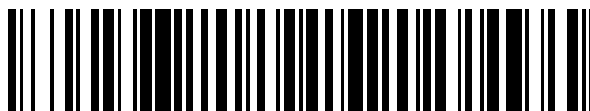


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 850 152**

51 Int. Cl.:

A61K 36/81 (2006.01)

A61K 36/80 (2006.01)

A61K 36/47 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2015** **PCT/IB2015/000796**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166565**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2015** **E 15734437 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020** **EP 3283094**

54 Título: **Uso de un extracto de withania para el tratamiento de sinucleinopatías alfa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.08.2021

73 Titular/es:

ETHNODYNE (50.0%)
151 Boulevard Haussmann
75008 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS (50.0%)

72 Inventor/es:

RABHI, CHÉRIF;
CARIEL, LÉON;
OUAZZANI, JAMAL y
ARCILE, GUILLAUME

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 850 152 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

Uso de un extracto de withania para el tratamiento de sinucleinopatías alfa

La invención se refiere al uso de una composición a partir de un extracto vegetal de *Withania somnifera*, para prevenir, tratar de retrasar la progresión de la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis.

- 5 El término α -sinucleinopatías se emplea habitualmente para definir un grupo de trastornos neurodegenerativos que muestran una acumulación proteica patológica común de agregados de α -sinucleína. En estas enfermedades, los agregados de α -sinucleína se depositan en poblaciones vulnerables selectivas de células neuronales y gliales (Goedert M (1999) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1101-1118; Spillantini M.G y Goedert M (2000) *Ann N Y Acad Sci* 920: 16-27; Trojanowski J.Q y Lee V.M (2003) *Ann N Y Acad Sci* 991: 107-110.).
- 10 El mecanismo de agregación de la alfa-sinucleína es incierto. Existe evidencia de un intermedio estructurado rico en estructura beta que puede ser el precursor de la agregación y, en última instancia, los cuerpos de Lewy.
- Desde un punto de vista clínico, las α -sinucleinopatías incluyen trastornos sintomáticamente heterogéneos, entre ellos, enfermedades asociadas con cuerpos de Lewy tales como la EP, demencia con cuerpos de Lewy, también conocida como demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, enfermedad con cuerpos de Lewy
- 15 corticales y demencia senil tipo Lewy, atrofia multisistémica, disfagia por cuerpos de Lewy así como neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral tipo I y fallo autonómico puro. La enfermedad con cuerpos de Lewy es una de las causas más comunes de demencia en los ancianos. La demencia es la pérdida de funciones mentales lo suficientemente grave como para afectar a las actividades y relaciones normales.
- La alfa-sinucleína es una proteína de función desconocida que se encuentra principalmente en el tejido neural y constituye hasta el 1% de todas las proteínas en el citosol de las células cerebrales. Se expresa predominantemente en la neocorteza, hipocampo, sustancia negra, tálamo y cerebelo. Es predominantemente una proteína neuronal, pero también se puede encontrar en las células neurogliales. Se encuentran cantidades menores en el corazón, músculos y otros tejidos. En el cerebro, la alfa-sinucleína se encuentra principalmente en los extremos de las células nerviosas (neuronas) en estructuras especializadas llamadas terminales presinápticos. Dentro de estas estructuras, la alfa-
- 20 sinucleína interacciona con fosfolípidos y proteínas. Los terminales presinápticos liberan mensajeros químicos, llamados neurotransmisores, de compartimentos conocidos como vesículas sinápticas. La liberación de neurotransmisores transmite señales entre neuronas y es fundamental para el funcionamiento normal del cerebro.
- Aunque la función de la alfa-sinucleína no se comprende bien, los estudios sugieren que desempeña un papel importante en el mantenimiento de un suministro de vesículas sinápticas en los terminales presinápticos. También puede ayudar a regular la liberación de dopamina, un tipo de neurotransmisor que es fundamental para controlar el
- 25 inicio y la detención de los movimientos voluntarios e involuntarios.
- La alfa-sinucleína es regulada por aumento específicamente en una población discreta de terminales presinápticos del cerebro durante un período de reordenamiento sináptico relacionado con la adquisición. Se ha mostrado que la alfa-sinucleína interacciona significativamente con la tubulina y que la alfa-sinucleína puede tener actividad como una
- 30 potencial proteína asociada a microtúbulos.
- Aparentemente, la alfa-sinucleína es esencial para el desarrollo normal de las funciones cognitivas. Los ratones con genes inactivados con la inactivación dirigida de la expresión de alfa-sinucleína muestran aprendizaje espacial y memoria de trabajo deteriorados.
- La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común en los Estados Unidos.
- 40 Los síntomas motores predominantes de la EP, incluidos el movimiento lento, temblor en reposo, rigidez y alteración de la marcha, son causados por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN). Aunque la etiología de la EP sigue siendo desconocida, parece que tanto los factores genéticos como los ambientales desempeñan una función (Vila, M. y Przedborski, S. (2004). *Nat. Med.*, 10 Suppl, S58-S62).
- La disfunción cognitiva en la enfermedad de Parkinson (EP) es un síntoma no motor prominente en la EP, que contribuye en gran medida a la morbilidad y mortalidad en esta enfermedad. Las etiologías de las alteraciones cognitivas en los pacientes con EP son heterogéneas e incluyen disfunciones ejecutivas, confusión mental y, muy a menudo, se ponen de manifiesto en la demencia, que afecta hasta al 80% de los pacientes. En consecuencia, incluso los cambios estructurales que conducen a la demencia en la enfermedad de Parkinson no son equivalentes y difieren claramente de los cambios estructurales del cerebro en la enfermedad de Alzheimer.
- 45 Varios estudios han mostrado una asociación entre el número de cuerpos de Lewy corticales y la demencia (Hurtig H.I et al., 2000, *Neurology* 54 (10): 1916-1921; Aarsland, D. et al., 2005, *Mov Disord* 20: 1255-1263).
- Entre las estrategias para tratar las sinucleinopatías se encuentran los compuestos que inhiben la agregación de alfa-sinucleína. Se ha mostrado que la molécula pequeña cuminaldehído inhibe la fibrilación de la alfa-sinucleína.
- Los tratamientos farmacéuticos actuales para la enfermedad de Parkinson se centran en agentes dopaminérgicos,

que imitan la dopamina o aumentan los niveles de dopamina en el cuerpo. La terapia más común es la levodopa, que es un precursor metabólico de la dopamina. Sin embargo, la terapia con levodopa a largo plazo suele ir acompañada de discinesias, que son movimientos repentinos e involuntarios.

Se ha descrito que extractos de *Withania somnifera*, *Emblica officinalis* y *Bacopa monnieri* muestran actividad anti-angiogénica. Se han descrito composiciones que comprenden estos extractos, y en particular extractos de *Withania somnifera* en los documentos JP 2013 001666, WO 2014/025905, WO 2011/114350 y WO 2010/013254. En un principio, estas plantas se han descrito como potenciales compuestos terapéuticos en varias enfermedades neurodegenerativas debido a su efecto no tóxico observado en ratas y ratones (Kulkarni S.K. y Dhir A., 2008, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biological Psychiatry* 32: 1093-1105). Sin embargo, los extractos de estas plantas no se utilizaron en seres humanos debido a la alta toxicidad relacionada con la obtención de los extractos y, en particular, el extracto de *Withania somnifera*.

Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que, al afectar a la toxicidad de los extractos de la planta *Withania somnifera* combinando una etapa de extracción y una etapa de fermentación utilizando hongos filamentosos, es posible utilizar el extracto desintoxicado para tratar la EP y la demencia con cuerpos de Lewy, también conocida como demencia por cuerpos de Lewy. Dicho extracto desintoxicado de *Withania somnifera* se ha descrito, por ejemplo, en la publicación internacional WO 2014/202469.

Por tanto, el objeto de la invención es utilizar una composición atóxica basada en extractos de *Withania somnifera*, para prevenir, tratar o retrasar la progresión de la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis.

