

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 101**

51 Int. Cl.:

A61K 36/537 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017 PCT/GB2017/050209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017 E 17707095 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021 EP 3407904**

54 Título: **Composiciones botánicas de *Salvia officinalis* con actividad para extender la vida acronológica y sus usos**

30 Prioridad:
27.01.2016 GB 201601520

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2022

73 Titular/es:
SIBELIUS LIMITED (100.0%)
20 East Central 127 Olympic Avenue, Milton Park,
Abingdon
Oxfordshire OX14 4SA, GB

72 Inventor/es:
LEYLAND, PETER ANTHONY;
AKOULITCHEV, ALEXANDRE;
VERSLYPE, ANTOINE y
CAIGER, STEPHEN

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 899 101 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 botánicas de *Salvia officinalis* con actividad para extender la vida cronológica y sus usos

Campo

5 La invención se refiere a composiciones que comprenden extractos de origen botánico, más en concreto de la especie de salvia *Salvia officinalis*, y dichos extractos tienen una actividad biológica definida.

Antecedentes de la invención

10 *Salvia officinalis* ha sido ampliamente utilizada en el comercio y en la medicina durante siglos, proporcionando amplias áreas de actividad y un perfil de seguridad aparentemente excepcional. Como hierba y medicina herbal, existe una larga historia de experiencia humana con *S. officinalis*. Entre el género *Salvia*, la salvia común, la especie *S. officinalis* es una de las hierbas más antiguas cultivadas y más ampliamente usada con fines medicinales, culinarios, cosméticos, sensoriales y otros, con aplicaciones registradas que se remontan al siglo I d.C. (Plinio). *S. officinalis* se utilizaba habitualmente en toda Europa en la época medieval, y aparece en los herbarios británicos desde el siglo XVI en adelante (Crellin, J.K. y Philpot, J. (1990). Herbal Medicine Past and Present, Duke University Press, Durham, Reino Unido 374-376). Sus usos sugeridos incluyen como tratamiento general para potenciar el funcionamiento de "la cabeza y el cerebro", para mejorar la memoria y para estimular los sentidos. Las muchas indicaciones contemporáneas para *S. officinalis* incluyen el alivio de la falta de memoria, la confusión mental, la depresión, el vértigo, como antiinflamatorio, y su uso como tratamiento para los síntomas de la menopausia (Bartram, T. (1995), Encyclopaedia of Herbal Medicine, 1ª ed., Grace Publishers, Londres, Reino Unido, p. 379, British Herbal Pharmacopeia, 1983). Se ha demostrado que el extracto secado de *S. officinalis* mejora el rendimiento cognitivo en sujetos humanos en una serie de tareas que contribuyen fundamentalmente a la formación de la memoria secundaria (Scholey (2008), Psychopharmacology (Berl), mayo, 198(1):127-139).

25 En términos de la hierba completa, ambas especies de salvia contienen aproximadamente 1,0-2,8 % de aceite volátil (Leung A.Y., Foster S. (1996), Encyclopaedia of common natural ingredients, Chichester, Wiley, 1996), y se ha sugerido que el constituyente de monoterpenoide (α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, tujona, alcanfor, geraniol) comprende los componentes activos de la hierba completa (Perry *et al.* (2001), J. Pharm. Pharmacol., octubre, 53(10):1347-1356). La Farmacopea Europa describe la hoja de salvia (*S. officinalis*) como particularmente rica en tujona, y un estudio de Walch *et al.* establece los niveles de tujona en preparaciones alimentarias secadas de salvia de entre 944 a 1353 mg/kg y un contenido en alcanfor de 1651 a 4322 mg/kg (Chemistry Central Journal (2011), 5:44). En efecto, la tujona se considera uno de los ingredientes activos clave responsable de las propiedades terapéuticas y nutracéuticas alegadas de los productos basados en la salvia. *Salvia lavandulaefolia* (salvia española) tiene una composición similar a *S. officinalis*, con la excepción de que carece de una alta concentración de tujona, que puede ser tóxica en grandes dosis. Por tanto, se ha sugerido que *S. lavandulaefolia* puede proporcionar un tratamiento eficaz, pero más adecuado desde el punto de vista teórico (Mantle *et al.* (2000), CNS Drugs, 13:201-213).

35 La salvia se comercializa a nivel mundial en numerosas preparaciones y productos para la nutrición humana, la aromatización y la conservación de alimentos, y para usos medicinales y cosméticos. A nivel global, los productos y las preparaciones de salvia son usados literalmente por millones de personas para un uso culinario, en medicinas herbales naturales, en productos cosméticos, en fragancias y en productos de higiene personal.

40 Los investigadores clínicos han analizado varias moléculas y vías de señalización con relación al control del mecanismo de la duración de la vida y el metabolismo (por ejemplo, sirtuínas, resveratrol, rapamicina, señalización de la insulina y TOR), y la industria farmacéutica ha reconocido rápidamente estas oportunidades. La rapamicina, por ejemplo, extiende la vida de ratones ancianos en un 9-14 %. La rapamicina (actuando a través de TORC1) puede extender la vida cronológica en levaduras en un 230 %. En la actualidad, la rapamicina es el criterio de referencia para los fármacos extensores de la vida.

