

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 508**

51 Int. Cl.:

A61K 36/539 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2018** **PCT/US2018/037454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18232063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2018** **E 18816475 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3638277**

54 Título: **Composiciones y métodos para la inhibición de la beta secretasa**

30 Prioridad:

15.06.2017 US 201762520141 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.03.2025

73 Titular/es:

SAMI LABS LIMITED (100.00%)
19/1 & 19/2, I Main, II Phase, Peenya Industrial
Area, Karnataka
Bangalore 560058, IN

72 Inventor/es:

MAJEED, MUHAMMED y
NAGABHUSHANAM, KALYANAM

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 005 508 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

Composiciones y métodos para la inhibición de la beta secretasa

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta es una presentación PCT que reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense no. 62520141 presentada el 15 de junio de 2017.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La invención en general se refiere a inhibidores de la β secretasa. Más específicamente, la presente invención se refiere a la inhibición de la actividad y expresión de la β secretasa y la reducción del contenido de β amiloide utilizando una composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina.

Descripción de la técnica anterior

20 La enfermedad de Alzheimer es un trastorno debilitante del sistema nervioso caracterizado por la presencia de pérdida de memoria, deterioro cognitivo, desorientación y cambios de personalidad. Las características patológicas incluyen la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, lo que provoca inflamación, daño neuronal y apoptosis. Existen numerosos factores que conducen al desarrollo de enfermedades que incluyen el estrés oxidativo, la inflamación, la diabetes, la obesidad, la presión arterial elevada, la genética, la dieta, el trauma y la presencia del síndrome de Down. Al ser un trastorno multifactorial, las realizaciones de tratamiento se concentran en aliviar uno o más síntomas.

30 Una gran cantidad de evidencia sugiere que el β amiloide es fundamental para la patología de la enfermedad de Alzheimer y es probable que desempeñe una función importante en el desarrollo de la enfermedad. Generados por la acción de la enzima de escisión APP del sitio β (BACE, también llamada β secretasa) en la proteína precursora de amiloide (APP), estos péptidos de longitud 1-42 aminoácidos, se acumulan en el espacio sináptico y aumentan la excitotoxicidad en las neuronas que conduce al daño neuronal y la apoptosis. El papel de BACE está bien documentado en los siguientes documentos de la técnica anterior:

- 35 1. Vassar et al., (2009) The β -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function and Therapeutic Potential, J Neurosci.; 29(41): 12787-12794.
2. Cole and Vassar (2007) The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1, Molecular Neurodegeneration; 2:22
- 40 3. Macini et al., (2011) Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors, Analytical and Bioanalytical Chemistry; 400 (7):1979-1996.
4. Fukumoto et al., (2002) β -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease, Arch Neurol.;59(9): 1381-1389.
- 45 5. Lange et al., (2015) Association of a BACE1 Gene Polymorphism with Parkinson's disease in a Norwegian Population, Parkinsons Dis.; 2015: 973298.

Además de su función en las enfermedades neurodegenerativas, también se informa que BACE1 desempeña un papel en el desarrollo del glaucoma (Guo et al., (2007) Targeting amyloid- β in glaucoma treatment, Proc Natl Acad Sci U S A; 104(33): 13444-13449).

50 La inhibición de la actividad y la expresión de la β secretasa sería una opción eficaz para aliviar los síntomas de los trastornos relacionados con la β secretasa, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las enfermedades relacionadas con los priones, el deterioro cognitivo, el deterioro cognitivo leve, la demencia vascular, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D) y el glaucoma. Las moléculas naturales que pueden inhibir la actividad de la β secretasa se están examinando cada vez más. Algunas de las moléculas naturales que se informan tienen actividad inhibidora de la β secretasa se indican en los siguientes documentos de la técnica anterior:

- 60 1. Zang and Tanzi (2012) Natural Modulators of Amyloid-Beta Precursor Protein Processing, Curr Alzheimer Res. 2012 PMID: 22998566.
2. Youn et al., (2017) Polymethoxyflavones: Novel β -Secretase (BACE1) Inhibitors from Citrus Peels, Nutrients; 9(9): 973.
3. Fang et al., (2017) β -Secretase (BACE1) Inhibitors from Natural Products, In: Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes, ed: Paula B. Andrade, Patricia Valentão, David M. Pereira, Wiley Publishers,
- 65 4. Zang et al., (2013) baicalein reduces β -amyloid and promotes nonamyloidogenic amyloid precursor protein processing in an Alzheimer's disease transgenic mouse model, J Neurosci Res.;91(9):1239-46.

