Se preparan comprimidos usando 240 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 180 mg de almidón, 140 mg de celulosa microcristalina, 16 mg de polivinilpirrolidona (al 10% en agua), 18 mg de carboximetilalmidón de sodio, 2 mg de estearato de magnesio y 2 mg de talco (total = 600 mg). Se hace pasar la *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), almidón y celulosa a través de un tamiz U.S. de malla número 45 y se mezclan a fondo. Se mezcla la solución de polivinilpirrolidona con los polvos resultantes y entonces se hace pasar a través de un tamiz U.S. de malla número 14. Se secan los gránulos así producidos a 50°C y se hacen pasar a través de un tamiz U.S. de malla número 18. El carboximetilalmidón de sodio, estearato de magnesio y talco, que se han hecho pasar previamente a través de un tamiz U.S. de malla número 60, se añaden entonces a los gránulos que, tras mezclar, se comprimen en una máquina de comprimidos para proporcionar comprimidos que pesan cada uno 600 mg.

Se preparan cápsulas que contienen cada una 160 mg de medicamento usando 160 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 118 mg de almidón, 118 mg de celulosa microcristalina, y 4 mg de estearato de magnesio (total = 400 mg). Se combinan la *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), celulosa, almidón y estearato de magnesio, se hacen pasar a través de un tamiz U.S. de malla número 45, y se cargan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 400 mg.

Se preparan supositorios que contienen cada uno 225 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) usando 225 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 2.000 mg de glicéridos de ácidos grasos saturados (total = 2.225 mg). Se hace pasar la *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) a través de un tamiz U.S. de malla número 60 y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos usando el mínimo calor necesario. Entonces se vierte la mezcla en un molde de supositorio de 2 g de capacidad nominal y se deja enfriar.

Se preparan suspensiones que contienen cada una 50 mg de medicamento por 5 ml de dosis usando 50 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), 50 mg de carboximetilcelulosa de sodio, 1,25 ml de jarabe, 0,10 ml de solución de ácido benzoico, aromatizante, color y agua purificada hasta un total de 5 ml. Se hace pasar el medicamento a través de un tamiz U.S. de malla número 45 y se mezcla con la carboximetilcelulosa de sodio y el jarabe para formar una pasta lisa. Se diluyen la solución de ácido benzoico, el aromatizante y el color con algo del agua y se añaden con agitación. Se añade entonces agua suficiente para producir el volumen requerido.

Se prepara una formulación intravenosa usando 250 mg de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) y 1000 mg de solución salina isotónica. Se administra la solución de los componentes anteriores por vía intravenosa a una velocidad de 1 ml por minuto a un sujeto que necesita tratamiento.

En una realización preferida, puede administrarse el compuesto terapéutico de la invención en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, cualquiera y todos los disolventes, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y que retrasan la adsorción, y similares que son compatibles con la actividad del compuesto y que son fisiológicamente aceptables para el sujeto. Un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina normal tamponada (NaCl 0:15 molar). El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol; agua, etanol y similares. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

La formación, deposición, acumulación y/o persistencia de amiloide en un sujeto puede inhibirse administrando *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) en una dosificación terapéutica al sujeto. Se pretende que el término incluya organismos vivos en los que puede producirse amiloidosis. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, vacas, perros, ovejas, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. La administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto que va a tratarse puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos, a dosificaciones y durante periodos de tiempo eficaces para inhibir la amiloidosis en el sujeto. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para lograr un efecto terapéutico puede variar según factores tales como la cantidad de amiloide ya depositado en el sitio del órgano o tejido en el sujeto, la edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del compuesto terapéutico para inhibir la formación, deposición, acumulación, persistencia de amiloide, y/o provocar la disolución del amiloide formado previamente en el sujeto. Por tanto, los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o puede reducirse proporcionalmente la dosis tal como se indica según las necesidades de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitativo de un intervalo de dosis eficaz para *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) está entre 10 y 1000 mg/kg de peso corporal/por día, pero preferiblemente de 10 a 100 mg/kg de peso corporal.

Pueden usarse diferentes modos de administración de *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos). Por consiguiente, una vía de administración preferida es la administración oral. Alternativamente, puede administrarse *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) mediante otras vías adecuadas tales como la subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, todas las vías administradas mediante inyección. Dependiendo de la vía de administración, el principio activo puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Para administrar *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos), puede ser necesario recubrir el compuesto, o administrar conjuntamente el compuesto con un material para evitar su activación. Por ejemplo, el compuesto terapéutico puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones de tampón acuosa y salina. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales.

La *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista un fácil uso en la jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timorol, y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o polialcoholes tales como manitol y sorbitol, en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto terapéutico en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto terapéutico en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización que proporciona un polvo del agente terapéutico más cualquier componente deseado de una solución del mismo previamente filtrada hasta la esterilidad.

La *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) para la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis del sistema nervioso central puede optimizarse para que cruce la barrera hematoencefálica. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, la administración sistémica, administración parenteral, es decir, mediante las vías intraperitoneal, intravenosa, perioral, subcutánea, intramuscular, intraarterial, intradérmica, intramuscular, intranasal, epidural y oral.

Puede administrarse directamente *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) al líquido cefalorraquídeo mediante inyección intraventricular. Puede ser deseable administrar *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) localmente en la zona o tejido que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, mediante inyección, mediante infusión usando una cánula con una bomba osmótica, mediante un catéter, mediante un supositorio, mediante un implante.

Puede administrarse *Uncaria tomentosa* (o sus principios activos) en un sistema de liberación controlada, tal como una bomba osmótica. Puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.

Con respecto a los sistemas y componentes a los que se hizo referencia anteriormente, pero no se especificaron o describieron de otra manera en detalle en el presente documento, se cree que el funcionamiento y especificaciones de tales sistemas y componentes y la manera en la que pueden fabricarse o montarse o usarse, tanto de manera cooperativa entre sí como con los otros elementos de la invención descritos en el presente documento para realizar los fines descritos en el presente documento, están todos muy dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. No se ha hecho por tanto ningún intento coordinado de repetir en el presente documento lo que conoce generalmente el experto.

El uso de los extractos de las partes de la corteza interna y la raíz de *Uncaria tomentosa*, y el uso de los componentes contenidos en diversas preparaciones comerciales de *Uncaria tomentosa*, benefician a pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis debido a la capacidad recién descubierta de *Uncaria tomentosa* de inhibir la formación de fibrillas de amiloide, inhibir el crecimiento de fibrillas de amiloide, inhibir las interacciones amiloide-proteoglucano, inhibir las interacciones amiloide-glucosaminoglucano, y provocar la disolución y/o ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de materia vegetal de una planta del género *Uncaria* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad amiloide.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que la materia vegetal es de una planta del género *Uncaria*, especie *tomentosa*.

