



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 806**

51 Int. Cl.:
A61K 36/8962 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99902261 .9**
86 Fecha de presentación : **13.01.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1105145**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título: **Reducción de la concentración de homocisteína sérica usando *Allium* y vitaminas.**

30 Prioridad: **13.08.1998 US 133267**

73 Titular/es: **Wakunaga of America Co. Ltd.**
23501 Madero
Mission Viejo, California 92691-2744, US
Harunobu Amagase

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

72 Inventor/es: **Amagase, Harunobu**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 289 806 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reducción de la concentración de homocisteína sérica usando *Allium* y vitaminas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al uso de una composición para reducir las concentraciones séricas de homocisteína en mamíferos.

10 **Antecedentes de la invención**

La homocisteína, un aminoácido azufrado de tres carbonos (Cys C), con número de registro CAS 52-90-4, que tiene la fórmula molecular $C_3H_7NO_2S$ [HS-CH₂-CH(NH₂)-COOH] y un peso molecular de 121,15, ha atraído el interés debido a su relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios han mostrado que 15 pacientes con infarto de miocardio, ictus o enfermedad arterial periférica oclusiva frecuentemente son hiperhomocisteinémicos.

Esta bibliografía incluye:

20 **Clarke. R.**, y col. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1991, 324:1149-1155.

Stamfer. M.J., y col. A Positive Study of Plasma Homocyst(e)ine and Risk of Myocardial Infarction in US Patients. *JAMA*, 1992, 268:877-881.

25 **Malinow. M. R.** Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *Journal of Internal Medicine*, 1994, 236:603-617.

Bratterstrom, L. y col. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *Journal of Internal Medicine*, 1994, 236:633-641.

30 **Arnessen, E.**, y col. Serum Total Homocysteine and Coronary Heart Disease. *International Journal of Epidemiology*, 1995, 24:704-709.

35 **Selhub, J.** y col. Association Between Plasma Homocysteine Concentrations And Extracranial Carotid-Artery Stenosis. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 332:286-291.

Perry. I.J., y col. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*, 1995, 346:1395-1398.

40 **Boshey C. J.**, y col. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. *JAMA*, 1995, 274:1049-1057.

McCulley K. S. Homocysteine, Folate, Vitamin B6, and Cardiovascular Disease. *JAMA*, 1996, 279:392-393.

45 **Verhoef P.** y col. Homocysteine Metabolism and Risk of Myocardial Infarction: Risk with Vitamins B6, B12 and Folate. *American Journal of Epidemiology*, 1996, 143:845-859.

Cowley. G. The Heart Attackers. *Newsweek*, 11 de agosto 11, 1997, 55-60.

50 **Rosenberg I.H.**, y col. Colloquium: Homocyst(e)ine, Vitamins and Arterial Occlusive Diseases. *American Institute of Nutrition. J. Nutr.*, 1996, 126:1235S-1300S.

Graham. I. M., y col. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. *JAMA*, 1997, 277:1775-1791.

55 Se ha informado de que una concentración plasmática elevada de homocisteína aumenta el riesgo de enfermedades vasculares coronarias, periféricas y cerebrales. Actualmente se sabe que una hiperhomocisteinemia leve es un factor de riesgo para una enfermedad cardiovascular, episodios trombóticos y aterosclerosis, independientemente del colesterol, tabaquismo y presión arterial sistólica.

60 Bastante recientemente, dos estudios prospectivos, el estudio de Médicos de EE.UU. y el estudio Tromoso, mostraron ambos que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para el infarto de miocardio. Ueland y col. mostraron que la concentración plasmática de homocisteína en ayunas en pacientes con enfermedad vascular era un 31% más elevada que en sujetos normales. De forma similar, en el Estudio de salud de los médicos, Stampfer y col. observaron que varones que habían sufrido un infarto de miocardio tenían una concentración plasmática de homocisteína mayor que aquellos que no habían sufrido infarto. Más sorprendentemente, encontraron que incluso un pequeño 65 aumento en la concentración plasmática de homocisteína (es decir, 1,7 mol/l o 12% por encima del límite superior del intervalo normal), aumentaba el riesgo de infarto de miocardio agudo más de tres veces. El estudio epidemiológico más reciente de Selhub y col. demostraba que el cociente de probabilidad de estenosis de la arteria carótida mayor

del 25% era de 2,0 para los sujetos con homocisteína de 14,4 moles/l en comparación con aquellos que tenían 9,1 moles/l. Interesantemente, el estudio revelaba que la prevalencia de estenosis está relacionada de forma inversa con las concentraciones plasmáticas de homocisteína de modo lineal.