45 El resveratrol es un producto natural derivado de la piel de las uvas, los arándanos, las frambuesas y las moras, y es capaz de aumentar la duración de la vida en levaduras, así como mejorar la salud en modelos animales de enfermedades del envejecimiento. Las investigaciones más recientes sugieren que el resveratrol es activo en la vía de PARP1 y contribuye al inicio de una respuesta de estrés que induce la expresión de supervivencia de genes (Sajish y Schimmel (2015), Nature, 19 de marzo, 519(7543):370-373).

50 A.R. Jassbi *et al.*, "Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species", Phytochemistry Reviews, vol. 15, n.º 5, 1 de agosto de 2015, analizan análisis fitoquímicos de diversas plantas de salvia. Se analizan diversos fitoquímicos biológicamente activos en plantas de salvia y sus diversos efectos citotóxicos y antimicrobianos, antiprotozoarios, antioxidantes, fitotóxicos e insecticidas, así como se considera su candidatura para la formulación de medicinas naturales.

55 El documento US 2012/282360 A1 describe preparaciones herbales que comprenden materiales de salvia, tomillo y comino en cantidades eficaces para aliviar los síntomas de la inflamación que surge de PGE₂, TNF α , COX-2 y COX-1.

5 A la vista de la amplia aceptación cultural de los productos naturales a base de salvia en la sociedad, sería ventajoso proporcionar composiciones con propiedades nutraceuticas y terapéuticas alteradas o potenciadas. En particular, sería deseable identificar productos a base de salvia que tengan una especificidad nutricional probada para estados patológicos o afecciones definidos, en particular los relacionados con el control de la duración de la vida, las patologías relacionadas con la edad y el metabolismo.

Las composiciones y los métodos de la presente invención abordan las anteriores deficiencias en la técnica. Estos y otros usos, características y ventajas de la invención deberían ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de las indicaciones proporcionadas en la presente.

Sumario de la invención

10 Según un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una dosificación nutricional o farmacéuticamente eficaz de un extracto de *Salvia officinalis* y un vehículo aceptable para su uso en el tratamiento de patologías relacionadas con la edad en un sujeto humano o animal, en la que las patologías relacionadas con la edad se seleccionan de una o más del grupo que consiste en: cáncer; enfermedad neurodegenerativa, que incluye la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; deterioro cognitivo; osteoporosis; y sarcopenia; y en la que
15 el extracto se obtiene de la hoja de una variedad de *Salvia officinalis* y tiene un contenido en tujona no mayor que aproximadamente 1 ppm. De modo adecuado, el contenido en tujona es menor que aproximadamente 1 ppm. Opcionalmente, la variedad/cultivar de *Salvia officinalis* también tiene un contenido bajo en alcanfor en la hoja, definido por un contenido en alcanfor menor que 25 ppm, de forma adecuada no mayor que 10 ppm, y opcionalmente como máximo 7 ppm.

20 El extracto puede obtenerse de la hoja de *Salvia officinalis*, de forma adecuada el extracto se obtiene de la hoja secada de *Salvia officinalis*.

El deterioro cognitivo puede comprender el deterioro de la memoria relacionado con la edad. El sujeto puede ser un ser humano (opcionalmente, un paciente adulto, geriátrico o pediátrico). Como alternativa, el sujeto puede ser un animal no humano.

25 La composición puede estar prevista para la administración oral, y de modo adecuado se administra en forma de un comprimido o una cápsula. La composición puede comprender al menos un 1 %, opcionalmente al menos un 3 % en peso del extracto de *Salvia officinalis*. La composición puede comprender no más del 85 % en peso del extracto de *Salvia officinalis*, de forma adecuada la composición comprende no más del 40 % en peso del extracto de *Salvia officinalis*.

30 La composición puede administrarse al sujeto a diario o más de una vez diaria.

En realizaciones específicas de la invención, la composición se administra en una cantidad no menor que aproximadamente 1 mg del componente activo, generalmente no menor que aproximadamente 10 mg del componente activo, opcionalmente no menor que aproximadamente 50 mg del componente activo, de modo adecuado no menor que aproximadamente 100 mg del componente activo. De modo adecuado, la composición se
35 administra en una cantidad no mayor que aproximadamente 25 g del componente activo, de modo adecuado no mayor que aproximadamente 10 g, y opcionalmente no mayor que aproximadamente 1 g.

40 En ciertas realizaciones, la composición es capaz de suscitar un aumento en el promedio de la duración de la vida en células de levadura de al menos un 5 %, de forma adecuada al menos un 7,5 %, opcionalmente al menos un 10 % en comparación con células de levadura que no han sido expuestas a la composición. La composición también, o como alternativa, puede ser capaz de suscitar un aumento en el promedio de la duración de la vida en gusanos de *C. elegans* de al menos un 10 %, de forma adecuada al menos un 12 %, opcionalmente al menos un 20 % en comparación con gusanos que no han sido expuestos a la composición.

45 En la presente también se describe un método para aumentar la vida cronológica de células dentro del cuerpo de un sujeto, que comprende administrar una dosificación nutricional o farmacéuticamente eficaz de un extracto de *Salvia officinalis* al sujeto, en el que el extracto se obtiene de una variedad de *Salvia officinalis* que tiene un bajo contenido en tujona en la hoja. De forma adecuada, el sujeto es un ser humano (opcionalmente, un paciente adulto, geriátrico o pediátrico). Como alternativa, el sujeto puede ser un animal no humano.