3. Uso según la reivindicación 2, en el que la materia vegetal tiene una actividad o eficacia inhibidora del amiloide superior al 50%.

4. Uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la materia vegetal se obtiene a partir de una fuente disponible comercialmente.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que la fuente disponible comercialmente de *Uncaria tomentosa* se selecciona de grupo que consiste en píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza y polvo de corteza.

6. Uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la materia vegetal comprende un extracto obtenido a partir de *Uncaria tomentosa*, derivándose el extracto de la corteza interna o tejido de la raíz de *Uncaria tomentosa*.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que el porcentaje en peso de extracto vegetal en el medicamento está en el intervalo de desde el 70% hasta el 95%.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 o 7, en el que la materia vegetal comprende un componente inhibidor del amiloide seleccionado del grupo que consiste en alcaloides de oxindol, glucósidos del ácido quinóvico, proantocianidinas, polifenoles, triterpinos, esteroides vegetales, beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol, fitosteroides, ácido 3-beta,6-beta,19-alfa-trihidroxi-urs-12-en-28-oico, 5-alfa-carboxiestricosidina, aloisopteropodina, alopteropodina, angustina, dihidrocorinanteína, n-óxido de dihidrocorinanteína, hirsutina, n-óxido de hirsutina, isomitrafilina, isopteropodina, isorincofilina, n-óxido de isorincofilina, isorotundifolina, curculogósido, curculigósido B, fenolglucósidos, 2-[[[2,6-dimetoxibenzoil]oxi]-metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, 2-[[[2-hidroxi-6-metoxibenzoil]oxi]metil-4-hidroxifenil-beta-D-glucopiranosido, mitrafilina, ácido oleanólico, pteropodina, 3-beta-o-(beta-d-glucopiranosil-(1→3)beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosido del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosil-(27→1)-beta-d-glucopiranosil éster del ácido quinóvico, 3-beta-o-beta-d-fucopiranosido del ácido quinóvico, rincofilina, rotundifolina, especiofilina, uncarina, uncarina F, ácido ursólico, cefarantina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), berbamina (alcaloide de bisbencilisoquinolina), matrina (alcaloide de lupina), pilocarpina (alcaloide de imidazol), ácido 2,3-dihidrobenczoico, ácido ferúlico, anetol, cleistanina (lignano), fenolglucósidos, urunsiol, alfa-tocoferol (vitamina E), ubicona, maesanina, zexbrevina A/B, 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol, TPA (diterpeno tetracíclico), saponina con ácido oleónico de aglicona (triterpeno pentacíclico) y cinoncosido.

9. Uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 8, en el que el medicamento es para la administración por vía oral, mediante pulverizador de aerosol, o en una forma inyectable o que se puede infundir por vía parenteral.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el medicamento comprende una dosificación en el intervalo de desde 10 hasta 1.000 mg/kg de peso corporal de un paciente.

11. Uso según la reivindicación 10, en el que el medicamento comprende una dosificación en el intervalo de desde 10 hasta 100 mg/kg de peso corporal del paciente.

12. Uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha enfermedad amiloide para tratamiento se selecciona del grupo que consiste en el amiloide asociado con la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (en los que el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o Aβ), el amiloide asociado con la inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y fiebre mediterránea familiar (en las que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada a inflamación), el amiloide asociado con el mieloma múltiple y otras discrasias de células B (en los que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado con diabetes tipo II (en la que el amiloide específico se denomina amilina o amiloide del islote), el amiloide asociado con las enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gertsman-Straussler, kuru y tembladera animal (en los que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado con hemodiálisis a largo plazo y síndrome del túnel carpiano (en los que el amiloide específico se denomina amiloide beta₂-microglobulina), el amiloide asociado con amiloide cardíaco senil y polineuropatía amiloidótica familiar (en los que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmina), y el amiloide asociado con tumores endocrinos tales como carcinoma medular del tiroides (en los que el amiloide específico se denomina variante de procalcitonina).

13. Método para aislar constituyentes inhibidores del amiloide en la materia vegetal de *Uncaria tomentosa*, comprendiendo el método las siguientes etapas: a) extraer la materia vegetal con un disolvente orgánico, b) concentrar el extracto, c) eliminar los materiales insolubles, d) precipitar los constituyentes inhibidores del amiloide con disolvente orgánico, e) recuperar y redissolver los constituyentes inhibidores del amiloide obtenidos en el disolvente orgánico, y f) inyectar y separar mediante HPLC.
14. Método según la reivindicación 13, en el que la materia vegetal está comprendida de píldoras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura y blanda, pastillas para chupar, sobres, sellos para medicamentos, cápsulas Vegicap, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsitas de té, aerosoles (como un sólido o en medio líquido), supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, haces de corteza y/o polvo de corteza obtenidos comercialmente, que contienen *Uncaria tomentosa*, extractos o derivados de la misma.
15. Método según la reivindicación 13, en el que la materia vegetal se toma de cápsulas recubiertas con gelatina disponibles comercialmente que contiene polvo seco de *Uncaria tomentosa*, extractos o derivados de la misma.
16. Método según la reivindicación 13, 14 o 15, en el que la etapa de extraer la materia vegetal con un disolvente orgánico comprende además añadir propanol inicialmente a los materiales vegetales que están en polvo, y la mezcla resultante se agita toda la noche.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el disolvente usado en la etapa de extraer los componentes inhibidores del amiloide tiene una polaridad que oscila desde la del agua hasta la del pentanol.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la etapa de eliminar los materiales insolubles se efectúa centrifugando el extracto y recogiendo el sobrenadante.
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la etapa de concentrar el extracto se efectúa mediante evaporación rotatoria.
20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en el que, tras las etapas de extracción y centrifugación, se repite el procedimiento de extracción y centrifugación 5 veces más y se recogen los sobrenadantes.
21. Método según la reivindicación 20, en el que, tras las etapas repetidas de extracción y concentración, se combinan y concentran los sobrenadantes usando un evaporador rotatorio.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en el que, tras la etapa de concentración, y después de que el volumen sea de 500 ml o menos, se vuelve a centrifugar el extracto para eliminar adicionalmente materiales insolubles.
23. Método según la reivindicación 22, en el que, tras la etapa nueva centrifugación, se obtiene el sobrenadante y se precipita con 4 volúmenes de éter de petróleo.
24. Método según la reivindicación 23, en el que, tras la precipitación con éter de petróleo, se recoge el precipitado en un sedimento tras la centrifugación adicional.
25. Método según la reivindicación 24, en el que el sedimento se disuelve en propanol y se aplica a una columna de sílice equilibrada con propanol que contiene ácido acético.
26. Método según la reivindicación 25, en el que tras la aplicación del material a la columna de sílice, se usa propanol que contiene ácido acético para eluir, y se recogen las fracciones de color marrón amarillento de movilidad más rápida con un colector de fracciones.
27. Método según la reivindicación 26, en el que los eluyentes de la columna se monitorizan espectroscópicamente a 490 nm y se recogen fracciones en un colector de fracciones.
28. Método según la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en el que, tras la recogida de las fracciones de color marrón amarillento de movilidad más rápida, se precipitan las fracciones con éter de petróleo, y se recoge el precipitado tras centrifugación.
29. Método según la reivindicación 28, en el que, tras la nueva precipitación y la nueva centrifugación, se disuelve el sedimento en acetonitrilo/ácido acético/agua para la inyección en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
30. Método según la reivindicación 29, en el que el sedimento disuelto se divide en partes iguales y se inyecta en una HPLC.
31. Método según la reivindicación 30, en el que la HPLC usada contiene una columna C₁₈ de 1 x 25 cm, y se mantiene a 30°C con una velocidad de flujo de 2 ml/min.