5 Se ha planteado la hipótesis de que la homocisteína puede 1) actuar como agente trombogénico, 2) altera la producción del factor de relajación derivado del endotelio y 3) estimular la proliferación de células musculares lisas, un componente clave para la aterogénesis.

10 Es conocido que las preparaciones de ajo poseen muchos efectos beneficiosos para el mantenimiento de buenas condiciones de salud, tal como resistencia frente a infecciones, reducción de los niveles de colesterol, detoxificación de sustancias perjudiciales, alivio del estrés y potenciación de la respuesta inmune. Uno de estos productos disponibles en el mercado es KYOLIC[®], disponible de Wakunaga América Co., Ltd., una filial de Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., que contiene Extracto de ajo envejecido[™]. Sin embargo, nunca se ha descrito que los productos derivados del ajo, incluyendo KOLIC[®], mostraran un efecto beneficioso sobre los niveles de homocisteína sérica.

15 Como las enfermedades cardiovasculares son una causa principal de muerte en los países industrializados, cualquier factor que pueda afectar a la concentración plasmática de homocisteína tiene una gran importancia para la salud pública. Aunque se ha realizado de forma continua y activa un análisis de materiales eficaces para reducir el nivel plasmático de homocisteína sin ningún efecto adverso, aún no se han descubierto materiales verdaderamente eficaces. 20 No se ha publicado ningún informe sobre materiales de origen vegetal, tal como de la familia *Liliaceae*, genero *Allium*.

Breve descripción de la invención

25 Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de una composición que contiene como principio activo al menos una planta de *Allium* o un extracto de al menos una planta de *Allium* y una cantidad terapéuticamente eficaz de vitamina B₁₂, vitamina B₆ y ácido fólico, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento de administración por vía oral para reducir el nivel plasmático de homocisteína en mamíferos en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

30 El objeto de esta invención es conseguir, según la invención, un medicamento mejorado que permita la administración oral a mamíferos (humanos) de una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto vegetal derivado del genero *Allium*. Las cualidades beneficiosas de *Allium* se potencian mediante la administración oral de vitamina B₁₂, vitamina B₆ y ácido fólico en un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéutica.

35 El medicamento de esta invención es eficaz para reducir, prevenir o mejorar el nivel plasmático elevado de homocisteína en mamíferos (humanos), permitiendo la administración oral de una cantidad terapéuticamente eficaz del material vegetal o extractos de los mismos y que generalmente son menos tóxicos que materiales farmacéuticos sintéticos.

40 Como resultado del análisis y ensayo de una amplia variedad de plantas de *Allium* y de sus extractos eficaces se ha descubierto, de acuerdo con esta invención, que el efecto del material derivado de *Allium* para reducir el nivel plasmático de homocisteína cuando se administra por vía oral en una cantidad terapéuticamente eficaz, puede potenciarse mediante su combinación con al menos uno de entre vitaminas B₁₂, vitamina B₆ y ácido fólico y, preferiblemente, los tres.