El método puede ser un método de tratamiento cosmético o un método de tratamiento terapéutico.

50 En algunas disposiciones, la composición suscita un aumento en el promedio de la duración de la vida en gusanos de *C. elegans* de al menos un 10 %, de forma adecuada al menos un 12 %, opcionalmente al menos un 20 % en comparación con gusanos que no han sido expuestos a la composición.

En una disposición, las células están comprendidas dentro del sistema nervioso central (SNC) del sujeto.

En la presente también se describe un método para tratar patologías relacionadas con la edad dentro del cuerpo de un sujeto humano o animal, que comprende administrar una dosificación nutricional o farmacéuticamente eficaz de

un extracto de *Salvia officinalis* al sujeto, en el que el extracto se obtiene de una variedad de *Salvia officinalis* que tiene un bajo contenido en tujona en la hoja, y en el que las patologías relacionadas con la edad se seleccionan de una o más del grupo que consiste en: cáncer; enfermedad neurodegenerativa, que incluye la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; deterioro cognitivo; osteoporosis; y sarcopenia. Generalmente, el método comprende administrar una composición como se describe en la presente al sujeto.

En la presente también se describe un método para identificar si un extracto de un cultivar de *Salvia officinalis* muestra eficacia como tratamiento de una patología relacionada con la edad en un sujeto humano o animal, y el método comprende exponer una población de gusanos de *C. elegans* a una composición que comprende el extracto, y determinar si la composición suscita un aumento en el promedio de la duración de la vida en la población de al menos un 10 %, de forma adecuada al menos un 12 %, opcionalmente al menos un 20 % en comparación con una población que no ha sido expuesta a la composición.

También se proporciona una composición identificada mediante el método descrito inmediatamente antes, para su uso en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la edad seleccionadas del grupo que consiste en: cáncer; enfermedad neurodegenerativa, que incluye la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; deterioro cognitivo; osteoporosis; y sarcopenia.

Breve descripción de los dibujos

La invención se ejemplifica también en los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una gráfica que muestra una comparación entre un material bruto diana procedente de *S. officinalis* ("target raw material", TRM) rodeado por una línea discontinua, y una especie no diana ("non-target species", NTS) después de un análisis multivariante de espectros de RMN de muestras de extracto de hoja.

La figura 2 es una representación de un diagrama de diagnóstico de valores atípicos que compara TRM (rodeado por una línea discontinua) y NTS.

La figura 3 es una gráfica que muestra la comparación de TRM (rodeado por una línea discontinua) con muestras de diferentes variedades obtenidas en el Reino Unido (abajo a la derecha), Croacia (abajo a la izquierda) e Italia (arriba a la derecha).

La figura 4 es una representación de un diagrama de diagnóstico de valores atípicos que compara además TRM (rodeado por una línea discontinua) y las muestras de la figura 3.

La figura 5 es una gráfica que muestra la comparación de TRM (rodeado por una línea discontinua) con muestras obtenidas fuera de temporada.

La figura 6 es una representación de un diagrama de diagnóstico de valores atípicos que compara además TRM (rodeado por una línea discontinua) y las muestras de la figura 5.

La figura 7 es un diagrama de barras que muestra los efectos de un tratamiento con el extracto N92 sobre la mediana de la duración de la vida de levaduras.

La figura 8 es una gráfica que muestra los perfiles de supervivencia para gusanos nematodos expuestos a un control de DMSO (cuadrados) frente a un tratamiento con el extracto de salvia N92 a 10 mg/ml (rombos).

La figura 9 es una gráfica que muestra los perfiles de supervivencia para gusanos nematodos expuestos a un control de DMSO (cuadrados) frente a un tratamiento con el extracto de salvia N92 a tres concentraciones diferentes de 0,1 mg/ml (línea), 1 mg/ml (estrellas) y 10 mg/ml (rombos).

La figura 10 son gráficas que muestran los perfiles de supervivencia para gusanos nematodos expuestos a un control de DMSO (cuadrados) frente a un tratamiento con (a) salvia roja (N315), (b) una salvia inglesa (N316) y (c) una salvia española (N318), todas ensayadas a una concentración de 10 mg/ml.

La figura 11 son gráficas que muestran los perfiles de supervivencia para gusanos nematodos expuestos a un control de DMSO (cuadrados) frente a un tratamiento con (a) donepezilo (N350) a 10 mg/ml, (b) rivastigmina (N355) a 10 mg/ml, (c) galantamina (N354) a 10 mg/ml, y (d) salvia *S. officinalis* del Reino Unido, fuente A (N314) a 10 mg/ml.

La figura 12 es un diagrama de barras que muestra la extensión del promedio de vida cronológica en *C. elegans* de moléculas pequeñas y dos extractos diferenciados de salvia a unas dosificaciones de 10 mg/ml. El aumento es el aumento en porcentaje frente al control sin tratar.