Otros objetos, características, aspectos y ventajas de la invención aparecerán más claramente al leer la descripción y los ejemplos que siguen:

Figura 1: Efecto de 6-OHDA (20 μ M, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 1 hora antes de 6-OHDA (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin 6-OHDA). * $p < 0,05$ frente a 6-OHDA (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 2: Efecto de 6-OHDA (20 μ M, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 4 horas después de 6-OHDA (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin 6-OHDA). * $p < 0,05$ frente a 6-OHDA (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 3: Efecto de 6-OHDA (20 μ M, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 8 horas después de 6-OHDA (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin 6-OHDA). * $p < 0,05$ frente a 6-OHDA (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 4: Efecto de 6-OHDA (20 μ M, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 12 horas después de 6-OHDA (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin 6-OHDA). * $p < 0,05$ frente a 6-OHDA (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 5: Efecto de MPP⁺ (4 μ M, 48 horas) en presencia o ausencia de extracto de planta WEB-2 o BDNF (50 ng/ml) en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin MPP⁺). # $p < 0,05$ Control frente a grupo de MPP⁺; * $p < 0,05$ frente a MPP⁺ (ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett).

Figura 6: Efecto de MPP⁺ (4 μ M, 48 horas) en presencia o ausencia de WEB-1 (diferentes concentraciones) en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin MPP⁺). * $p < 0,05$ frente a condiciones de MPP⁺ (ANOVA de una vía seguida de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 7: Efecto de MPP⁺ (4 μ M, 48 horas) en presencia o ausencia de BE-2 (diferentes concentraciones) en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin MPP⁺). * $p < 0,05$ frente a condiciones de MPP⁺ (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 8: Efecto de rotenona (10 nM, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 1 hora antes de la rotenona (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin rotenona). * $p < 0,05$ frente a rotenona (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 9: Efecto de rotenona (10 nM, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 4 horas después de la rotenona (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin

rotenona). * p <0,05 frente a rotenona (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 10: Efecto de rotenona (10 nM, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 8 horas después de la rotenona (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin rotenona). * p <0,05 frente a rotenona (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

Figura 11: Efecto de rotenona (10 nM, 24 horas) en presencia o ausencia de WEB-2 a las 12 horas después de la rotenona (diferentes concentraciones) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas TH positivas de cultivo mesencefálico primario. Los datos se expresaron como porcentaje del control como media $\pm$ SEM (100% = sin rotenona). * p <0,05 frente a rotenona (ANOVA de una vía seguido de la prueba PLSD de Fisher).

- 10 La invención se dirige al uso de una composición que contiene un extracto de *Withania somnifera* para su uso para prevenir, tratar o retrasar la progresión de la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Preferiblemente, el extracto de *Withania somnifera* se ha fermentado mediante su incubación con un hongo filamentoso en un ambiente adecuado.

- 15 La planta *Withania somnifera* se obtiene de la India. La raíz de esta planta es comercializada por Alp Erbo (Marsella).

El procedimiento de producción de extractos según la invención se puede encontrar en la publicación internacional WO 2014/202469. Brevemente, las plantas se fermentan en presencia de un hongo filamentoso de la familia *Cordycipitaceae*, preferiblemente el género *Beauveria*. Más preferiblemente, el hongo filamentoso se obtiene de la cepa *Beauveria bassiana*, más particularmente de la cepa que tiene la referencia ATCC 7159.

- 20 La fermentación controlada desintoxica el extracto de *Withania Somnifera* mediante una serie de biocatálisis de diversas moléculas contenidas en este extracto y, más particularmente, de la familia química de agliconas de withanólidos, las sustancias principalmente responsables de la toxicidad del extracto.

El término "desintoxicación" se usa para referirse a la eliminación por el microorganismo de moléculas potencialmente tóxicas en el medio.

- 25 Preferiblemente, después de la fermentación, filtración, el medio se somete luego a etapas de esterilización, preferiblemente por ultrafiltración, con el fin de obtener la solución que constituye el extracto vegetal.

El extracto vegetal de la invención contiene *Withania somnifera* pero también puede contener al menos uno de los siguientes extractos *Emblica officinalis*, originaria de la India y comercializada por Infrag, Bangalore), *Bacopa monnieri* (India) comercializada por Alp Erbo (Marsella), *Punica granatum* (China) (Shanghai Brightol International Co, Ltd (Shanghai), *Curcuma longa* (India) (Omnipharm, Chambéry), *Piper longum* (Tailandia) (Omnipharm, Chambéry), o *Calendula officinalis* (China) (Shanghai Brightol International Co, Ltd (Shanghai), utilizando el mismo procedimiento), mediante etapas de extracción independientes para cada extracto vegetal utilizado en la realización de dicho preparado.

- 35 Ventajosamente, la composición utilizada en esta invención incluye, en peso, entre 5 y 100 g/l de *Withania somnifera*, preferiblemente 20 g/l. Preferiblemente, esta composición también incluye uno de los siguientes extractos, expresado en peso:

- entre 5 y 100 g/l de *Emblica officinalis*, preferiblemente 15 g/l,
- entre 5 y 100 g/l de *Bacopa monnieri*, preferiblemente 15 g/l,
- entre 5 y 50 g/l de *Punica granatum*, preferiblemente 10 g/l,
- entre 5 y 250 g/l de *Curcuma longa*, preferiblemente 20 g/l,
- 40 - entre 20 y 50 mg/l de *Piper longum*, preferiblemente 30 mg/l,
- entre 5 y 50 g/l de *Calendula officinalis*, preferiblemente 10 g/l,

Preferiblemente, la composición utilizada en esta invención comprende un extracto de las plantas *Withania somnifera*, *Emblica officinalis* y *Bacopa monnieri*. Más preferiblemente, la composición según la invención comprende una cantidad en peso de *Withania somnifera* en una concentración de 20 g/l, de *Emblica officinalis* en una concentración de 15 g/l y de *Bacopa monnieri* en una concentración de 15 g/l.

- 45 Las composiciones según la invención se utilizan para tratar o prevenir la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis.

Los deterioros motores o deterioros de la función motora que pueden tratarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación: deterioros generales de movilidad, dificultades para caminar, deterioros de la marcha (p. ej., congelación de la marcha), aceleración no deseada de la marcha, inestabilidad postural,

- 50

- postura encorvada, aumento de las caídas, distonía, discinesia, temblor, rigidez, bradicinesia, micrografía, deterioro de la destreza, deterioro de la coordinación motora, disminución del balanceo del brazo, acatisia, deterioro del habla, dificultad para tragar, disfunción sexual, calambres y babeo. En algunas realizaciones, el deterioro motor tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es discinesia, distonía o fluctuación motora. En otras realizaciones, el deterioro motor es temblor, bradicinesia o rigidez. En ciertas realizaciones, el deterioro motor tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es un deterioro en la movilidad general. En algunas realizaciones, el deterioro motor o el deterioro general de movilidad tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es un deterioro para caminar. En una realización, el deterioro para caminar tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es una disminución en la velocidad de la marcha. En otra realización más, el deterioro para caminar tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es la aceleración no deseada al caminar. En algunas realizaciones, el deterioro motor tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es un aumento de las caídas. En determinadas realizaciones, el deterioro motor tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es un deterioro del equilibrio, tal como inestabilidad postural o desequilibrio postural.
- En algunas realizaciones, existe un método para tratar la enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewis en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad terapéutica de una composición de extracto vegetal, de modo que se trata o previene dicha enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewis en un sujeto, en donde dicha composición contiene un extracto vegetal de *Withania somnifera*.
- La invención proporciona el uso en un método de tratamiento de pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson (EP). En particular, la invención proporciona el tratamiento de una o más deficiencias asociadas con la EP en un paciente con EP.
- En algunas realizaciones, el método previene, trata o retrasa la progresión de la demencia asociada con la EP en un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.
- La composición según la invención se formula para administración oral o parenteral.
- Un experto en la técnica de la formulación farmacéutica implementará las diversas formas útiles para la administración de las composiciones y/o suplementos de la invención. Las composiciones pueden estar en forma líquida, gel, emulsión, sólida o inyectable.
- La composición utilizada puede incluir adicionalmente suspensiones, emulsiones, jarabes que contengan diluyentes inertes usados convencionalmente y posiblemente otras sustancias tales como agentes humectantes, edulcorantes, conservantes, espesantes, colorantes o cualquier otra sustancia conocida por un experto en la técnica adecuada para administración oral, en particular ((sorbato de sodio (E201) (Sigma-Aldrich), antocianina (E163) (FBC Industries, EE.UU.), metabisulfito de sodio (E223) (Sigma-Aldrich), alfa-tocoferol (E307) (FBC Industries, EE.UU.).
- La composición utilizada también puede comprender disolventes u otros excipientes tales como agua, propilenglicol, aceites vegetales u otros disolventes orgánicos adecuados.
- El término "excipiente" se usa para referirse a cualquier compuesto que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de la composición según la invención y que no sea tóxico para el hospedante al que se administra.
- La composición utilizada también puede contener adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes de isotonicidad, emulsionantes, sales o cualquier otra sustancia conocida por un experto en la técnica que pueda usarse como adyuvantes (polidimetilsiloxano, poli(alcohol vinílico) (PVA), hidrogeles (Carbopol), polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC), poloxámero 188, EDTA, clorobutanol) (Lubrizol, Francia, Dow Corning, EE.UU.).
- De manera ventajosa, la composición puede comprender otras sustancias tales como vitaminas, sales minerales, un vector farmacéuticamente aceptable, estabilizantes, antioxidantes o cualquier otra sustancia conocida por un experto en la técnica y destinada a integrarse en un fármaco.
- Preferiblemente, la composición es líquida, administrable por vía oral y contiene al menos un extracto no tóxico de *Whitania somnifera*, algunos conservantes, vitaminas, agua y sal.
- Más preferiblemente, los conservantes son sorbato o benzoato de potasio. La vitamina puede ser riboflavina (vitamina B2).
- La composición terapéutica utilizada en el método de la invención se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usa para referirse a cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de la composición según la invención y que no sea tóxico para el hospedante al que se administra.
- La composición obtenida es utilizable como medicamento para un mamífero, y más particularmente para seres humanos, para ayudar en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis.