Sin embargo, faltan una molécula natural y/o una combinación de moléculas naturales que sean eficaces para inhibir tanto la expresión como la actividad de la β secretasa. La presente invención resuelve el problema anterior al describir una composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina para inhibir la actividad y expresión de la β secretasa.

El objetivo principal de la invención es divulgar el uso de una composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina para inhibir la actividad y expresión de la β secretasa.

Otro objetivo de la invención es divulgar el uso de una composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina para reducir el contenido de β amiloide.

Otro objetivo de la invención es divulgar un método de manejo terapéutico de trastornos mediados por β secretasa usando una composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina.

La invención cumple los objetivos mencionados anteriormente y proporciona otras ventajas relacionadas.

Breve descripción de la invención

La presente invención describe el uso de una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina para inhibir la actividad y expresión de β secretasa. La invención también describe la reducción del contenido de amiloide en células PS-70 usando la composición mencionada anteriormente. Además, la invención menciona el uso de la composición para el manejo terapéutico de trastornos mediados por β secretasa.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una representación gráfica para la inhibición de la actividad de la β secretasa por la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina.

La Fig. 2 es una representación gráfica para la inhibición de la expresión de β secretasa por la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina.

La Fig. 3 es una imagen de transferencia Western que muestra la disminución en la expresión de una β secretasa por la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina, en comparación con el control

La Fig. 4 es una representación gráfica que muestra la reducción en el contenido de amiloide mediante la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina. Significativamente diferente del control $P < 0,001$

Descripción de las realizaciones más preferidas

En la realización más preferida, la invención describe un método para inhibir la actividad de la enzima β secretasa, dicho método comprende el paso de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para provocar el efecto de inhibición de la actividad β secretasa. En una realización relacionada, la composición comprende preferentemente 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.

En la realización más preferida, la invención describe un método para inhibir la expresión de β secretasa, dicho método comprende el paso de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para provocar el efecto de reducir la expresión de la enzima β secretasa. En una realización relacionada, la composición comprende preferentemente 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.

En la realización más preferida, la invención describe un método para reducir el contenido de β amiloide, dicho método comprende la etapa de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para reducir la cantidad de β amiloide. En una realización relacionada, la composición comprende preferentemente 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.

En la realización más preferida, la invención describe un método para el manejo terapéutico de trastornos mediados por β secretasa en mamíferos, dicho método comprende la etapa de administrar una dosis eficaz de una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina a mamíferos que necesitan dicha terapia. En una realización relacionada, la composición comprende preferentemente 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina. En otra realización relacionada, los trastornos mediados por β secretasa se seleccionan del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades relacionadas con priones, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D) y glaucoma. En una realización preferida, el mamífero es un humano. En otra realización preferida, la composición se formula con excipientes, adyuvantes, diluyentes o portadores farmacéuticamente/nutraceuticamente aceptables y se administra por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas,

jarabes, gomitas, polvos, suspensiones, emulsiones, masticables, caramelos y comestibles.

Los ejemplos específicos incluidos en la presente a continuación ilustran las realizaciones más preferidas mencionadas anteriormente de la presente invención.

Ejemplo 1: Efectos de la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina (OBC) sobre la actividad y expresión de la beta-secretasa

La composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina (OBC), se aisló de *Oroxylum indicum* según el proceso mencionado en la solicitud de patente estadounidense no. US 15805320.

Metodología: La composición (1 µg y 10 µg) se incubó con células PS-70 durante 24 horas (2 tratamientos separados). La actividad de beta-secretasa se midió utilizando el kit fluorimétrico comercial adquirido de Biovision (Catálogo #K360-100). Se utilizó el procedimiento de transferencia Western estandarizado y establecido para estudiar la expresión proteica de la beta-secretasa. La β-actina se utilizó como control de carga. La intensidad de la banda se calculó mediante análisis densitométrico utilizando el software Alpha View.

Resultados: La composición (1 µg y 10 µg) inhibió de forma dependiente de la dosis la actividad de la beta-secretasa (**Fig. 1**) ($p < 0,0003$) y la expresión de proteínas (**Fig. 2**) en comparación con el control. La imagen de transferencia Western (**Fig. 3**) también confirma lo anterior indicando que la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina se puede utilizar eficazmente para tratar los trastornos mediados por BACE 1.