ES 2 285 772 T3

32. Método según la reivindicación 30, en el que las partes de la muestra inyectadas en la HPLC se eluyen con gradientes de A y B, tales como el 0% de B durante 5 minutos, el 0-15% de B desde 5-10 minutos, el 15-45% de B desde 10-70 minutos y el 45-100% de B desde 70-85 minutos; en el que B = 95% de acetonitrilo con el 0,5% de ácido acético en agua destilada y A = 5% de acetonitrilo con el 0,5% de ácido acético en agua destilada.

33. Método según la reivindicación 32, en el que los eluyentes de la HPLC se monitorizan a 490 nm y se recogen fracciones de 4 ml en un colector de fracciones y se obtiene picos combinados a diversos tiempos de retención (desde 0 hasta 85 minutos).

34. Método según la reivindicación 33, en el que las fracciones obtenidas se concentran mediante liofilización después de que se haya eliminado la mayor parte del acetonitrilo mediante evaporación rotatoria.

35. Método según la reivindicación 34, en el que las fracciones concentradas obtenidas se someten a prueba en ensayos *in vitro* relevantes para identificar inhibidores de la formación de fracciones de fibrillas de amiloide, el crecimiento de fibrillas de amiloide o agentes que provoquen la disolución/ruptura de las fibrillas de amiloide formadas previamente.

36. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 35, en el que los componentes inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa* se identifican por estar contenidos dentro de tiempos de retención de HPLC aproximados de 13-45 minutos.

37. Método según la reivindicación 36, en el que los componentes inhibidores del amiloide en *Uncaria tomentosa* se identifican por estar contenidos con un tiempo de retención de HPLC aproximado de 26 minutos.