La expresión "especialidad farmacéutica" se usa para referirse a un producto que contiene una dosis exacta de dicho preparado según la directiva europea 65/65/EC, es decir, cualquier sustancia o composición descrita como que tiene propiedades curativas o preventivas con respecto a enfermedades humanas o animales. Por ejemplo, la especialidad farmacéutica que contiene dicho preparado en dosis terapéuticas se puede administrar por vía oral como una cápsula o comprimido, o inyectar por cualquier otra vía para conferir los efectos beneficiosos.

Una dosis apropiada de la composición terapéutica puede ser determinada por un experto en la técnica, teniendo en cuenta los hallazgos descritos en el presente documento junto con factores típicos tales como la masa corporal del paciente, el estado físico del paciente, etc. La dosis debe contener la composición terapéutica en una cantidad que sea eficaz para tratar la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewis.

El fármaco se puede administrar diariamente, semanalmente o de forma intermitente. Por ejemplo, el fármaco puede administrarse durante tres meses, seguido de un mes de descanso, o durante un mes, seguido de una semana de descanso, o según pautas posológicas que pueden determinar los expertos en la materia.

La dosis particular seleccionada dependerá del modo de administración y la pauta posológica seleccionada. Una pauta preferida es una pauta posológica oral una vez al día. Cuando se prescriben periodos de tiempo más prolongados entre cada aplicación (típicamente el caso de la administración i.v), cada dosis unitaria puede ser mayor que cuando se proporcionan dosis diarias.

La dosis diaria de las composiciones utilizadas puede variar según las necesidades y gravedad de los síntomas del paciente y según la vía. Por lo general, la dosis diaria es entre 10 mg/ml y 300 mg/ml de la solución después de fermentación.

Preferiblemente, la dosis diaria para un ser humano adulto es entre 30 y 100 mg/ml de la solución después de fermentación.

La presente invención se explicará con más detalle a continuación mediante ejemplos no limitantes, que hacen referencia a los dibujos adjuntos. Los siguientes métodos se utilizaron en los experimentos descritos en los ejemplos que siguen a la descripción de los métodos.

Ejemplo 1: Composición WEB-1 antes de fermentación

La composición WEB-1 contiene un extracto comercial de *Withania Somnifera* en una concentración de 20 g/l, de *Embllica officinalis* en una concentración de 15 g/l, de *Bacopa monnieri* en una concentración de 15 g/l.

Se prepara una solución de 100 ml en agua. Después de la liofilización se obtienen 3,8 g de un polvo beige.

Ejemplo 2: Cepa de hongo filamentoso *Beauveria bassiana*

La cepa *Beauveria Bassiana* (referencia ATCC 7159) se ha cultivado en un medio que contiene KH_2PO_4 0,5 g/l; KH_2PO_4 1 g/l; MgSO_4 1 g/l; NaNO_3 2 g/l; KCl 0,5 g/l; FeSO_4 0,02 g/l; glucosa 30 g/l (todos los reactivos de Sigma-Aldrich, Francia) y 10 g/l de licor de maceración de maíz (Roquette, Francia).

A continuación, el cultivo se agitó a 200 rotaciones por minuto, durante 72 horas a 27°C. Luego se filtró por métodos no estériles sobre un papel de filtro para separar la biomasa fúngica del medio de cultivo. Después, la biomasa fúngica se lavó completamente con agua.

Ejemplo 3: Composición WEB-2 utilizada en la invención

La composición WEB-1 como en el ejemplo 1 se añade a la biomasa fúngica reciente del ejemplo 2 utilizando 60 g de biomasa por litro de composición WEB-1 que contiene 50 g de glucosa.

Después de la incubación, esta composición sembrada se agitó a 200 rpm durante 5 días a una temperatura de 27°C.

Después de 5 días, el medio de incubación se filtró sobre un papel de filtro, las muestras para el ensayo de HPLC también se filtraron usando un filtro de 0,45 micrómetros (Ait-France, ref: SFNY 013045N).

Se obtuvo la solución parduzca que luego se liofilizó durante 5 días para producir un polvo beige seco.

Ejemplo 4: Composición WE-2 utilizada en la invención

La composición WE-1 contiene un extracto comercial de *Withania Somnifera* en una concentración de 20 g/l, y de *Embllica officinalis* en una concentración de 15 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 4,13 g de un polvo beige.

Los marcadores identificados en la composición WE-2 fueron withanósido IV, withanósido VI y ácido gálico.

Ejemplo 5: Composición WB-2 utilizada en la invención

La composición WB-1 contiene un extracto de *Withania Somnifera* en una concentración de 20 g/l, y de *Bacopa Monnieri* en una concentración de 15 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

- 5 Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 2,62 g de un polvo beige.

Los marcadores identificados en la composición WB-2 fueron withanósido IV, withanósido VI, bacósido A3, bacopasido X y bacopasaponina C.

Ejemplo 6: Composición BE-2 utilizada en la invención

- 10 La composición BE-2 contiene un extracto de *Bacopa Monnieri* en una concentración de 15 g/l, y de *Emblica officinalis* en una concentración de 15 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 2,62 g de un polvo beige.

Los marcadores identificados en la composición BE-2 fueron bacopasido X, bacopasaponina C y ácido gálico.

Ejemplo 7: Composición WEB-4 según la invención

- 15 La composición WBE-4 contiene un extracto de *Withania Somnifera* en una concentración de 40 g/l, de *Bacopa Monnieri* en una concentración de 15 g/l, y de *Emblica officinalis* en una concentración de 15 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 4,23 g de un polvo beige.

Ejemplo 8: Composición WEB-6 utilizada en la invención

- 20 La composición WEB-6 contiene un extracto de *Withania Somnifera* en una concentración de 20 g/l, de *Bacopa Monnieri* en una concentración de 15 g/l, y de *Emblica officinalis* en una concentración de 30 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 4,22 g de un polvo beige.

Ejemplo 9: Composición WEB-8 utilizada en la invención

- 25 La composición WEB-8 contiene un extracto de *Withania Somnifera* en una concentración de 20 g/l, de *Bacopa Monnieri* en una concentración de 30 g/l, y de *Emblica officinalis* en una concentración de 15 g/l.

A 100 ml de dicha solución, se añaden 5 g de glucosa y 6 g de biomasa del ejemplo 2.

Después de haber tratado y liofilizado la solución como en el ejemplo 3, se obtienen 3,76 g de un polvo beige.

Ejemplo 10: Efecto neuroprotector tras la exposición a 6OHDA

- 30 Este estudio investigaba el efecto neuroprotector del extracto vegetal de la invención en cultivos mesencefálicos primarios de rata después de la exposición a 6OHDA.

Los estudios epidemiológicos sugieren que el uso de plaguicidas aumenta el riesgo de EP, posiblemente a través de la actividad reducida del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial en la sustancia negra y da lugar a la patogenia de la EP. La 6-hidroxidopamina (6-OHDA), un prooxidante H₂O₂, un catabolito dopaminérgico natural que se acumula en los cerebros afectados por la enfermedad de Parkinson, parece que contribuye en gran medida a esta patología (Giordano S, et al., *PLoS One*. 2012; 7 (9)).