Descripción detallada de la invención

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención emplea técnicas convencionales de la química, la biología molecular, la microbiología, la tecnología del ADN recombinante y métodos químicos, que están

dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Estas técnicas también se explican en la bibliografía, por ejemplo, M.R. Green, J. Sambrook, 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridisation: Principles and Practice*, Oxford University Press; M. J. Gait (editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

5 Antes de exponer la invención, se proporcionan una serie de definiciones que ayudarán a la comprensión de la invención. A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

15 Tal como se emplea en la presente, el término "comprende" significa que cualquiera de los elementos mencionados está necesariamente incluido, y otros elementos pueden estar opcionalmente incluidos también. "Que consiste fundamentalmente en" significa que cualquiera de los elementos mencionados está necesariamente incluido, y los elementos que afectarían materialmente a las características básicas y nuevas de los elementos listados están excluidos, y otros elementos pueden estar opcionalmente incluidos. "Que consiste en" significa que todos los elementos distintos de los que están listados están excluidos. Las realizaciones definidas por cada uno de estos
20 términos y expresiones están dentro del alcance de esta invención.

La presente invención se basa en parte en la identificación y la caracterización de propiedades inesperadas y exclusivas asociadas con una composición derivada de variedades concretas de *S. officinalis*.

25 La presente invención reside en la proporción de una formulación que puede tomarse como suplemento nutricional, o "nutracéutico", o como una composición farmacéutica que es capaz de contribuir a un aumento en la vida cronológica celular en un individuo. En particular, las composiciones y las formulaciones de la presente invención son capaces de detener patologías relacionadas con el envejecimiento, que incluyen el deterioro cognitivo y la neurodegeneración. La formulación de la invención comprende un complejo exclusivo de componentes derivados botánicamente que, de modo sorprendente, actúan en sinergia para lograr los efectos mencionados anteriormente.

30 La expresión "suplemento nutricional" se emplea en la presente para indicar una composición que está dirigida al consumo por un receptor humano y/o animal y que está prevista para proporcionar un beneficio nutricional aditivo por encima y más allá de la dieta existente del receptor. Los beneficios nutricionales del suplemento pueden incluir actividades biológicas que son fundamentalmente farmacológicas, aunque generalmente los suplementos nutricionales no despliegan la gravedad de los efectos secundarios asociados con las composiciones farmacéuticas.

35 La expresión "componente activo" se usa en la presente para indicar componentes o ingredientes especificados que están presentes dentro de las composiciones de la invención y que contribuyen a la actividad deseada de dichas composiciones. Los componentes activos de la invención pueden ser compuestos aislados o pueden comprender extractos especificados de origen botánico. Resulta deseable para los componentes activos de la invención que estén estandarizados, es decir, que se proporcionen a una concentración específica de actividad conocida. Según las composiciones de la invención, la masa del componente activo se indica en miligramos (mg) y es equivalente a la
40 masa del compuesto dentro de la composición que posee la actividad biológica deseada. Como ejemplo, una composición de la invención que comprende 250 mg de extracto de *S. officinalis* por dosis se considera que comprende 250 mg de la combinación esencial de compuestos que contribuye y define la actividad biológica requerida del extracto de *S. officinalis* de la invención. Se apreciará que es probable que un extracto de origen botánico comprenda muchos miles de compuestos activos potenciales y combinaciones diferentes. En una
45 realización específica de la invención, el componente activo está comprendido dentro de un extracto etanólico secado de un material de hoja de *S. officinalis* obtenido de un cultivar que tiene las propiedades químicas deseadas.

En términos de la hierba completa, los cultivares de *S. officinalis* generalmente contienen aproximadamente un 1,0-2,8 % de aceite volátil. Los extractos contienen una serie de compuestos polifenólicos, de modo más notable ácido rosmarínico, carnosato de metilo, ácido cafeico, luteolina 7-O-glucósido y luteolina, y también tienden a contener alfa-
50 y beta-tujona como componente principal (de modo habitual aproximadamente un 50 % de aceite volátil). En los productos herbales de salvia tradicionales, los compuestos de tipo monoterpénico volátiles, la tujona y el alcanfor, se encuentran a niveles elevados y pueden provocar efectos secundarios potenciales. Los tés medicinales y alimentarios preparados a partir de salvia secada pueden contener tanto como 30 mg/L de tujona (Walch *et al.* (2011), *Chem. Cent. J.*, 21 de julio de 2011, 5:44). Por contraste, los productos y las composiciones de la presente
55 invención se derivan de cultivares de *S. officinalis* identificados como que tienen, entre otras propiedades, un contenido total en tujona que se encuentra por debajo del nivel seguro aceptado por la FDA de aproximadamente 8,75 mg/día para un ser humano promedio con una masa corporal de 70 kg. En realizaciones específicas de la invención, la cantidad de tujona total presente en la composición de la invención no es mayor que 1 ppm (1 mg/kg). En otra realización de la invención, además del bajo contenido en tujona, la cantidad de alcanfor presente en la
60 composición es menor que 25 ppm, de forma adecuada no mayor que 10 ppm, opcionalmente como máximo 7 ppm

(7 mg/kg). De modo sorprendente, la reducción en el contenido en tujona en estos cultivares de *S. officinalis* identificados no reduce la actividad biológica; por el contrario, se observa un significativo aumento en la potencia en ensayos biológicos.