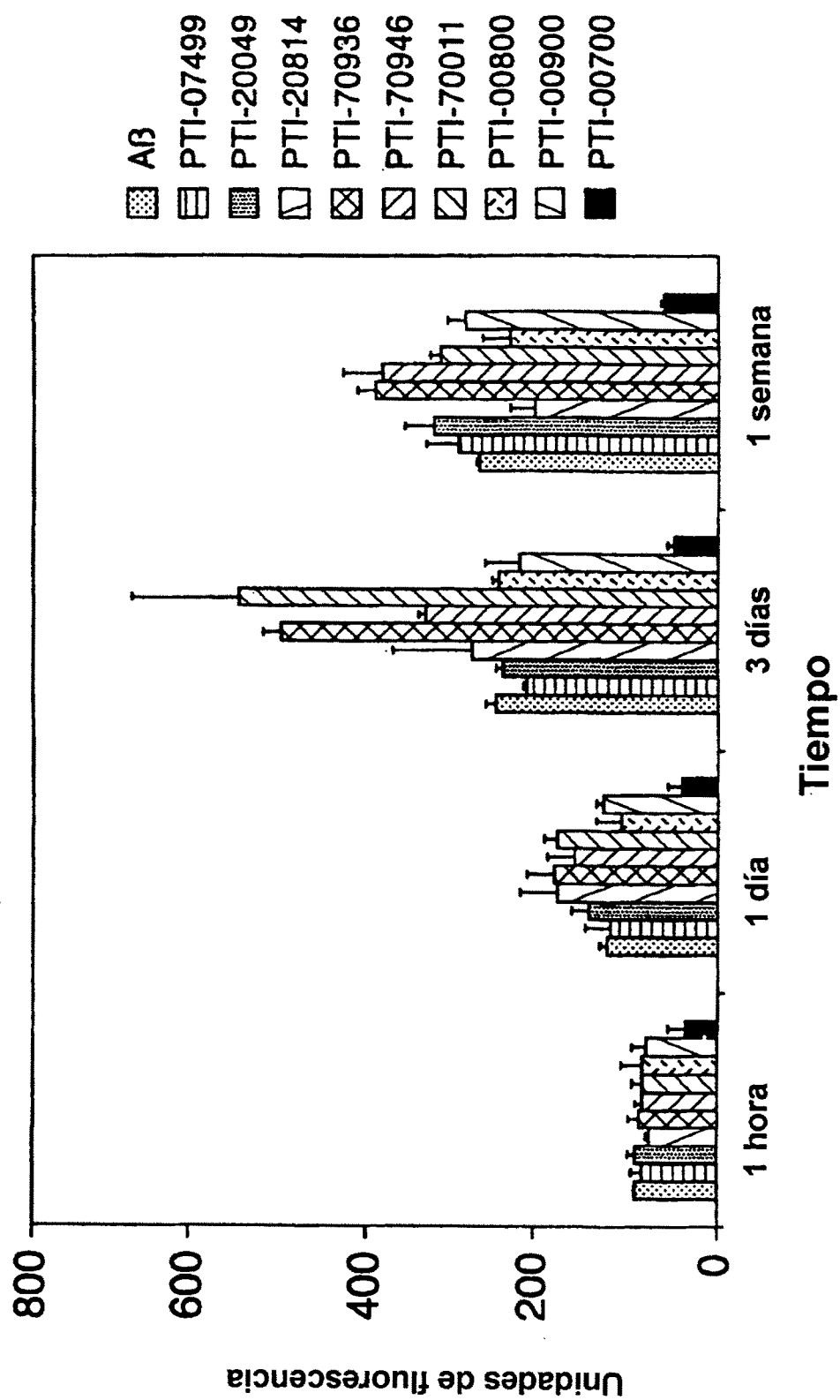


Figura 1

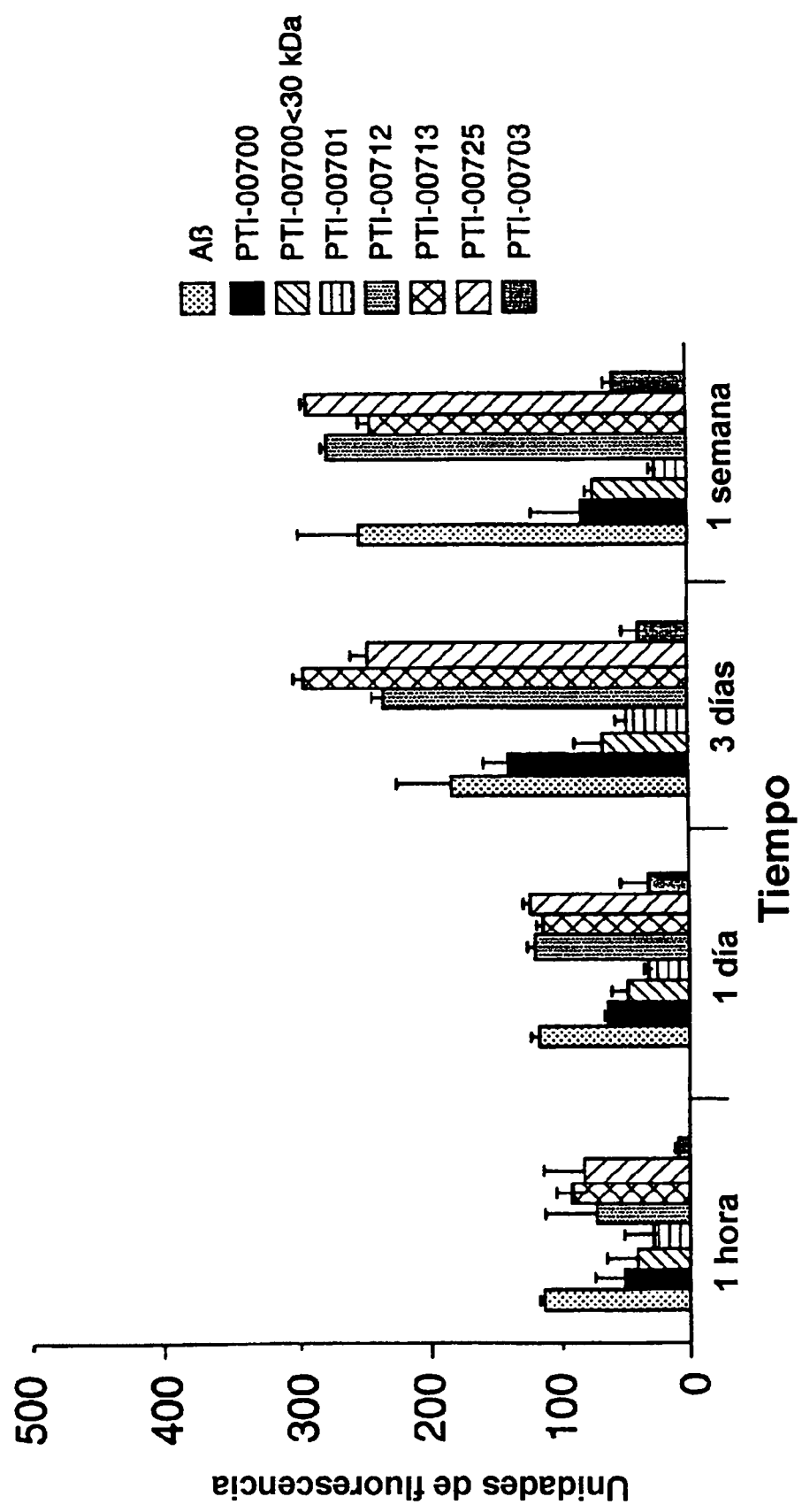
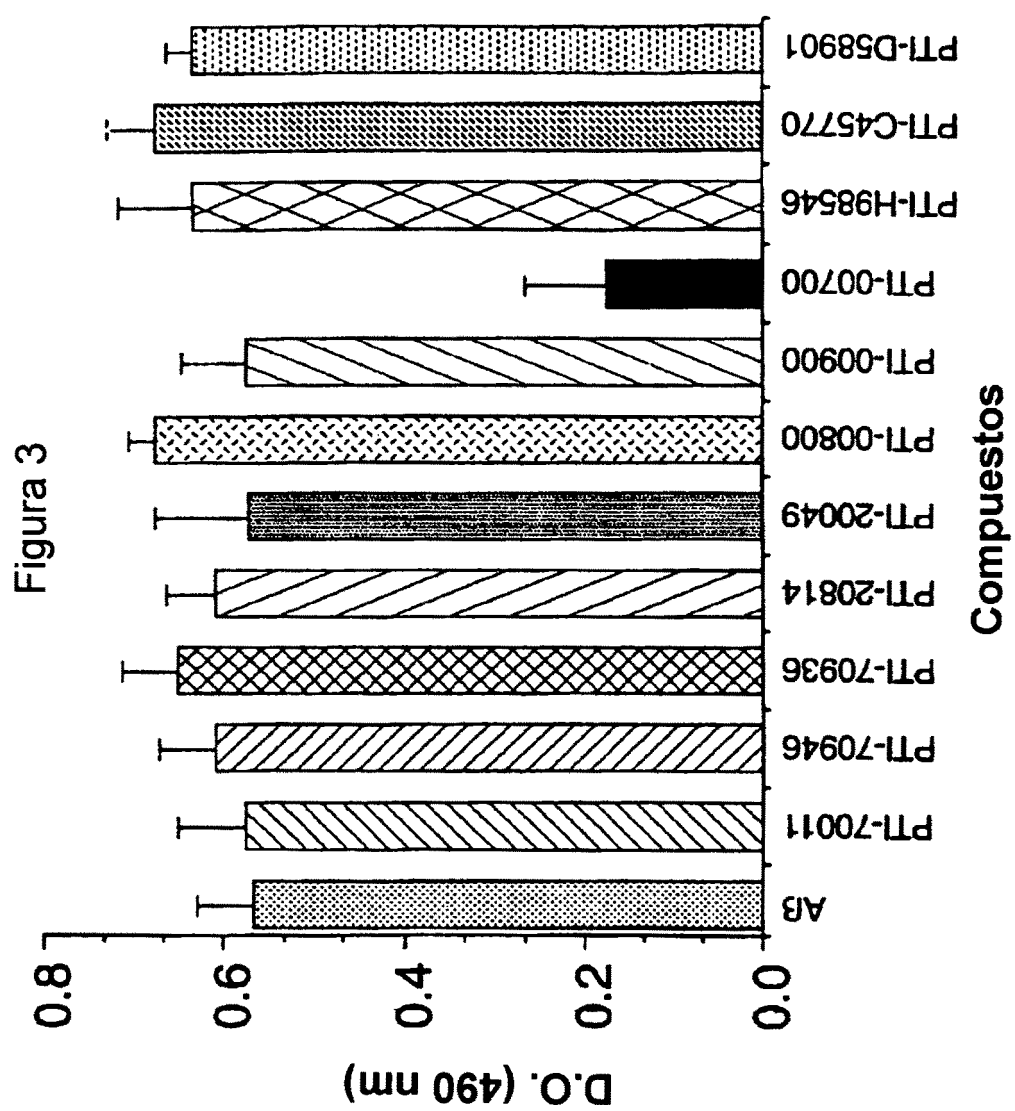