- 35 a) Cultivo de neuronas mesencefálicas

Se cultivaron neuronas dopaminérgicas de rata como describe Schinelli et al., 1988 (Visanji et al., 2008 *FASEB J.* 2008; 22 (7): 2488-97. Brevemente, los mesencéfalos obtenidos de embriones de rata de 15 días (Janvier Labs, Francia) se diseccionaron al microscopio. Se extrajeron los mesencéfalos embrionarios y se pusieron en medio helado de Leibovitz (L15, Lote 4290114, Pan Biotech, Alemania) que contenía 2% de penicilina-estreptomicina (PS, Lote 1451013, Pan Biotech) y 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Lote K030913, Pan Biotech). Se utilizó la porción ventral de la curvatura mesencefálica, una región del cerebro en desarrollo rica en neuronas dopaminérgicas, para las preparaciones celulares.

Los mesencéfalos se disociaron por tripsinización durante 20 min a 37°C (tripsina al 0,05%, EDTA al 0,02% (lote

7310713, PanBiotech). La reacción se detuvo por la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, lote 9710913, PanBiotech) que contenía ADNasa I grado II (0,1 mg/ml, Lote H131108, PanBiotech) y 10% de suero fetal bovino (FCS, Lote 41Q7218K, Gibco). Luego, las células se disociaron mecánicamente por 3 pasos a través de una pipeta de 10 ml. Después las células se centrifugaron a 180xg durante 10 min a +4°C sobre una capa de BSA (3,5%) en medio L15. El líquido sobrenadante se descartó y los sedimentos celulares se resuspendieron en un medio de cultivo definido que consistía en Neurobasal (Lote 1576979, Invitrogen, Francia) suplementado con 2% de B27 (Lote 1589889, Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Lote 8150713, PanBiotech), 2% de solución de PS, 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (Lote H140108, PanBiotech,) y 1 ng/ml de factor neurotrófico derivado de la glía (Lote H130917, Pan Biotech). Se contaron las células viables en un citómetro Neubauer utilizando la prueba de exclusión de azul tripán. Las células se sembraron en medio Neurobasal suplementado a una densidad de 40000 células/pocillo en placas de 96 pocillos prerrevestidas con poli-L-lisina (lote 3102256, Corning Biocoat) y se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C en 5% de CO₂/95% de atmósfera de aire. La mitad del medio se cambió cada 2 días con medio de nueva aportación.

El día 6 de cultivo, se retiró el medio y se añadió medio de nueva aportación, sin o con 6-OHDA (Sigma, Lote: 083M4624V) a 20 µM diluido en medio de control, se evaluaron 6 pocillos por condición.

b) Exposición a 6-OHDA

El día 6 de cultivo, el extracto vegetal WEB-2 del ejemplo 1 (50, 5 mg/ml, 500, 50, 5 µg/ml y 500 ng/ml) se diluyó en medio de cultivo y luego se preincubó con neuronas mesencefálicas durante 1 hora antes de la aplicación de 6-OHDA o 4, 8 o 12 horas después de la aplicación de 6-OHDA. Se añadió una solución de 6OHDA hasta una concentración final de 20 µM diluida en medio de control.

c) Inmunotinción

Después de 24 horas, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% (Lote SLBF7274V, Sigma) en PBS (Lote 7560414, PanBiotech), pH = 7,3 durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron de nuevo dos veces en PBS, se permeabilizaron y los sitios no específicos se bloquearon con una solución de PBS que contenía 0,1% de saponina (Lote BCBJ8417V, Sigma, Francia) y 1% de FCS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa producido en ratón (Lote 101M4796, Sigma) en una dilución de 1/10000 en PBS que contenía FCS al 1%, saponina al 0,1%, durante 2 horas a temperatura ambiente. Este anticuerpo se reveló con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (lote 1397999, Molecular probe, Francia) en la dilución 1/800 en PBS que contenía FCS al 1%, saponina al 0,1%, durante 1 h a temperatura ambiente.

La tirosina hidroxilasa (TH) está implicada en la conversión de fenilalanina en dopamina. Como enzima limitante de la velocidad en la síntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa tiene un papel clave en la fisiología de las neuronas adrenérgicas y se usa regularmente como marcador para neuronas dopaminérgicas.

d. Resultados

Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (Molecular Devices, Reino Unido) equipado con un LED con 10 aumentos. Para cada condición (6 pocillos de cultivo), se analizaron automáticamente 20 campos por pocillo (que representan ~80% de la superficie total del pocillo). El número total de neuronas TH se analizó automáticamente utilizando el software MetaXpress (Molecular Devices).

Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin MPP⁺ = 100%) para expresar la lesión por MPP⁺. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (s.e. de la media) de los 6 pocillos con análisis estadísticos en las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando se permitió, usando el software GraphPad Prism).

La 6-OHDA (20 µM - 24 h) inducía una muerte celular significativa (> 25%). Con WEB-2 preincubado 1 h antes de la aplicación de 6-OHDA, se observó un efecto protector significativo completo (100% de supervivencia) para la dosis de 500 ng/ml. La dosis más alta (1 µg/ml) inducía un efecto protector significativo (en 86%). El efecto desapareció progresivamente con la dosis, en la concentración más alta (500 µg/ml) WEB-2 se volvió tóxico. La dosis más baja (100 ng/ml) no mostró ningún efecto sobre las neuronas TH positivas (Fig. 1).

WEB-2 añadido 4 h después de la aplicación de 6-OHDA, revirtió totalmente el efecto nocivo de 6-OHDA (5 µg/ml), se observó un efecto protector significativo (~100% de supervivencia). Las dosis de 100 y 500 µg/ml de WEB-2 son tóxicas. Las concentraciones más bajas (entre 100 ng/ml hasta 1 µg/ml) no mostraron ningún efecto protector (Fig. 2).

WEB-2 añadido 8 h después de la aplicación de la toxina mostró un efecto protector (~100% de supervivencia para 5 µg/ml), 10 µg/ml era eficiente. Las 2 dosis más altas eran tóxicas (Fig. 3).

Añadido 12 h después de la aplicación de 6-OHDA, WEB-2 aún podía proteger a las neuronas de la muerte (todavía con 5 µg/ml). En este procedimiento (12 h después de la aplicación de 6-OHDA) solo las dosis más altas mostraron toxicidad (500 µg/ml). Todas las demás dosis eran inactivas (Fig. 4).

e) Conclusión

- La 6-OHDA (20 μ M - 24 h) aplicada sobre cultivo mesencefálico primario inducía una muerte significativa de neuronas TH positivas (neuronas dopaminérgicas).

- WEB-2 era activo y protegía a las neuronas dopaminérgicas de la lesión inducida por 6-OHDA.

5 - WEB-2 cuando se añadía en preincubación protege a las neuronas en las concentraciones de 500 ng/ml y 1 μ g/ml; y mostraba toxicidad en las dosis más altas (500 μ g/ml)

- Por el contrario, cuando se añadía algunas horas después de la 6-OHDA, cuando la toxina ya había comenzado a mostrar su efecto tóxico sobre las mitocondrias, WEB-2 revertía los daños en la dosis más alta: 5 μ g/ml.

10 - El intervalo de las dosis más activas de WEB-2 parecía comenzar en 500 μ g/ml (cuando se añade en prevención) y en 5 μ g/ml cuando se añade después de que ocurrieran daños.

Ejemplo 11: Efecto neuroprotector tras la exposición a MPP+

Este estudio investigaba el efecto neuroprotector del extracto vegetal de la invención en cultivos mesencefálicos primarios de rata después de la exposición a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+).

15 La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) neurotóxica es una toxina neuronal dopaminérgica específica. MPTP es convertida en MPP+ por la astrogliá y luego produce muerte neuronal dopaminérgica específica en la SN, lo que lleva a los síntomas clínicos de la EP en seres humanos, primates y ratones ((Visanji et al., 2008 *FASEB J.* 2008; 22 (7): 2488-97, Giordano S, et al., *PLoS One.* 2012; 7 (9)). El MPP+ entra selectivamente en las neuronas de dopamina a través del transportador de dopamina y también bloquea el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

En dicho ensayo, se usó factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) como molécula de referencia.

20 a) Cultivo de neuronas mesencefálicas

Las neuronas mesencefálicas se cultivaron como en el ejemplo anterior.