45 Esta invención tiene muchas otras ventajas y otros objetivos que pueden ser más claramente aparentes a partir de la consideración de las diversas formas en las que puede realizarse. Ciertas versiones de estas formas se describen en este documento y forman parte de la presente descripción. Estas formas se describirán ahora en detalle con el fin de ilustrar los principios generales de la invención; pero se entiende que esta descripción detallada no debe tomarse en sentido limitante. 50

Descripción detallada de la invención

55 De acuerdo con la presente invención, se usan plantas de *Allium* de la familia *Liliaceae*, género *Allium*, tales como *Allium sativum* L. (ajo), *Allium cepa* (cebolla), *Allium chinense* y *Allium ampeloprasum* (ajo de cabeza gigante/ajo elefante) y otras similares. La planta más adecuada para esta invención y una planta preferida es *Allium sativum* L. (ajo). Como se describirá, preferiblemente se usa la porción del bulbo de la planta. Como se describirá, estos materiales pueden estar secos o pueden usarse como material para la extracción. Además, también pueden utilizarse los materiales derivados del cultivo celular de las plantas identificadas de acuerdo con esta invención. Independientemente del uso 60 de la planta de *Allium*, se prefiere que la planta se crezca de forma orgánica para minimizar la posible presencia de contaminantes.

De acuerdo con esta invención, puede usarse ajo en polvo o los demás materiales de plantas de *Allium* descritos, que se producen cortando, secando por congelación y secando al aire a una temperatura que no exceda los 65°C y, a 65 continuación, pulverizando el material.

Los diversos materiales vegetales de *Allium* mencionados también pueden usarse en forma de extractos que normalmente se extraen con un disolvente o en condiciones acuosas. En una forma preferida de esta invención, el extracto

ES 2 289 806 T3

de las plantas de *Allium* es el extracto de las plantas descritas usando agua o alcohol, o mezcla de ambos en el proceso de extracción. El extracto puede prepararse a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo que oscila de algunos días a varios años. Las plantas de *Allium* usadas en la extracción pueden pelarse y/o machacarse con o sin una temperatura moderada para una extracción eficaz. Si es necesario, las plantas de *Allium* pueden machacarse y homogeneizarse para obtener el jugo de la planta después de calentar en agua templada. Puede añadirse al jugo hierro oxidado para eliminar tanto las porciones de proteína soluble en agua como el fructano, con un procesamiento adicional.

Según esta invención se prefiere que la planta de *Allium* y, preferiblemente, el ajo, se extraiga con alcohol acuoso a temperatura ambiente de tres meses a dos años. Normalmente el alcohol usado en la extracción es alcohol anhidro e hidratado, usando alcohol de alquilo o alqueno con una cadena de entre 1 y 4 átomos de carbono de longitud. De estos alcoholes, se prefiere el alcohol etílico hidratado por razones de seguridad del producto. Por tanto, el extracto preparado puede usarse como tal, concentrado en un concentrador, o en forma pulverizada después de la concentración al vacío o de la liofilización.

El nivel de dosis del material de esta invención puede variar según la edad, peso corporal y estado físico del receptor humano. Una dosis recomendada es la administración oral de 100 mg a 10 g por día para adultos como una preparación en polvo de plantas de *Allium* o extractos de las mismas, siendo el segundo el principal componente farmacéuticamente activo. Los niveles de dosis en función del peso corporal también pueden calcularse a partir de las cantidades relativas utilizadas en los ensayos animales que se describan.

Los estudios en animales han demostrado la eficacia del producto y del procedimiento de esta invención. A lo largo del estudio se usaron ratas macho en fase de crecimiento de la cepa Sprague-Dawley (120-180 gramos) obtenidas de una fuente comercial. Los animales se alimentaron con una dieta definida de aminoácidos que contenía succinilsulfatiazol (10 g/kg de dieta), pero no ácido fólico, o la misma dieta suplementada con el 4% en peso de ajo en forma de extracto envejecido de ajoTM, disponible a partir de Wakunaga de América Co., Ltd. (extracto de ajo, extraído durante más de un año) o dieta de vitamina B₆ (8 mg/kg de dieta), de vitamina B₁₂ (50 g/kg de dieta) o de ácido fólico (5 mg/kg de dieta), o el extracto y las vitaminas y el ácido fólico en las cantidades especificadas. Los animales se mantuvieron con acceso libre a agua y comida. La alimentación se mantuvo durante 4 semanas.