Figura 2



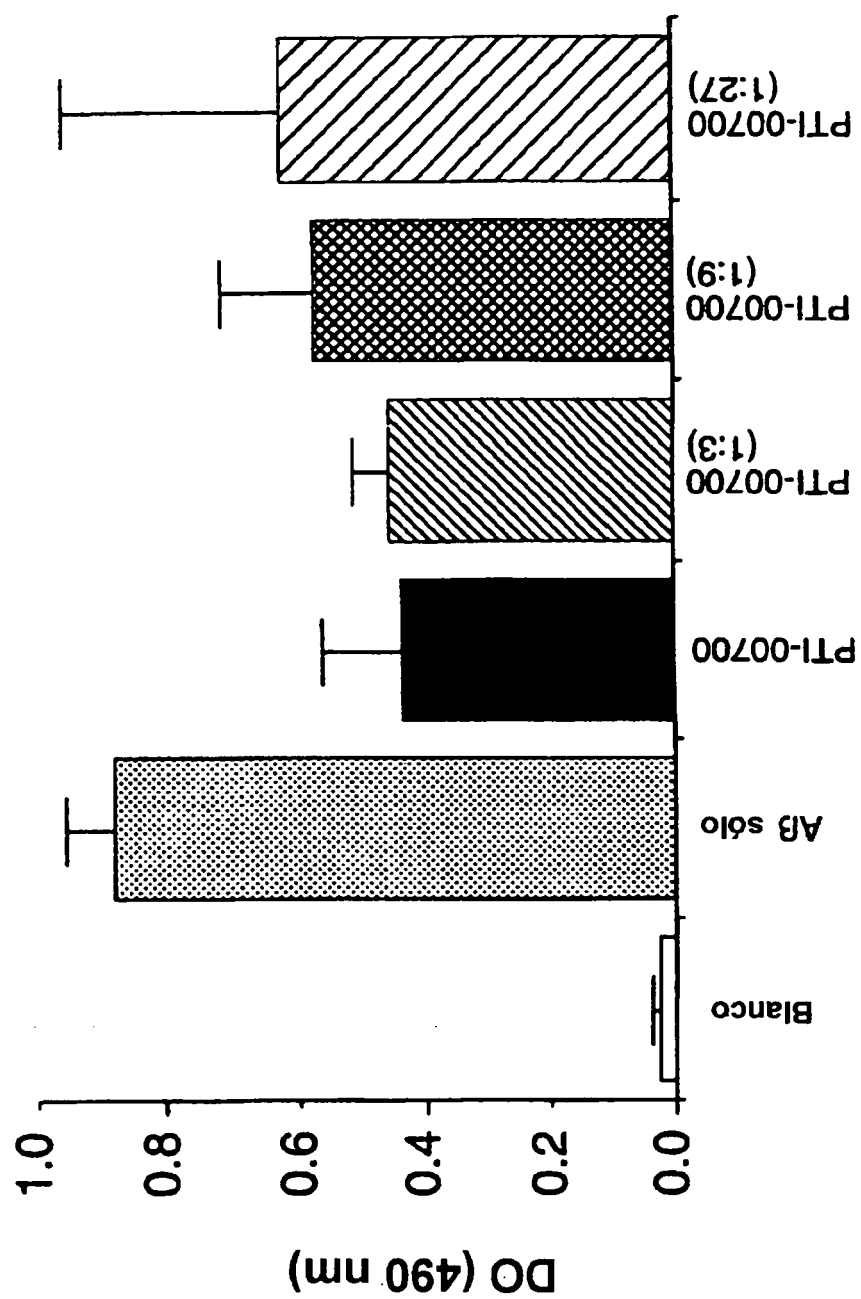


Figura 4

Figura 5