El día 6 de cultivo, se retiró el medio y se añadió medio de nueva aportación, sin o con MPP+ (Lote 092M4729V, Sigma, Francia) 4 μ M diluido en medio de control. Se evaluaron 6 pocillos por condición.

b) Exposición a MPP+

25 El día 6 de cultivo, el extracto vegetal WEB-2 (500 ng/ml, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml y 1 mg/ml) se disolvió en medio de cultivo y luego se preincubó con neuronas mesencefálicas primarias durante 1 hora antes de la aplicación de MPP+. La solución de MPP+ se añadió en una concentración final de 4 μ M diluida en medio de control en presencia de WEB-2 y se ensayó después de 48 h en un cultivo primario en placas de 96 pocillos (6 pocillos por condiciones).

a) Inmunotinción

30 Las células se fijaron, lavaron, permeabilizaron y se bloquearon los sitios no específicos. Luego, las células se incubaron con anti-tirosina hidroxilasa monoclonal y se revelaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 como en el ejemplo 10.

b) Resultados

35 Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (Molecular Devices, Reino Unido) equipado con un LED con 10 aumentos. Para cada condición (6 pocillos de cultivo), se analizaron automáticamente 20 campos por pocillo (que representan ~80% de la superficie total del pocillo). El número total de neuronas TH se analizó automáticamente utilizando el software MetaXpress (Molecular Devices).

40 Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin MPP+ = 100%) con el fin de expresar la lesión por MPP+. Todos los valores se expresaron como media $\pm$ SEM (s.e. de la media) de los 6 pocillos con análisis estadísticos en las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando se permitió, usando el software GraphPad Prism).

Los resultados muestran que el MPP+ (4 μ M - 48 h) inducía una muerte celular significativa (> 35%). En presencia de la composición WEB-2 (50 μ g/ml), se observó un efecto protector significativo masivo (93% de supervivencia) (Fig. 5).

45 BDNF (50 ng/ml) usado como compuesto de referencia, podía proteger significativamente a las células de las lesiones inducidas por MPP+ pero, curiosamente, este efecto neuroprotector era mayor que el observado con el tratamiento con BDNF. Además, este efecto todavía se observaba en las dosis más bajas (5 μ g/ml y 500 ng/ml).

En las 2 concentraciones más altas (50 y 5 mg/ml), la composición WEB-2 era tóxica. Por lo tanto, el intervalo de concentraciones activas parecía alrededor de la dosis de 500 μ g/ml.

e) Conclusión

- El MPP⁺ (4 μ M - 48 h) aplicado en el cultivo mesencefálico primario inducía una muerte significativa de neuronas TH positivas (neuronas dopaminérgicas).

5 - El extracto WEB-2, ensayado en 50 μ g/ml, mostró un efecto neuroprotector importante y significativo sobre las lesiones inducidas por MPP⁺, más importante que el efecto observado con BDNF en 50 ng/ml.

- El intervalo de las dosis más activas de extracto de WEB-2 parecía comenzar en 500 μ g/ml con un efecto máximo en 50 μ g/ml.

Ejemplo 12: Ensayos de diferentes extractos de plantas

10 El objetivo de este estudio era ensayar 2 extractos diferentes (WEB-1 y BE-2 en diferentes concentraciones (500 ng/ml, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml y 1 mg/ml) en la supervivencia de neuronas positivas para TH después de una lesión por el MPP⁺.

a) Cultivo de neuronas mesencefálicas

Las neuronas mesencefálicas se cultivaron como en el ejemplo anterior.

15 El día 6 de cultivo, se retiró el medio y se añadió medio de nueva aportación, sin o con MPP⁺ (Lote 092M4729V, Sigma, Francia) 4 μ M diluido en medio de control. Se evaluaron 6 pocillos por condición.

b) Exposición a MPP⁺

20 El día 6 de cultivo, los extractos vegetales (500 ng/ml, 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml y 1 mg/ml) se disolvieron en medio de cultivo y luego se preincubaron con neuronas mesencefálicas primarias durante 1 hora antes de la aplicación de MPP⁺. La solución de MPP⁺ se añadió en una concentración final 4 μ M diluida en medio de control en presencia de extractos de plantas.

c) Inmunotinción

Las células se fijaron, lavaron, permeabilizaron y se bloquearon los sitios no específicos. Luego, las células se incubaron con anti-tirosina hidroxilasa monoclonal y se revelaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 como en el ejemplo 11.

25 d) Resultados

Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (Molecular Devices, Reino Unido) equipado con un LED con 10 aumentos. Para cada condición (6 pocillos de cultivo), se analizaron automáticamente 20 campos por pocillo (que representan ~80% de la superficie total del pozo). El número total de neuronas TH se analizó automáticamente utilizando el software MetaXpress (Molecular Devices).

30 Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin MPP⁺ = 100%) con el fin de expresar la lesión por el MPP⁺. Todos los valores se expresaron como media $\pm$ SEM (s.e. de la media) de los 6 pocillos con análisis estadísticos en las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando se permitió, usando el software GraphPad Prism).

MPP⁺ (4 μ M - 48 h) inducía una muerte celular significativa (> 30%).

35 En presencia de WEB-1 (a partir de 5 μ g/ml y las concentraciones más altas), se observó un efecto tóxico grande y significativo. Solo las 2 dosis más bajas (500 ng/ml y 1 μ g/ml) eran inactivas (Fig. 6).

La preincubación de 1 h con BE-2 inducía un efecto protector significativo contra los daños inducidos por el MPP⁺ para las dosis de 1, 5 y 10 μ g/ml. La concentración más baja era inactiva (500 ng/ml), por el contrario, por encima de 50 μ g/ml BE-2 aumentó la toxicidad de MPP⁺.

40 El efecto neuroprotector de BE-2 aumentaba con la dosis y se volvió tóxico desde la concentración de 50 μ g/ml (Fig. 7).

c) Conclusión

- El MPP⁺ (4 μ M - 48 h) aplicado en cultivo mesencefálico primario inducía una muerte significativa de neuronas TH positivas (neuronas dopaminérgicas).

- WEB-1 era inactivo en las concentraciones más bajas o tóxico para las neuronas dopaminérgicas TH.

45 - BE-2 era protector contra las lesiones inducidas por MPP⁺ con un intervalo de actividad entre 1 y 10 μ g/ml.

Ejemplo 13: Efecto neuroprotector tras la exposición a rotenona

Este estudio investigaba el efecto neuroprotector del extracto vegetal de la invención WEB-2 (pretratamiento y aplicación de reversión) en cultivos mesencefálicos primarios de rata después de la exposición a rotenona (10 nM, 24 h), un modelo de EP *in vitro*.

5 c) Cultivo de neuronas mesencefálicas

Las neuronas mesencefálicas se cultivaron como en el ejemplo anterior.

El día 6 de cultivo, se retiró el medio y se añadió medio de nueva aportación, sin o con rotenona (Lote: 021M2227V, Sigma) 10 nM diluida en medio de control, se evaluaron 6 pocillos por condición.

d) Exposición a rotenona

- 10 El día 6 de cultivo, el extracto vegetal WEB-2 (500 ng/ml, 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml y 1 mg/ml) se disolvió en medio de cultivo y luego se preincubó con neuronas mesencefálicas primarias durante 1 hora antes o 4, 8 o 12 horas después de la aplicación de rotenona. La solución de rotenona se añadió en una concentración final de 10 nM diluida en medio de control en presencia de WEB-2 y se ensayó en placas de 96 pocillos (6 pocillos por condiciones).

e) Inmunotinción

- 15 Las células se fijaron, lavaron, permeabilizaron y se bloquearon los sitios no específicos. Luego, las células se incubaron con anti-tirosina hidroxilasa monoclonal y se revelaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 como en el ejemplo 10.

- 20 La tirosina hidroxilasa está implicada en la conversión de fenilalanina en dopamina. Como enzima limitante de la velocidad en la síntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa tiene un papel clave en la fisiología de las neuronas adrenérgicas. La tirosina hidroxilasa se usa habitualmente como marcador de neuronas dopaminérgicas, lo que es particularmente relevante para la investigación de la enfermedad de Parkinson.

f) Resultados

- 25 Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (Molecular Devices) equipado con un LED con 10 aumentos. Para cada condición (6 pocillos de cultivo), se analizaron automáticamente 20 campos por pocillo (que representan ~80% de la superficie total del pocillo). El número total de neuronas TH se analizó automáticamente utilizando el software MetaXpress (Molecular Devices).