Además de su función en la enfermedad de Alzheimer, la patogénesis relacionada con BACE 1 también está implicada en la demencia vascular (Cole y Vassar (2009). Vinculación de los trastornos vasculares y la enfermedad de Alzheimer: Potential involvement of BACE1, *Neurobiol Aging*; 30(10): 1535-1544), Parkinson's disease (Lange et al., (2015) Association of a BACE1 Gene Polymorphism with Parkinson's Disease in a Norwegian Population, *Parkinsons Dis.*; 2015: 973298), Prion diseases (Parkin et al., (2007) Cellular prion protein regulates β-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein, *PNAS*; 104 (26):11062-11067), cognitive decline, mild cognitive impairment, Down's syndrome, Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis dutch type (HCHWA-D) (United States Patent 9526727, Inhibitors of beta-secretase), and glaucoma (Guo et al., (2007) Targeting amyloid-β in glaucoma treatment, *Proc Natl Acad Sci USA*; 104(33): 13444-13449).

Ejemplo 2: Efectos de la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina (OBC) sobre el contenido de beta-amiloide

La composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina (OBC), se aisló de *Oroxylum indicum* según el proceso mencionado en la solicitud de patente estadounidense no. US 15805320.

Metodología: La composición (25 µg, 50 µg y 100 µg) se incubó con células PS-70 durante 24 horas. El contenido de beta-amiloide se midió utilizando el kit comercial beta-amiloide ELISA. La curva estándar de beta-amiloide se realizó inicialmente y el contenido se midió después de la incubación. Se utilizó pioglitazona (5 y 10 µM) como control positivo.

Resultados: La composición (25 µg, 50 µg y 100 µg) redujo de forma dependiente de la dosis el contenido de beta-amiloide ($p < 0,0001$) (**Fig. 4**). Nuestros resultados se validaron aún más mediante el uso de pioglitazona en este estudio.

En conclusión, la composición que contiene oroxilina A, baicaleína y crisina fue muy eficaz para inhibir la actividad y expresión de la enzima β secretasa y también para reducir el contenido de amiloide, lo que indica que la composición puede administrarse eficazmente para contrarrestar los síntomas asociados con los trastornos mediados por la β secretasa.

Si bien la invención se ha descrito con referencia a una realización preferida, los expertos en la técnica deben entender claramente que la invención no se limita a esta. Más bien, el alcance de la invención debe interpretarse solo junto con las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para inhibir la actividad de la enzima β secretasa, dicho método comprende el paso de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para provocar el efecto de inhibición de la actividad de β secretasa, en donde el método no comprende un tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.
- 15 3. Un método para inhibir la expresión de β secretasa, dicho método comprende el paso de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para provocar el efecto de disminuir la expresión de la enzima β secretasa, en donde el método no comprende un tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición comprende 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.
- 25 5. Un método para reducir el contenido de β amiloide, dicho método comprende el paso de poner en contacto células de mamífero con una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina, para reducir la cantidad de β amiloide, en donde el método no comprende un tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición comprende 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.
- 35 7. Una composición que contiene no menos del 10 % p/p de oroxilina A, no menos del 10 % p/p de baicaleína y no menos del 2 % p/p de crisina para su uso en el tratamiento terapéutico de trastornos mediados por β secretasa en un mamífero, en donde los trastornos mediados por β secretasa se seleccionan del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades relacionadas con priones, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D) y glaucoma.
- 40 8. La composición según la reivindicación 7 para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición comprende 10 %-15 % p/p de oroxilina A, 10 %-25 % p/p de baicaleína y 2 %-10 % p/p de crisina.
9. La composición según la reivindicación 7 para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el mamífero es un ser humano.
10. La composición según la reivindicación 7 para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición se formula con excipientes, adyuvantes, diluyentes o portadores farmacéuticamente/nutraceuticamente aceptables y se administra por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes, gomitas, polvos, suspensiones, emulsiones, masticables, caramelos o comestibles.