5 La epigenética se refiere a la transmisión de información desde una célula o un organismo multicelular a sus descendientes sin que esa información esté codificada en la secuencia de nucleótidos de los genes. Los controles epigenéticos generalmente se establecen a través de una modificación química del ADN o la estructura de la cromatina, o a través de interacciones entre ácidos nucleicos no codificadores con la cromatina. La expresión génica puede moderarse, en algunos casos, a través de la unión covalente de grupos químicos a polipéptidos que están asociados con el ADN o que pueden unirse a este. Como ejemplo, la metilación, la sumoilación, la fosforilación, la ubiquitilación y/o la acetilación de histonas puede conducir a la activación o el silenciamiento de la expresión génica en la región del genoma en donde se han producido estas modificaciones epigenéticas. Las modificaciones epigenéticas pueden aparecer en diferentes momentos en el desarrollo y el envejecimiento normales de un organismo y también durante la transformación de células normales en células cancerosas. Estas modificaciones a menudo dan como resultado el silenciamiento o la activación de ciertos genes. En el cáncer, está bien documentado que la mayoría de las células tumorales muestran imprimaciones epigenéticas de ADN anómalo (Feinberg A.P. y Vogelstein B. (1983), Nature, 1(5895):89-92).

20 El término "modulador" significa una molécula (por ejemplo, una entidad/sustancia química) que realiza un cambio en la actividad de una molécula diana (por ejemplo, un gen, una enzima, etc.). El cambio en la actividad está en relación con el nivel de actividad normal o de línea de base en ausencia del modulador, pero en condiciones por lo demás similares, y puede representar un aumento o una disminución en la actividad normal/de la línea de base.

25 El envejecimiento humano está asociado con una serie de enfermedades y afecciones de múltiples sistemas complejos, tales como enfermedad neurodegenerativa, deterioro cognitivo, cáncer, osteoporosis, sarcopenia, además de defectos cosméticos, que incluyen trastornos de la piel y pérdida de cabello. En la raíz de todas las afecciones relacionadas con la edad se encuentra el envejecimiento molecular y celular, que conduce a la pérdida de función y, finalmente, de viabilidad de las células individuales. Se sabe que muchos aspectos del envejecimiento celular están mediados a través de mecanismos epigenéticos.

30 También se considera que tienen lugar procesos de envejecimiento biológicos distintos en las células humanas: la vida replicativa de la célula ("replicative life-span", RLS), es decir, cuántas veces se dividirá la célula, y la vida cronológica ("chronological life-span", CLS), es decir, durante cuánto tiempo permanece viable una célula que no se divide. De modo significativo, los aumentos estimulados en la vida replicativa y/o cronológica de organismos modelo no solo pueden retrasar, sino incluso revertir una serie de afecciones y patologías relacionadas con la edad en seres humanos y animales, incluyendo cánceres, enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), osteoporosis, sarcopenia, así como condiciones cosméticas de la piel. Aunque no se pretendía limitación alguna por la teoría, se propone que, con relación a la presente invención, la formulación exclusiva comprende una actividad moduladora epigenética que retrasa o revierte las modificaciones epigenéticas que aparecen en el transcurso del envejecimiento celular normal. Se demuestra que los efectos de esta actividad epigenética tienen también efectos profundos sobre la viabilidad celular, que dan como resultado un aumento inesperado en la vida cronológica.

40 Muchas de las vías epigenéticas conocidas por afectar a procesos biológicos asociados con el envejecimiento y la longevidad se han conservado a lo largo de la historia evolutiva a través de una gama de especies, permitiendo así obtener resultados transferibles y significativos a partir de organismos modelo y aplicarse a la biología humana.

45 *Caenorhabditis elegans* es un gusano nematodo no parasitario de vida libre pequeño (longitud de aproximadamente 1 mm). Puede cultivarse en gran número en un medio líquido o sobre placas de agar y, debido a su cutícula transparente, es posible rastrear células y seguir procesos biológicos. A diferencia de organismos modelo más complejos, *C. elegans* tiene un ciclo de vida corto (3 días desde el huevo hasta el adulto reproductor), que reduce considerablemente la cantidad de tiempo necesaria para producir resultados iniciales de selecciones de fármacos, haciendo que sea una elección barata y popular para un uso farmacéutico. Sin embargo, la simplicidad del organismo no significa que sea menos valioso como organismo modelo; se calcula de un 60-80 % de los genes de *C. elegans* son homólogos con los que aparecen en los seres humanos.

50 *C. elegans* se emplea como modelo de enfermedad para trastornos neurodegenerativos, trastornos asociados a los músculos y cáncer, y puede manipularse para la expresión transgénica de genes de enfermedad humanos. La validez de *C. elegans* como organismo modelo para la investigación en biología humana fue reconocida en el premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2002. También es un modelo destacado para la investigación de los mecanismos del envejecimiento. La fácil manipulación de los genes de *C. elegans* significa que pueden producirse con facilidad razas mutantes para optimizar la eficacia de la investigación. En consecuencia, se ha investigado mucho a *C. elegans* como paradigma para la enfermedad de Alzheimer (Ewald y Li (2010), Brain Struct Funct., marzo, 214(0):263-283)

Se sabe que la función ejecutiva del cerebro disminuye con la edad y se beneficia de un mayor nivel de aptitud cardiorrespiratoria. Los efectos antienvjecimiento inducidos en tejidos neuronales pueden tener un efecto directo no

solo en la aptitud general del organismo, sino también en el rendimiento cognitivo. Por tanto, existe una relación clara entre las composiciones que son capaces de inducir un aumento en la vida cronológica celular y la mejora en la función cognitiva.