Al final de la alimentación, las ratas se mantuvieron en ayuno durante una noche y se les extrajo sangre de la vena cava inferior en condiciones de anestesia con éter. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a 200xg durante cinco minutos a 4°C en la hora que siguió a su recogida. Se recogió el plasma y se conservó a -80°C hasta el análisis. Esta preparación se siguió estrictamente con el fin de prevenir un aumento de homocisteína o su liberación al plasma a partir de los eritrocitos. La concentración plasmática total de homocisteína se determinó mediante el procedimiento de Vester y Rasmussen de fluorescencia - HPLC.

Los datos son los siguientes:

Tratamiento	Nivel de homocisteína plasmática (µmoles/l)
1. Control	42,4
2. Extracto de ajo (4% en dieta)	10,0
3. Vitamina B ₆ (8 mg/kg de dieta)	32,2
4. Vitamina B ₁₂ (50 µg/kg de dieta)	28,9
5. Ácido fólico (5mg/kg de dieta)	15,4
6. 2+3+4+5	4,3

Estos datos indican que el extracto de ajo (extracto de la planta de *Allium*) sólo, producía una reducción mayor en la concentración plasmática de homocisteína en los animales del ensayo que cualquiera de las dos vitaminas o el ácido fólico sólo. El resultado del extracto de ajo y de cada una de las vitaminas y ácido fólico es llamativo y representa al

menos una reducción del 90% de la concentración de homocisteína plasmática en comparación con el control. Estos datos también indican que los niveles plasmáticos elevados de homocisteína pueden reducirse marcadamente con el material de la planta de *Allium* o con el extracto usado sólo o en combinación con las vitaminas descritas y el ácido fólico.

Según la invención, se desea que el producto de *Allium* descrito se administre por vía oral a un humano y, preferiblemente, en un régimen diario, en una o más cápsulas, cápsulas de gel o comprimidos, en forma líquida o en cualquier otra forma farmacéuticamente aceptable. El material o materiales pueden mezclarse con cualquier otro de una serie de vehículos farmacéuticamente aceptados conocidos. Independientemente de la forma de administración oral, el siguiente ejemplo representa la dosificación diaria preferida y el intervalo de dosis recomendadas, teniendo en cuenta que el peso corporal es un factor que influye en la dosificación.

Material	Cantidad preferida	Intervalo
Extracto de ajo envejecido TM en polvo:	700 mg	100 mg a 10.000mg
Vitamina B ₁₂ :	200 µg	20 µg a 5.000 µg
Vitamina B ₆ :	10 mg	1 mg a 100mg
Ácido fólico:	400 µg	20 pg a 10.000 µg

Como puede apreciarse, tomada por vía oral y en el intervalo descrito anteriormente, la combinación de material vegetal de *Allium*, tales como derivado del ajo, en las formas descritas, y las vitaminas y el ácido fólico, se ha demostrado que reduce sustancialmente el nivel plasmático de homocisteína y, por tanto, previene, trata o mejora las enfermedades cardiovasculares, tales como el infarto de miocardio, el ictus y la arterosclerosis múltiple. También es aparente que puede usarse el material vegetal de *Allium*, tal como derivado del ajo, en las formas descritas, sin las vitaminas y el ácido fólico, o el material vegetal de *Allium* y una o más vitaminas y ácido fólico. Debido al marcado efecto que los productos vegetales de *Allium*, especialmente derivados del ajo, han mostrado, pueden añadirse, si se desea, otros suplementos alimenticios al material activo. También puede usarse material de más de una planta del género *Allium* o de extractos de las mismas, aunque se prefiere utilizar *Allium sativum L.* (ajo) o extractos del mismo.

También es posible añadirse diversos materiales farmacológicamente aceptados, por ejemplo, excipientes, etc., como se conoce en la técnica.

Debe entenderse que esta invención no se limita a las descripciones detalladas mostradas en este documento que describe en detalle formas preferidas de la presente invención.

Bibliografía citada en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye sólo para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Incluso aunque se ha puesto un gran cuidado en la recopilación de las referencias, no podemos excluir errores u omisiones y la EPO se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Bibliografía distinta a patentes citada en la descripción

- CLARKE R y col. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 324, 1149-1155.