- 30 Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin rotenona = 100%) con el fin de expresar la lesión por rotenona. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (s.e. de la media) de los 6 pocillos. Neuro-Sys realizó gráficos y análisis estadísticos en las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando se permitió, utilizando el software GraphPad Prism).

La rotenona (10 nM, 24 horas) inducía una muerte celular significativa (~ 40%). Con WEB-2 preincubado 1 h antes de la aplicación de rotenona, se observó un efecto protector significativo completo (~100% de supervivencia) para la dosis de 10 µg/ml. Se observó un efecto protector igualmente significativo para 1, 5 y 50 µg/ml (Fig. 8).

Las 2 dosis más altas (100 µg/ml y 500 ng/ml) no mostraron ningún efecto sobre las neuronas TH positivas.

- 35 WEB-2 añadido 4 h después de la aplicación de rotenona, no mostró ningún efecto sobre la supervivencia de las neuronas TH. La dosis más alta (500 µg/ml) de WEB-2 era tóxica (Fig. 9).

De manera similar, WEB-2 añadido 8 h después de la aplicación de la toxina no mostró ningún efecto sobre la supervivencia (Fig. 10). La dosis más alta era tóxica. WEB-2 añadido 12 h después de la aplicación de rotenona muestra toxicidad en la dosis más alta (500 µg/ml) (Fig. 11).

- 40 Todas las demás dosis eran inactivas.

g) Conclusión

- La rotenona (10 nM - 24 h) aplicada en cultivo mesencefálico primario inducía una muerte significativa de neuronas TH positivas (neuronas dopaminérgicas).

- 45 - WEB-2 era capaz de proteger significativamente las neuronas TH positivas de las lesiones por rotenona cuando se aplicaba en un tratamiento protector (1 h antes de la aplicación de la toxina), por el contrario, añadido después de la aplicación de rotenona no se observó ningún efecto.

- WEB-2 podía proteger a las neuronas de la toxicidad de la rotenona, pero no podía revertir o detener el daño inducido por la toxina.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene un extracto de *Withania somnifera* fermentado mediante su incubación con un hongo filamentoso en un ambiente adecuado, para su uso para tratar o prevenir la enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia con cuerpos de Lewis en un mamífero, preferiblemente un ser humano.
- 5 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la fermentación se lleva a cabo con un hongo filamentoso de la familia *Cordycipitaceae*, preferiblemente del género *Beauveria* y, más particularmente, *Beauveria bassiana*.
3. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además contiene al menos un extracto de las siguientes plantas: *Embllica officinalis*, *Bacopa monnieri*, *Punica granatum*, *Curcuma longa*, *Piper longum*, o *Calendula officinalis*.
- 10 4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además contiene un extracto de *Embllica officinalis* y un extracto de *Bacopa monnieri*.
5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una cantidad en peso de *Withania somnifera* de entre 5 y 100 g/l de *Withania somnifera*, y preferiblemente 20 g/l.
- 15 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una cantidad en peso de *Withania somnifera* en una concentración de 20 g/l, de *Embllica officinalis* en una concentración de 15 g/l y de *Bacopa monnieri* en una concentración de 15 g/l.
7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para prevenir, tratar o retrasar la progresión de uno o más deterioros asociados con la EP en un paciente con EP.
- 20 8. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para prevenir, tratar o retrasar la progresión de la demencia asociada con la EP en un sujeto.
9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición se administra por vía oral o intravenosa.
10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha composición se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