5 El envejecimiento normal y la demencia están relacionados con una función colinérgica disminuida y, por tanto, no resulta sorprendente que la mayor parte de las investigaciones para identificar fármacos de molécula pequeña que podrían potencialmente tratar o aliviar los efectos de la demencia severa, tal como la enfermedad de Alzheimer, se hayan centrado principalmente en el sistema colinérgico. Con relación a esto último, dos tipos de receptores, muscarínicos y nicotínicos, responden a la acetilcolina para facilitar la comunicación intracelular, el procesamiento de la memoria y las funciones cognitivas superiores. El proceso comienza cuando la acetilcolina se libera para viajar a través de la hendidura sináptica, en donde se une a un receptor en el otro lado de la sinapsis. Tras activarse la señal, la acetilcolina es degradada rápidamente por una enzima, la acetilcolinesterasa (AChE) y se convierte en disponible para ser reciclada. Por tanto, el tratamiento médico convencional para la demencia implica a los inhibidores de la AChE que permiten que el neurotransmisor persista en la hendidura sináptica durante un periodo de tiempo más largo.

15 Los tres inhibidores de AChE recetados más a menudo son donepezilo (Aricept™), rivastigmina (Exelon™) y galantamina (Reminyl™), que fueron aprobados en 1996, 2000 y 2001, respectivamente. El donepezilo es el único inhibidor de AChE aprobado para el tratamiento de todos los estadios de la enfermedad de Alzheimer (Ng Y.P. (2015), *Neurochem. Int.*, octubre, 89:260-270). *Salvia officinalis* también ha demostrado presentar una inhibición de AChE dependiente de la concentración en homogeneizados de cerebro *post mortem*, con aceites esenciales y extractos alcohólicos de hoja fresca o secada. No obstante, se cree que las propiedades de inhibición de AChE de *Salvia officinalis* son aproximadamente dos órdenes de magnitud menores que las de los inhibidores de AChE donepezilo, rivastigmina y galantamina (Scholey *et al.* (2008), *Psychopharmacology*, 198:127-139). En realizaciones de la presente invención, se demuestra que extractos botánicos de cultivares concretos de *Salvia officinalis* con una huella química diferenciada e identificable tienen efectos profundos sobre la vida cronológica en *C. elegans*, aventajando incluso a todos los inhibidores de AChE de molécula pequeña aprobados mencionados previamente. Según una realización de la invención, estos efectos inesperadamente significativos sobre la vida cronológica se correlacionan con propiedades potenciadoras de la cognición que pueden ser útiles en el tratamiento o la remediación de los que padecen enfermedades relacionadas con la demencia (tal como la enfermedad de Alzheimer) o incluso en sujetos por lo demás sanos. Por tanto, la invención proporciona analíticas, así como una metodología funcional, basadas en un ensayo biológico de un modelo establecido, para identificar cultivares de *Salvia officinalis* con la actividad biológica y las propiedades más deseables.

En el uso, las composiciones de la invención pueden administrarse a un receptor humano como una formulación de dosis controlada diaria. En una realización de la invención, la composición se administra en forma de un comprimido de disgregación oral, que se disuelve con rapidez y tiene una alta capacidad de dosis. Las composiciones de la invención se formulan para ajustarse a las normas reglamentarias y generalmente se administran por vía oral o a través de otras vías convencionales. Las preparaciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, lociones, geles, líquidos, polvos, supositorios, suspensiones, liposomas, micropartículas u otras formulaciones adecuadas conocidas en la técnica. Estas composiciones generalmente comprenderán también excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a una o más sustancias que ayudan a la administración del componente activo al sujeto y a su absorción por este, y pueden incluirse en las composiciones de la presente invención sin provocar un efecto toxicológico adverso significativo en el sujeto. Los ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, disoluciones salinas normales, disolución de Ringer lactada, sacarosa normal, glucosa normal, ligantes, cargas, disgregantes, lubricantes, revestimientos, edulcorantes, aromas, disoluciones de sales (tal como disolución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y colorantes, y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse y, si se requiere, mezclarse con agentes auxiliares adicionales, tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulgentes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no reaccionen de forma perjudicial con el componente activo. Los expertos en la técnica reconocerán que otros excipientes farmacéuticos son útiles en la presente invención.

Según una realización de la invención, la composición puede administrarse al menos a diario (en una o más dosificaciones) y comprende, en peso seco, no menos de aproximadamente 1 mg del componente activo. Generalmente, la composición comprenderá no menos de aproximadamente 10 mg del componente activo, opcionalmente no menos de aproximadamente 50 mg del componente activo, de modo adecuado no menos de aproximadamente 100 mg del componente activo. En una realización de la invención, la composición se administra al menos a diario (en una o más dosificaciones) y comprende no más de aproximadamente 25 g del componente activo, de modo adecuado no más de aproximadamente 10 g, y opcionalmente no más de aproximadamente 1 g (es decir, 1000 mg). En una realización específica de la invención, las dosificaciones individuales del componente activo pueden formularse en cantidades en embolada no menores que aproximadamente 100 mg, no menores que aproximadamente 200 mg, no menores que aproximadamente 400 mg, y no menores que 500 mg. En una realización específica de la invención, se administra una dosis de 333 mg del componente activo a un sujeto adulto

una vez, dos veces o tres veces diarias. En otra realización de la invención, se administra una dosis de 167 mg del componente activo a un sujeto adulto una vez, dos veces o tres veces diarias.