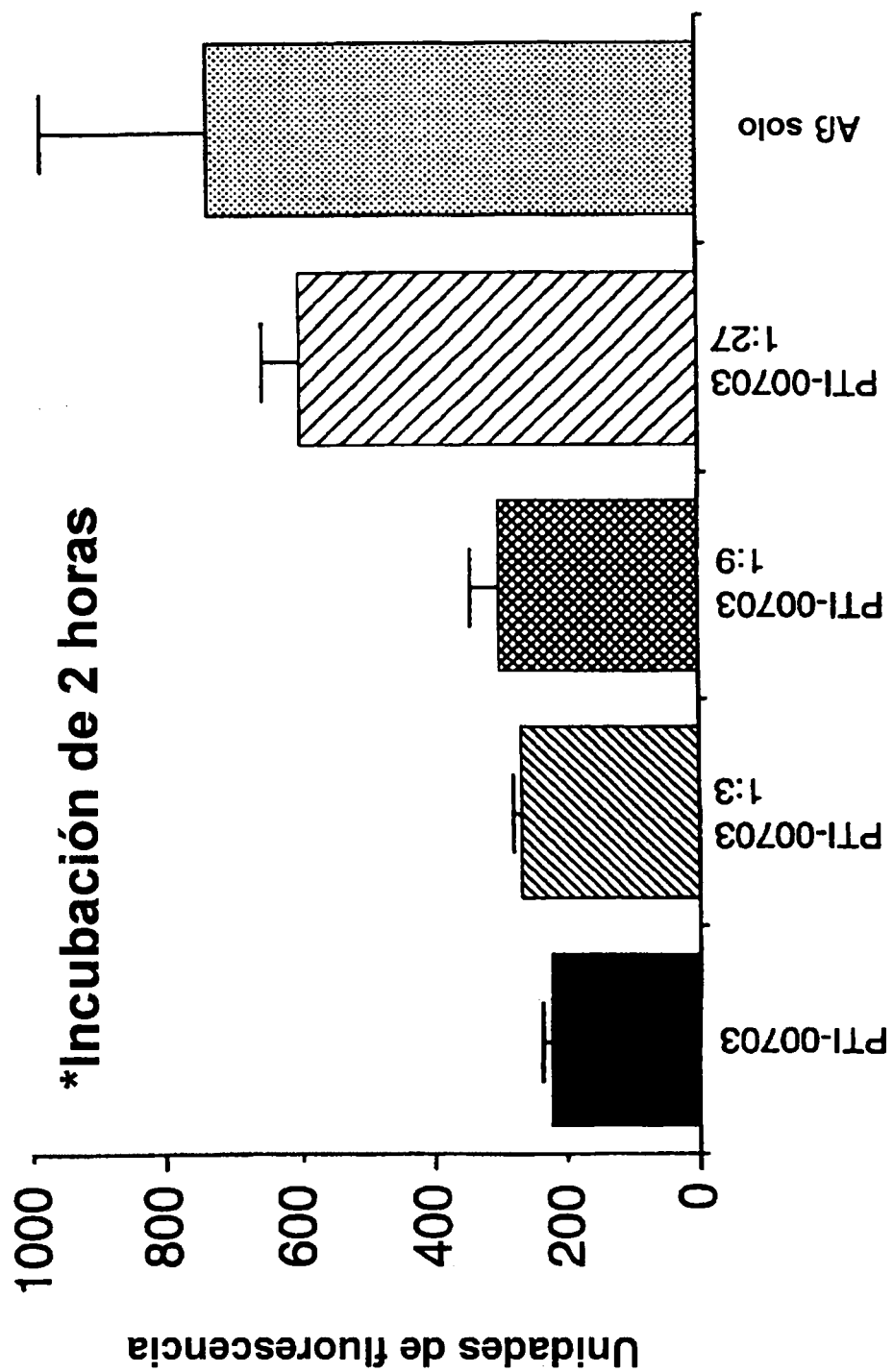
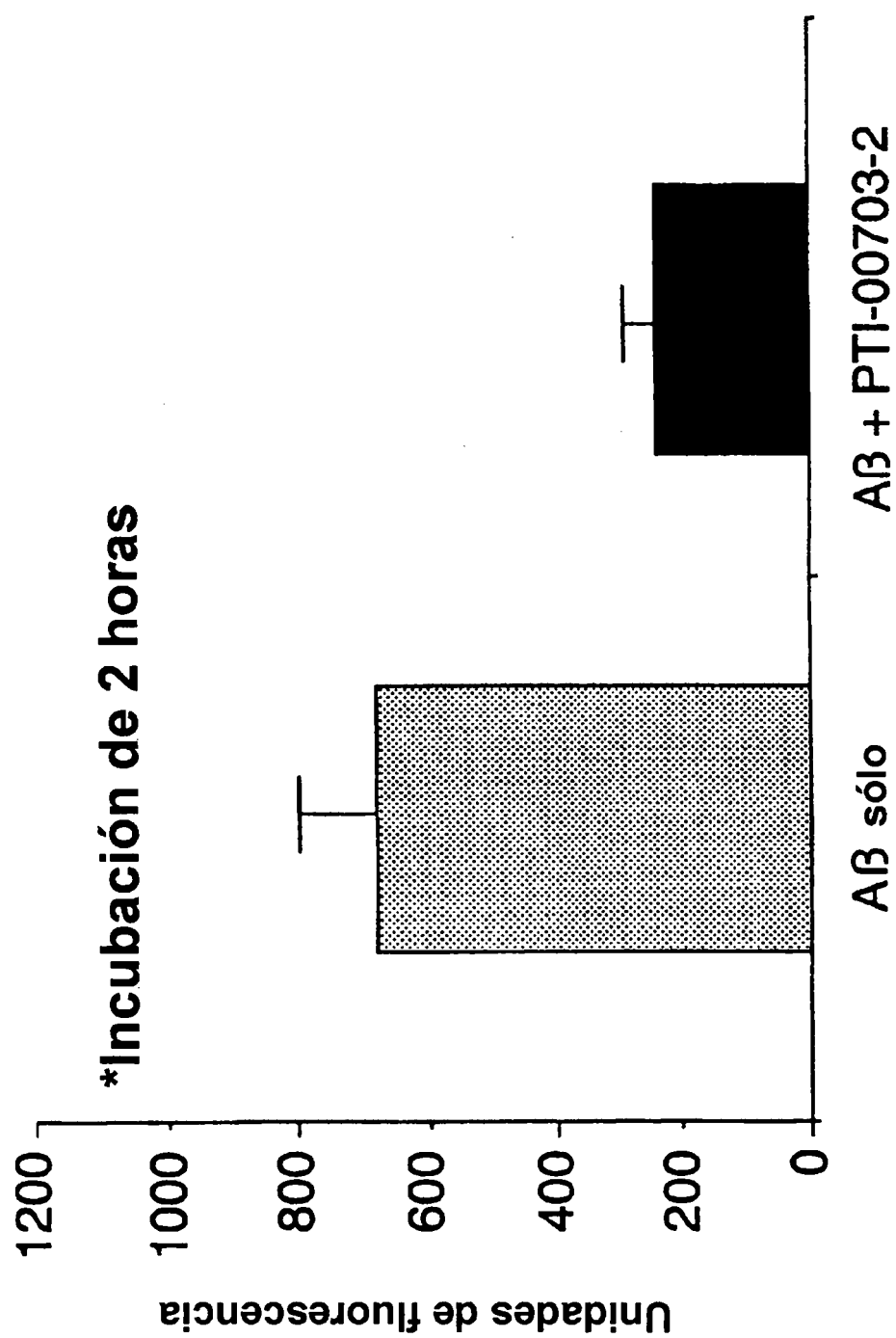