DIBUJOS

Fig. 1

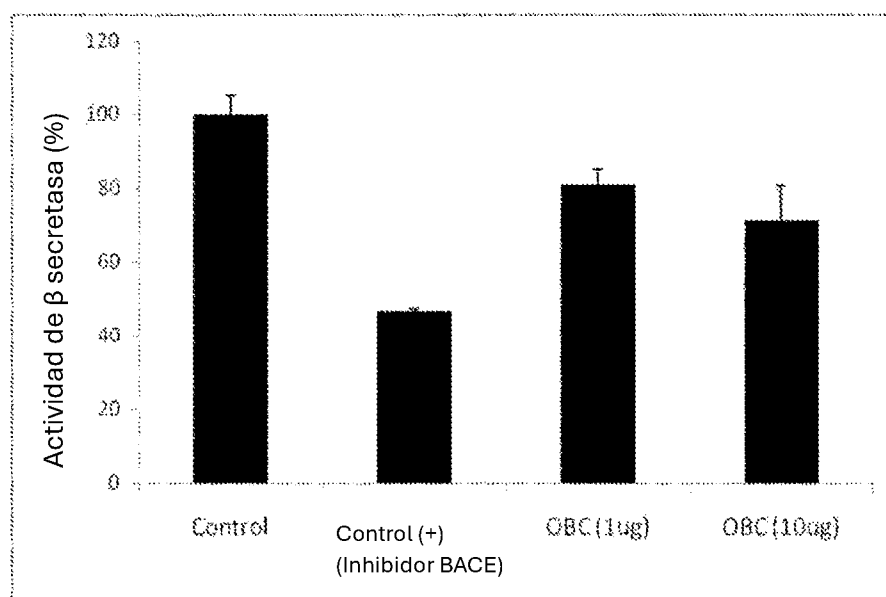


Fig. 2

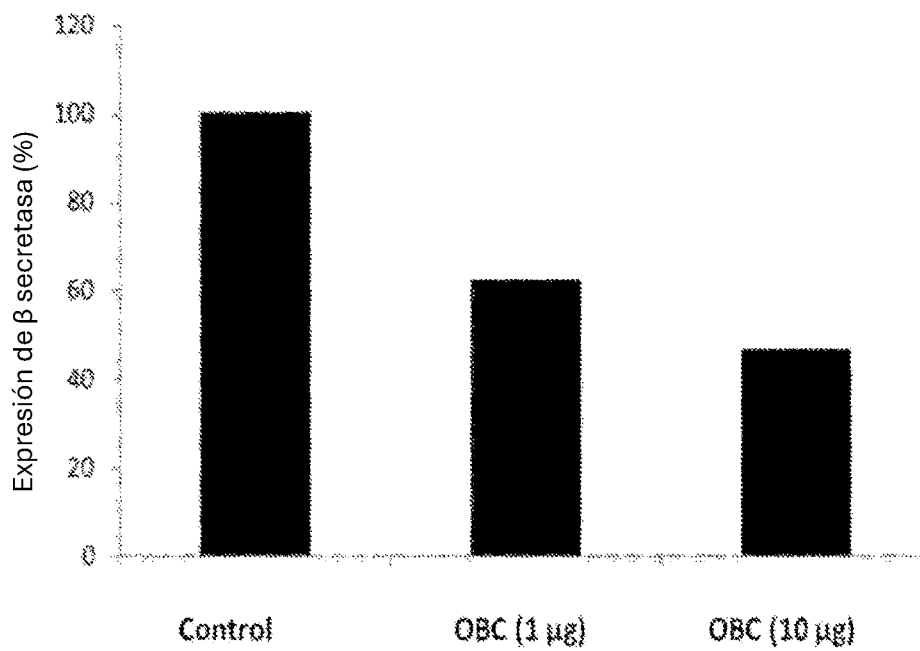


Fig. 3

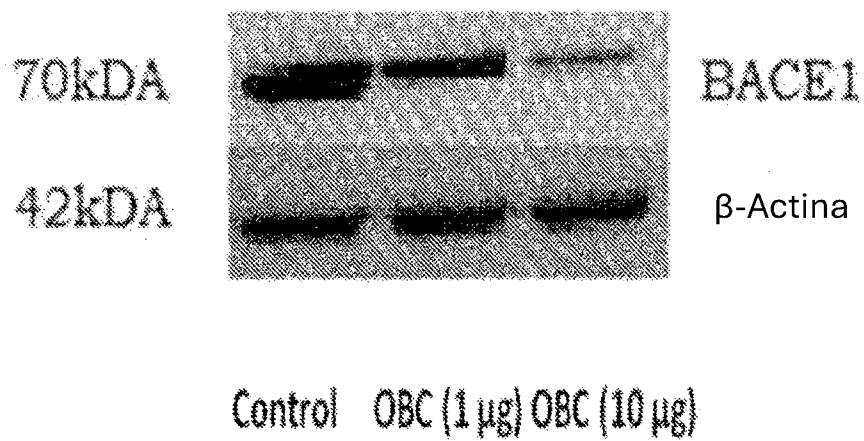


Fig. 4