5 Pueden administrarse múltiples dosificaciones a un individuo para alcanzar la cantidad requerida para lograr un régimen de dosificación diario adecuado. El régimen de dosificación, que incluye la cantidad del componente activo administrada, puede variar dependiendo de factores, tales como, entre otros: la edad, la masa corporal, el índice de masa corporal (IMC), el perfil metabólico, el género, el origen étnico, y el historial médico previo.

10 La formulación de la invención puede estar comprendida en un líquido, emulsión o en una forma de sólido en polvo que puede utilizarse como ingrediente en otros productos alimentarios. Por ejemplo, un alimento básico de muchos regímenes de dieta actuales es un batido de proteínas que actúa como sustitución de una comida. La formulación de la invención puede incorporarse de modo conveniente en dicho producto para proporcionar una potenciación nutracéutica conveniente al producto. Otros productos alimentarios que pueden comprender la formulación de la invención de modo adecuado incluyen cereales, sopas, platos precocinados, mousses, yogures, bebidas, batidos, harinas, tentempiés, galletas, tartas, panes y productos horneados, pasteles, mermeladas, alimentos para untar, helados, gomas de mascar, salsas y aliños para ensaladas. De este modo, la actividad deseable que muestran las composiciones de la invención puede proporcionarse al mismo tiempo que la ingesta de alimentos.

15 Las composiciones de la invención no se limitan al uso en seres humanos, y también se consideran las composiciones veterinarias como un medio adecuado para facilitar la salud lipídica en animales. La mitigación y la prevención de patologías relacionadas con la edad es de gran importancia para aumentar la vida de rendimiento eficaz de animales deportivos, tales como caballos de carreras purasangre y ponis para el polo. Al igual que las enfermedades asociadas con el envejecimiento están aumentando en prevalencia, ya que los seres humanos viven más tiempo, también están siendo cada vez más habituales en mascotas domésticas, tales como perros y gatos. Las composiciones de la invención previstas para un uso veterinario pueden administrarse a animales como formulaciones nutracéuticas o, como alternativa, la formulación puede incorporarse en productos de pienso para animales. Se apreciará que los niveles de dosificación se adaptarán para reflejar la masa corporal (o IMC) del animal al cual se administra la composición.

La invención se ilustra más a fondo mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación y caracterización de *Salvia officinalis* de origen exclusivo

30 El producto N92 se produce a partir de un material bruto diana (TRM) muy específico. Este TRM es la hoja limpia secada de un varietal seleccionado de *Salvia officinalis*, cultivado en emplazamientos geográficos específicos dentro del Reino Unido con protocolos de producción definidos que cumplen con las normas de GAP ("Good Agricultural Production", buena producción agrícola) y recolectado dentro de una ventana de temporada específica.

35 Este TRM, según se define, puede diferenciarse de todos los demás materiales basándose en la caracterización del perfil químico completo del extracto bruto producido mediante extracción con disolventes (es decir, diferenciado del material de especies diferentes, de la misma especie cultivada en otro emplazamiento, o del mismo material genético que el TRM cultivado bajo las mismas condiciones, pero recolectado fuera del periodo de recolección de temporada definido para el TRM). El producto N92 se caracteriza, en parte, por tener un contenido muy bajo en el monoterpénoide tujona (generalmente no más de 1 ppm, determinado mediante análisis con un cromatógrafo de gases), considerablemente más bajo que el que se encuentra normalmente en *S. officinalis* cultivada y salvaje.

40 El material procedente de los sitios de producción exclusivos ("Unique Production Sites", UPS) de N92 se usa para definir un requisito de material bruto diana (TRM) de N92 según se prescribe en los procedimientos de ejecución homologados convencionales. El proceso en líneas generales es el siguiente: los espectros de RMN de extractos de ensayo de muestras de TRM procedentes de suministradores comerciales de material bruto de N92 aceptable se someten a una transformación matemática para generar metadatos tratables estadísticamente. Estos datos después se someten a análisis multivariante para determinar los principales componentes de variación de los datos espectrales (el análisis de componentes principales, o PCA ("Principle Components Analysis") es un método convencional para lograr este objetivo). A partir de estos datos y de los modelos matemáticos generados para describirlos, se genera una "esfera de aceptabilidad" (de hecho, un volumen multidimensional determinado, por ejemplo, por los componentes principales de los datos de ensayo) que engloba los datos de TRM y que forma una base para la evaluación visual y estadística de la aceptabilidad de muestras nuevas o desconocidas. Esta esfera de aceptabilidad describe el requisito homologado para el TRM N92.

45 Se ofrecen ejemplos de tres tipos de ensayos a los que se ha sometido el material bruto diana (TRM), concretamente comparaciones entre el TRM y especies no diana (NTS), entre el TRM y muestras de producción no diana ("non-target production", NTP) de N92 (emplazamientos y variedades no diana), y TRM y los límites aceptables al requisito de material o parámetros (recolección fuera de temporada en el ejemplo que aparece a continuación).