Figura 6



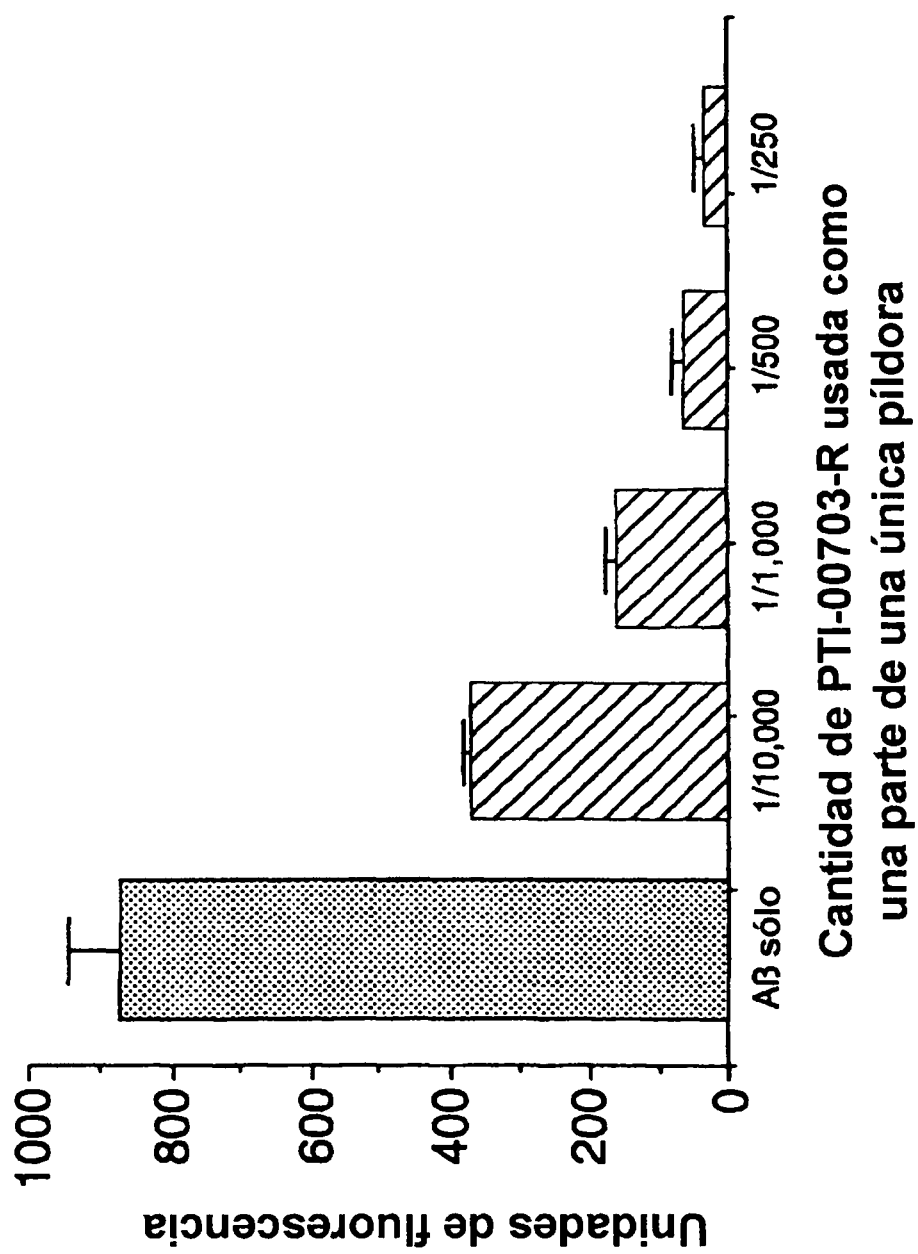


Figura 7

Figura 8

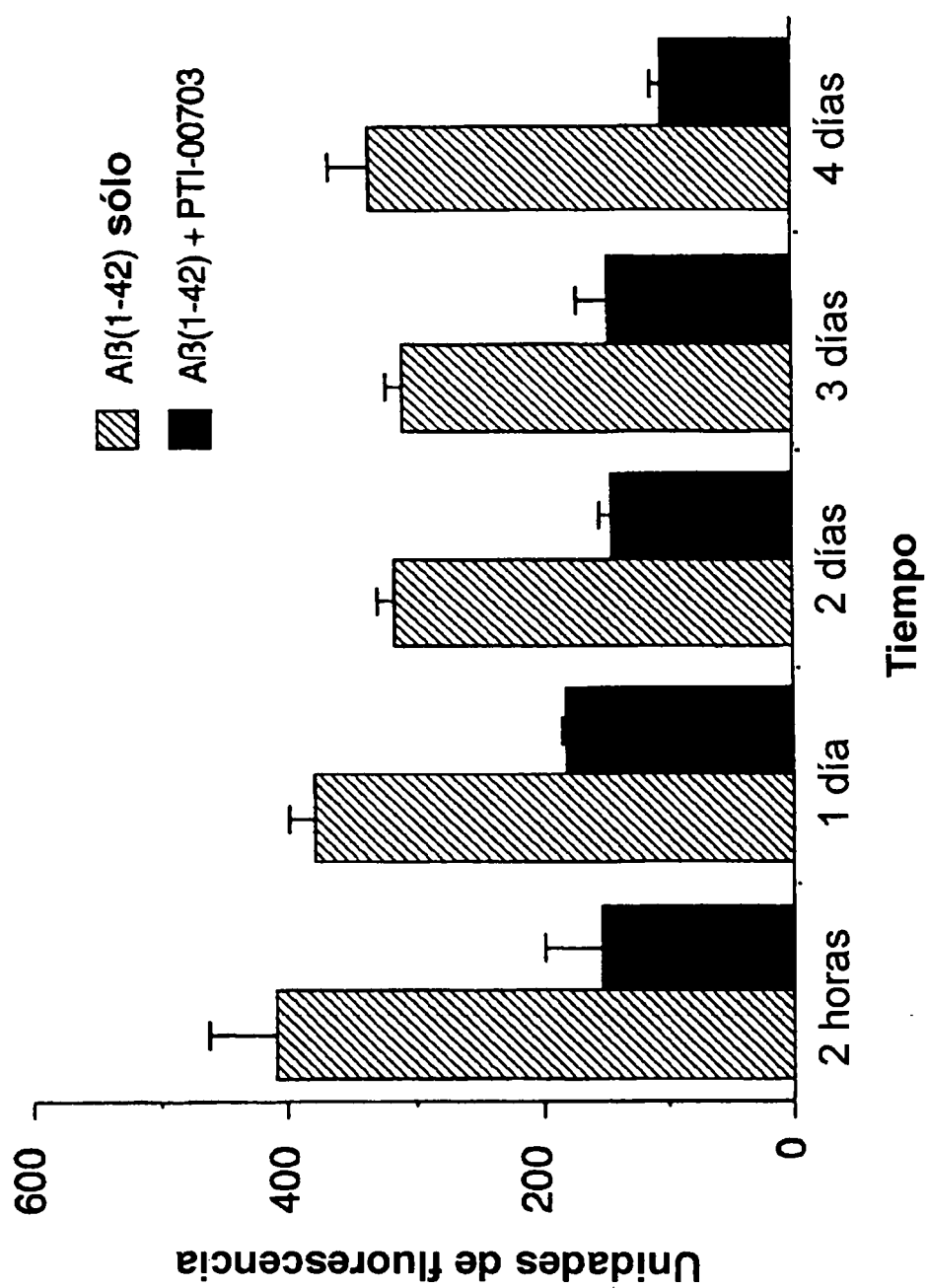


Figura 9

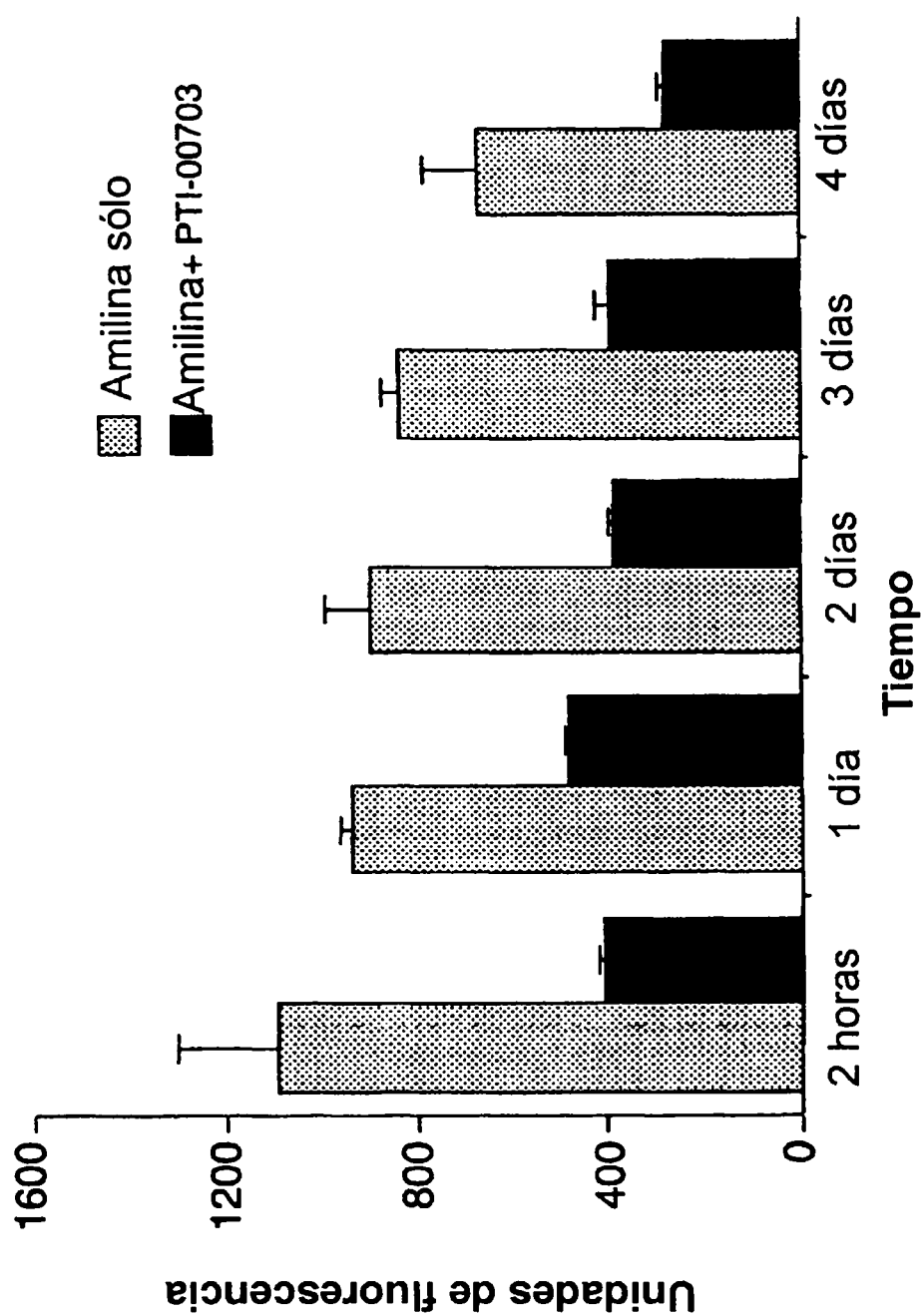