FIG. 1

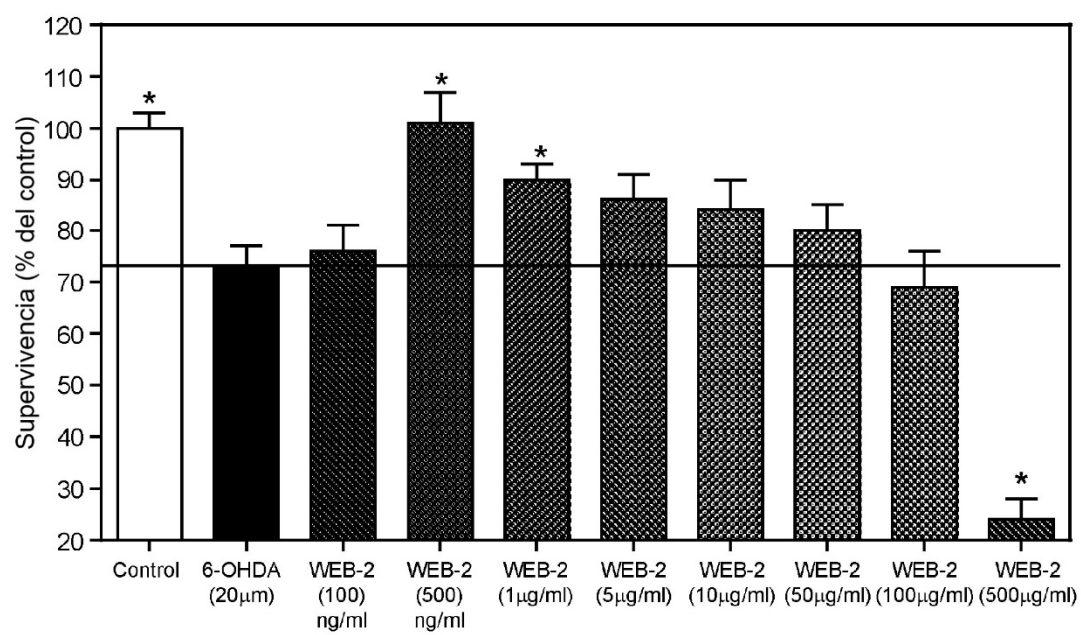


FIG. 2

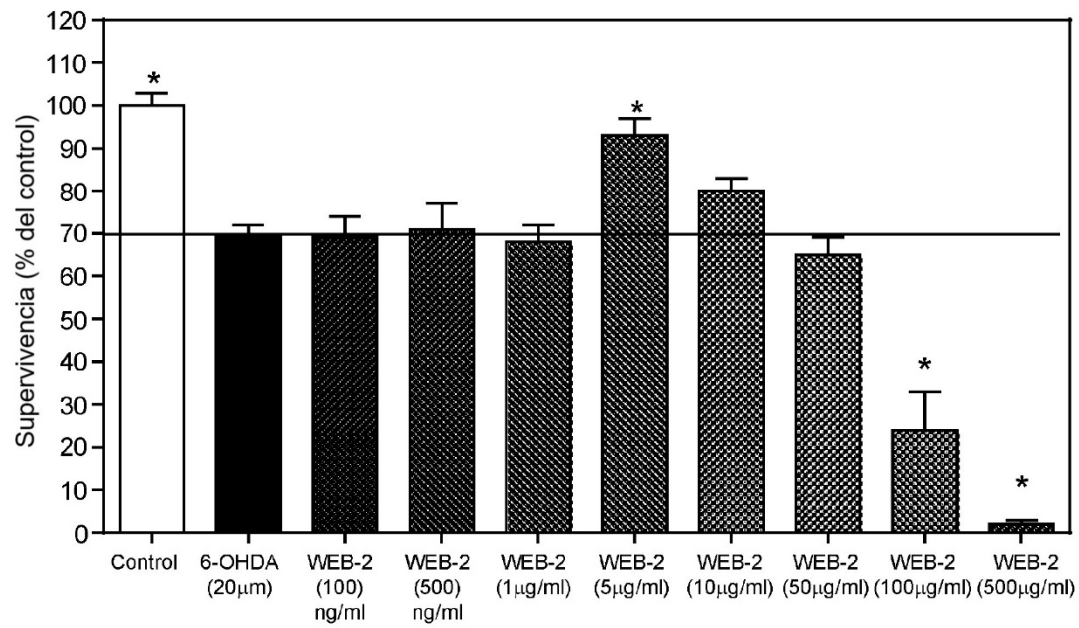


FIG. 3

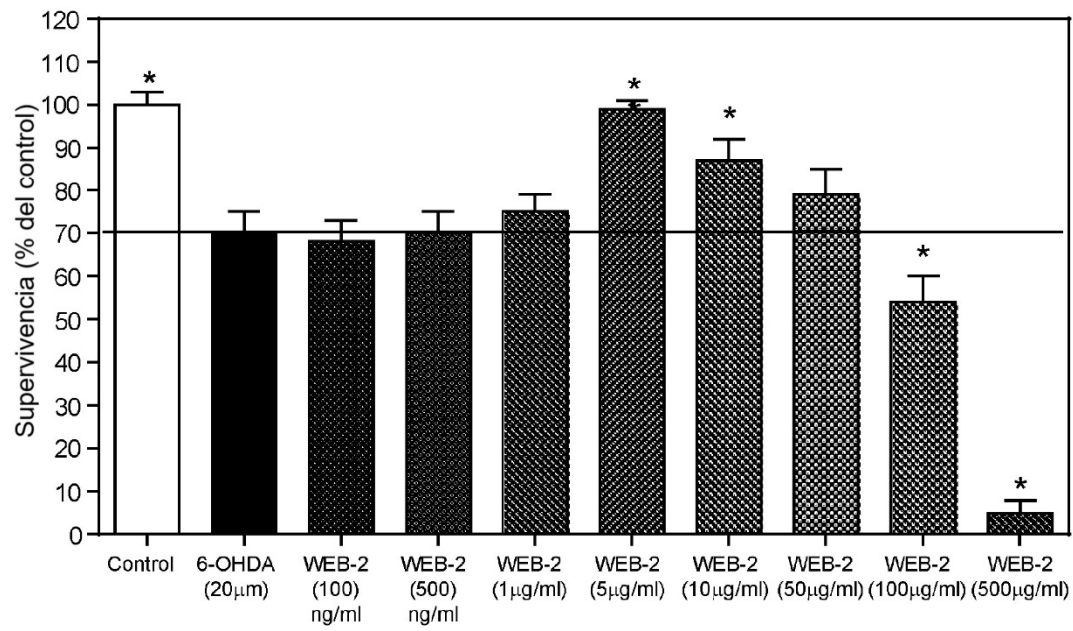


FIG. 4

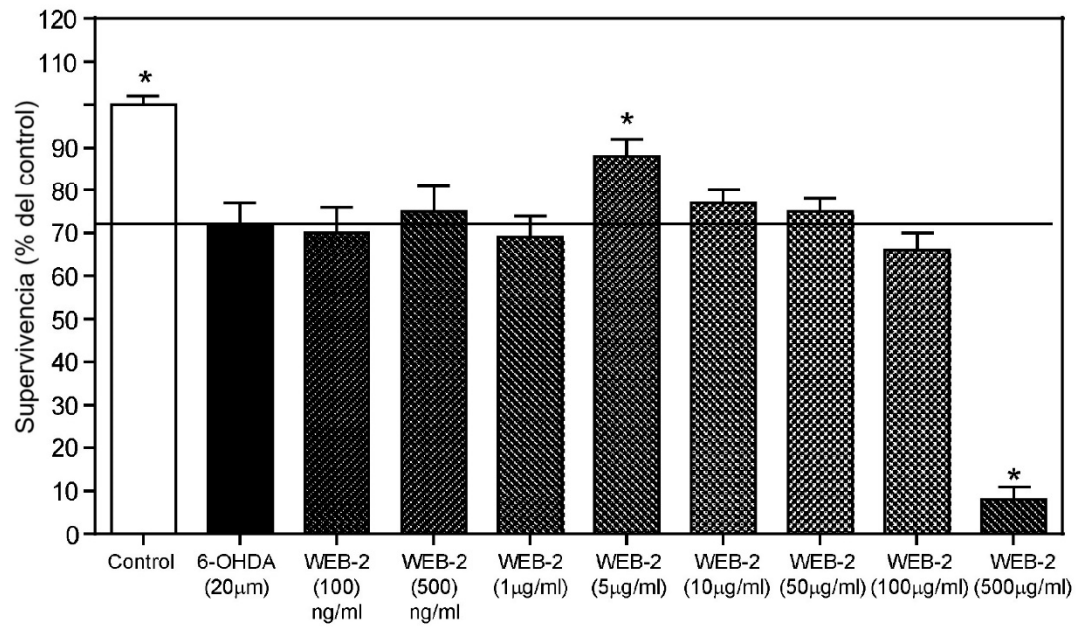


FIG. 5

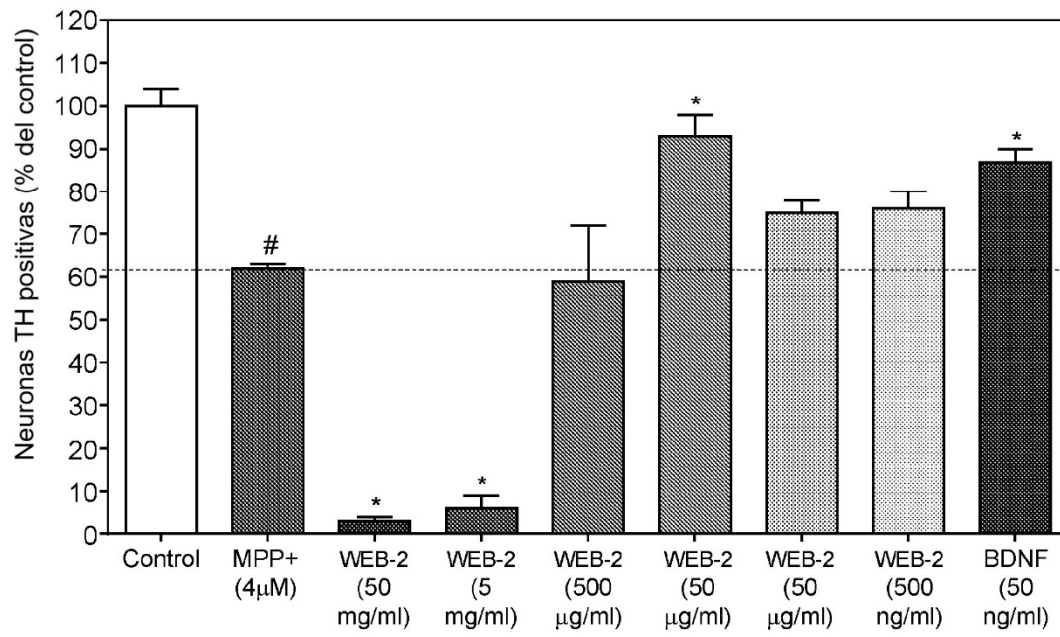


FIG. 6