- STAMFER, M.J. y col. Positive Study of Plasma Homocyst(e)ine and Risk of Myocardial Infarction in US Patents, 1992, vol. 268, 877-881.

- MALINOW M.R. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *Journal of Internal Medicine*, 1994, vol. 236, 603-617.

- BRATTERSTROM y col. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *Journal of Internal Medicine*, 1994, vol. 236, 633-641.

- ARNESSEN, E. y col. Serum Total Homocysteine and Coronary Heart Disease. *International Journal of Epidemiology*, 1995, vol. 24, 704-709.

ES 2 289 806 T3

• **SELHUB, J.** y col. Association Between Plasma Homocysteine Concentrations And Extracranial Carotid-Artery Stenosis. *The New England Journal of Medicine*, 1995, vol. 332, 286-291.

5 • **PERRY, I.J.** y col. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle aged British men. *Lancet*, 1995, vol. 346, 1395-1398.

• **BOSHEY, C.J.** y col. *A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease*, 1995, vol. 274, 1049-1057.

10 • **MCCULLEY, K.S.** *Homocysteine, Folate, Vitamin B6, and Cardiovascular Disease*, 1996, vol. 279, 392-393.

• **VERHOEF, P.** y col. Homocysteine Metabolism and Risk of Myocardial Infarction: Risk with Vitamins B6, B12 and Folate. *American Journal of Epidemiology*, 1996, vol. 143, 845-859.

15 • **COWLEY, G.** *The Heart Attackers*. Newsweek, 11 de agosto de 1997, 55-60.

• **ROSENBERG, I.H.** y col. Colloquium: Homocyst(e)ine, Vitamins and Arterial Occlusive Diseases. American Institute of Nutrition. *J. Nutr.*, 1996, vol. 126, 1235S-1300S.

20 • **GRAHAM, I.M.** y col. *Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease*, 1997, vol. 277, 1775-1791.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una composición que contiene como el ingrediente activo al menos una planta de *Allium* o un extracto de al menos una planta de *Allium*, y una cantidad terapéuticamente eficaz de vitamina B₁₂, vitamina B₆ y ácido fólico, mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento de administración por vía oral para reducir el nivel plasmático de homocisteína en mamíferos en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

10 2. El uso como se expone en la reivindicación 1 en el que dicha planta de *Allium*, o extracto de al menos una planta de *Allium*, se selecciona entre el grupo constituido por *Allium sativum* L. (ajo), *Allium cepa* (cebolla), *Allium chinense* y *Allium ampeloprasum* (ajo de cabeza gigante/ajo elefante).

15 3. El uso como se expone en la reivindicación 1 en el que dicha composición incluye entre 100 mg y 10.000 mg de dicha planta o extracto de *Allium* en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de entre 100 mg y 10.000 mg de dicha planta o extracto de *Allium*.

20 4. El uso como se expone en la reivindicación 3 en el que dicha vitamina B₁₂ está presente en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de entre 20 µg y 5.000 µg de dicha vitamina B₁₂, la vitamina B₆ está presente en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de entre 1 mg y 100 mg de dicha vitamina B₆ y el ácido fólico está presente en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de entre 20 µg y 10.000 µg de dicho ácido fólico.

25 5. El uso como se expone en la reivindicación 1 en el que dicha composición incluye al menos 700 mg de dicha planta o extracto de *Allium* en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de al menos 700 mg de dicha planta o extracto de *Allium*.

30 6. El uso como se expone en la reivindicación 5 en el que dicha vitamina B₁₂ está presente en una cantidad que permite la administración diaria por vía oral de 200 µg de dicha vitamina B₁₂, la vitamina B₆ está presente en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de 100 mg de dicha vitamina B₆ y el ácido fólico está presente en una cantidad que permite una administración diaria por vía oral de 400 µg de dicho ácido fólico.

35 7. El uso como se expone en la reivindicación 1 en el que dicha planta de *Allium* o extracto de *Allium* es de *Allium sativum* L. (ajo).

40

45

50

55

60

65