Figura 10a

A.

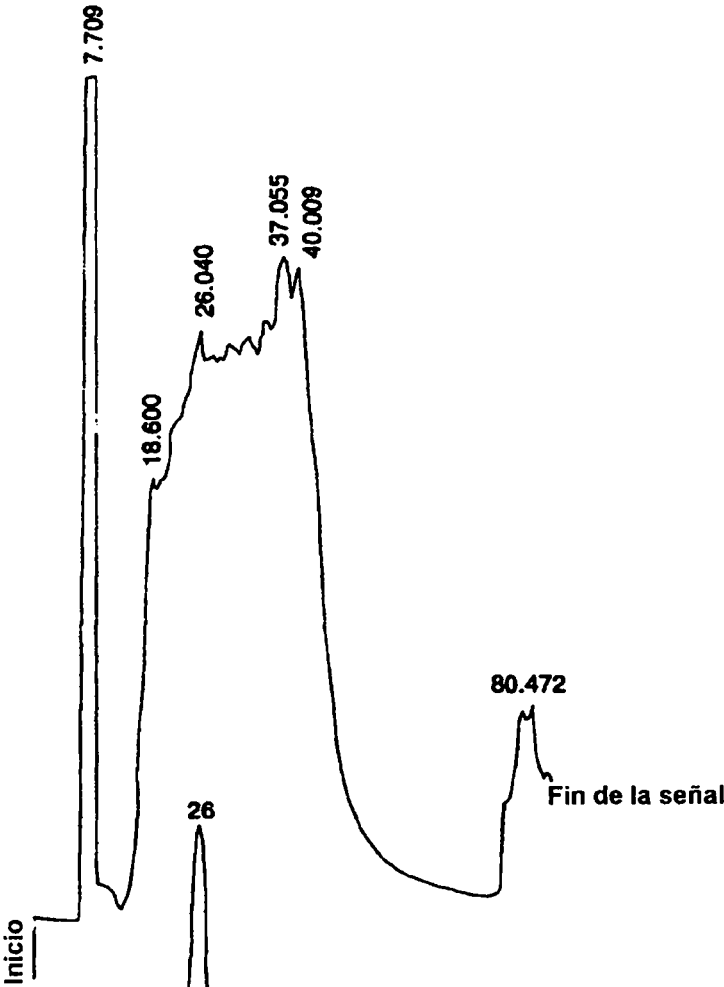


Figura 10b

B.

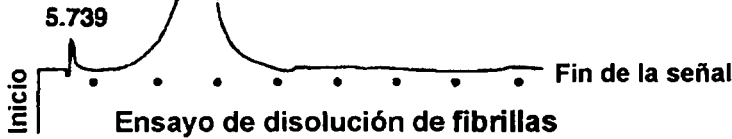


Figura 10c

C.