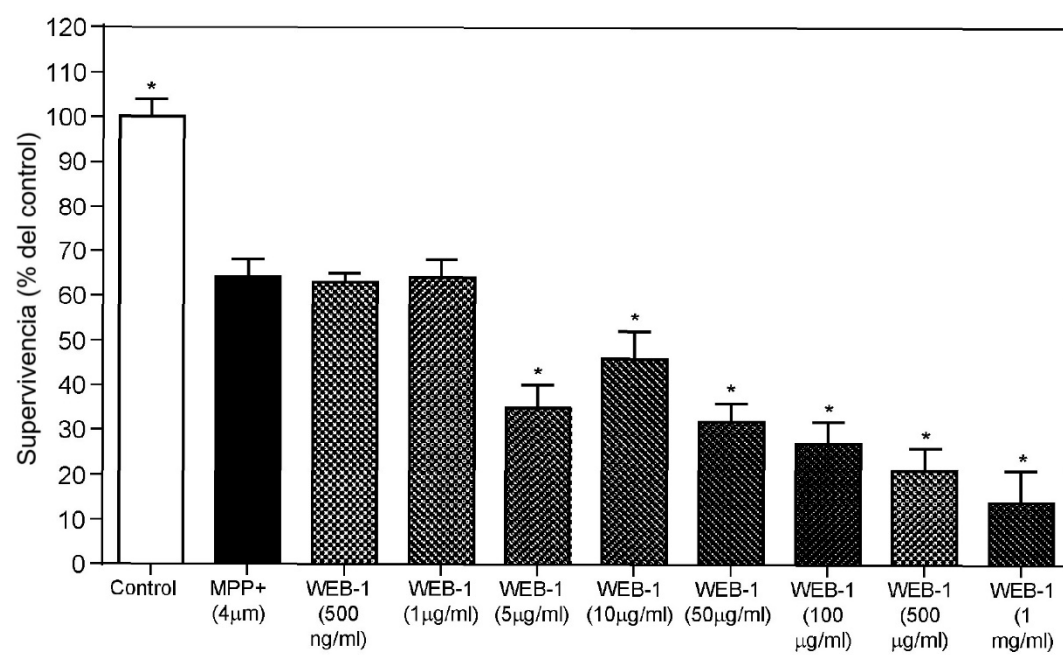


FIG. 7

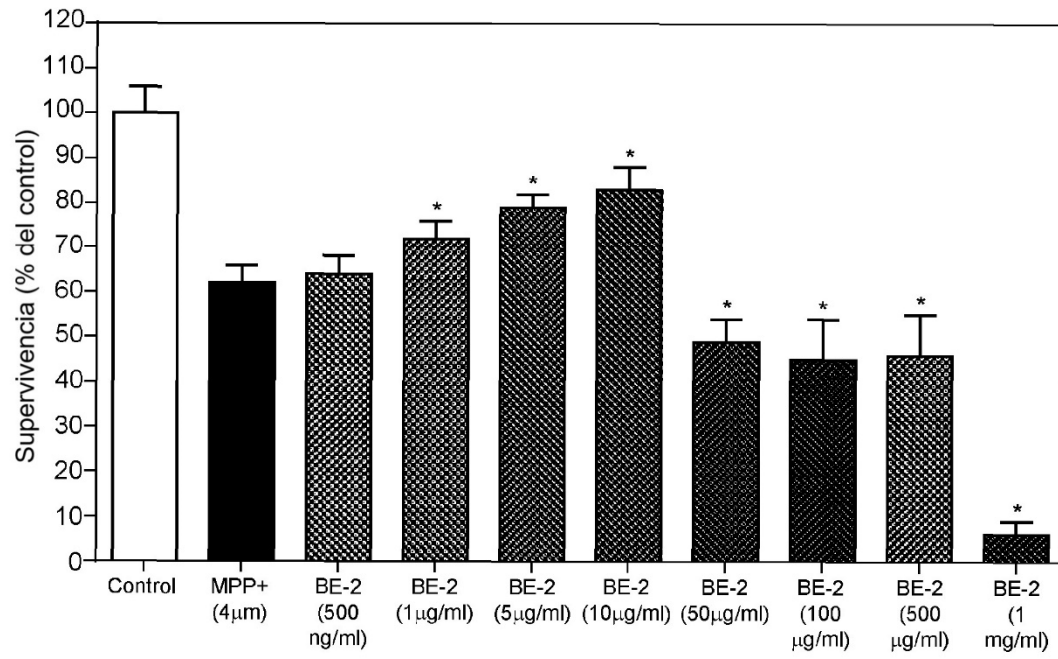


FIG. 8

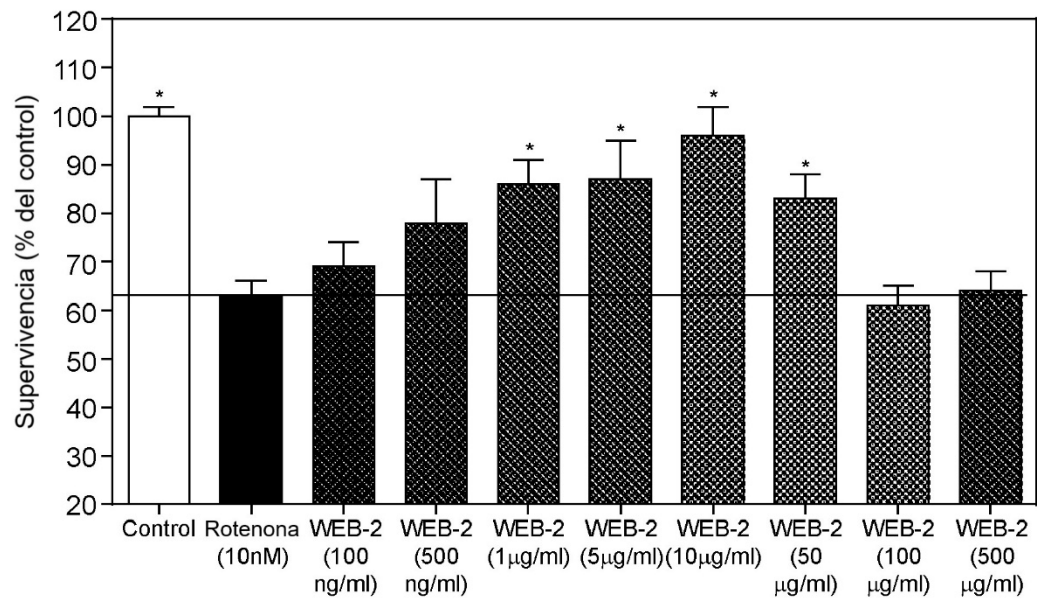


FIG. 9

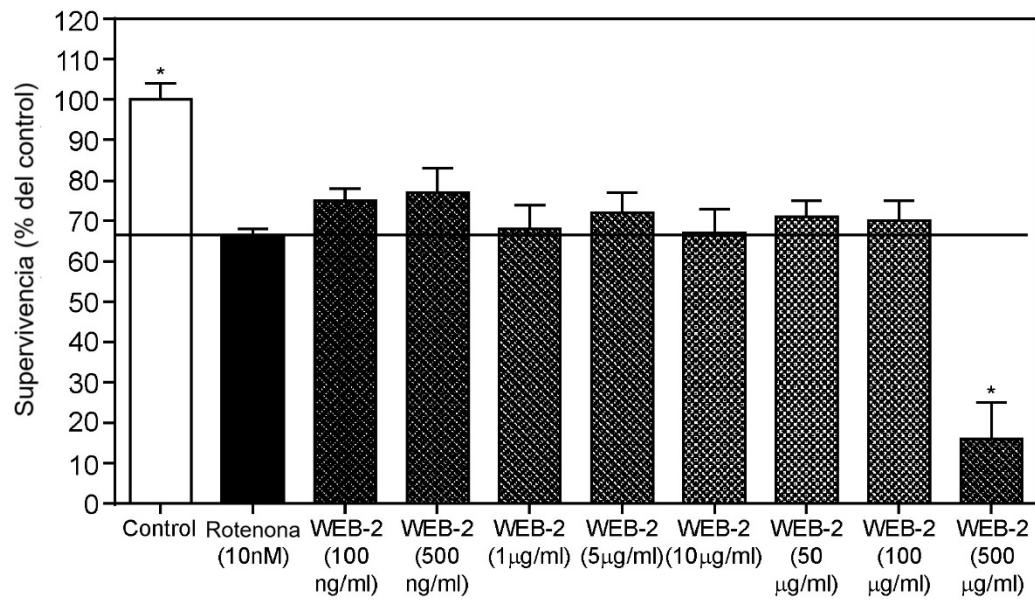


FIG. 10

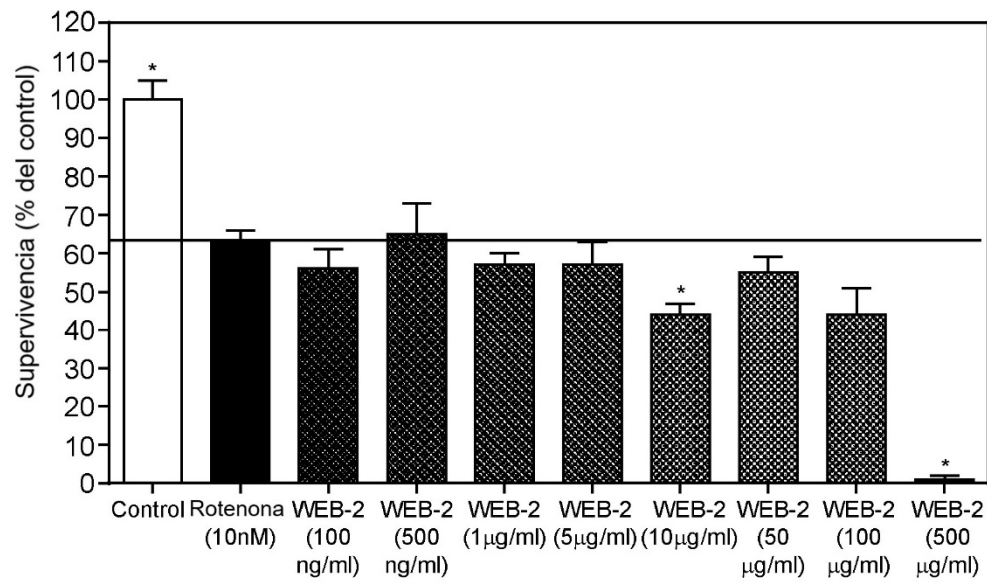


FIG. 11