Los datos del TRM incluyen todos los datos procedentes de cosechas comerciales de N92 hasta la fecha. Las NTS

son *Salvia fruticosa* y *Salvia lavandulifolia*. La técnica de análisis multivariante usada para producir la figura 1 es el modelado blando independiente de analogías de clases ("Soft Independent Modelling of Class Analogies", SIMCA). Claramente no existe solapamiento entre los elipsoides que muestran los límites de confianza para el TRM (rodeado por la línea discontinua) y los materiales de NTS. Las diferencias entre los grupos se examinan con más detalle a continuación.

Se creó un modelo de componentes principales validado para describir los datos del TRM y se ejecutó contra los datos de NTS; los datos resultantes se usan para generar un diagrama de diagnóstico de valores atípicos (figura 2) dividido en cuatro cuadrantes. El eje X muestra la distancia de Mahalanobis (una medición de la distancia de los datos ensayados a partir de los picos modelados en el espectro de RMN) y el eje Y muestra la distancia residual (varianza residual en el espectro de RMN). Las muestras que superen una distancia crítica (en la figura 2, esta se basa en un límite de confianza del 95 %) a lo largo de cualquiera de los ejes son valores atípicos potenciales; sin embargo, en un conjunto de datos mayor, algunas muestras normales pueden estar fuera de uno u otro umbral. Las muestras que se encuentren significativamente fuera de ambos umbrales son claramente distintas de la población modelada. Este ejemplo (figura 2) demuestra que las muestras de NTS son diferenciada y materialmente diferentes de las del TRM (rodeadas por la línea discontinua).

En la figura 3, el TRM (rodeado por una línea discontinua) incluye todos los datos procedentes de cosechas comerciales hasta la fecha comparados con los de NTP, que incluye variedades procedentes del Reino Unido (abajo a la derecha), Croacia (abajo a la izquierda) e Italia (arriba a la derecha). Claramente no existe solapamiento entre los elipsoides que indican los límites de confianza para el TRM y los materiales de NTS.

Se creó un modelo de componentes principales validado para describir los datos del TRM y se ejecutó contra los datos de NTS; los datos resultantes se usan para generar un diagrama de diagnóstico de valores atípicos (figura 4), dividido en cuatro cuadrantes. Las muestras que se encuentran fuera de ambos umbrales críticos de x e y son significativamente diferentes de la población modelada. La gráfica demuestra que las muestras de NTS son diferenciada y materialmente diferentes de las del TRM (rodeadas por la línea discontinua).

En la figura 5, el TRM (inferior, rodeado por una línea discontinua) incluye todos los datos procedentes de cosechas comerciales hasta la fecha. El material de límites a los requisitos (rojo) se recolectó fuera de la temporada prescrita, y se diferencia fitoquímicamente del TRM deseado, como se demostró anteriormente (los límites de confianza para los dos grupos no se solapan).

La figura 6 muestra un modelo de componentes principales validado creado para describir los datos del TRM y ejecutado contra los datos de NTS; los datos resultantes se usan para generar un diagrama de diagnóstico de valores atípicos dividido en cuatro cuadrantes. Las muestras que se encuentran fuera de ambos umbrales críticos de x e y son significativamente diferentes de la población modelada. El ejemplo de los inventores demuestra que las muestras fuera de temporada son diferenciada y materialmente diferentes de las del TRM.

Por tanto, la metodología indicada proporciona una huella química reproducible que permite la identificación de TRM de *S. officinalis* independiente de la variedad, el emplazamiento del cultivo o la temporada de recolección.

Ejemplo 2

La hoja se recolecta mecánicamente y se seca en un secador de aire caliente (secador de proceso continuo; calentamiento indirecto con estufa). El material de hoja procedía del cultivo de 2011 en un emplazamiento especificado en el Reino Unido.

Salvia officinalis - Protocolo de extracción etanólica/agua de TRM

- Se trituran 10 g de TRM usando un mortero y una mano de mortero.
- Se pesan 0,1 g hacia 6x un tubo Eppendorf.
- Se añaden 600 µl de EtOH al 70 % a cada tubo.
- Se incuba con agitación a 39 °C durante 3 horas.
- Se reúnen los tubos y se esterilizan mediante filtración usando un filtro de 0,2 µm y una jeringa de 5 ml.
- Se pipetea 1,5 ml hacia un tubo de 1,5 ml y se centrifuga durante 1 min a 13k rpm y se traslada el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se evapora el disolvente colocándolo en un SpeedVac (40 °C) durante 3-5 horas. El extracto de TRM etanólico en polvo seco resultante está en forma de un polvo fino de color marrón verdoso.
- Se resuspende el extracto de TRM seco en DMSO a una concentración de 10 mg/ml.

Ejemplo 3

El producto N92 comprende el extracto de TRM secado resuspendido producido en el ejemplo 2 y se usó como la fuente de salvia en los presentes ejemplos. Todos los ingredientes usados en los ejemplos se formularon como materia prima en DMSO 10 mg/ml y se usaron en consecuencia. El N92 mostró aumentos significativos en la mediana de la duración de la vida frente a controles no tratados en ambas evaluaciones en levaduras y gusanos nematodos. Las evaluaciones se realizaron según los protocolos descritos en:

Evaluación de un solo compuesto en levaduras y gusanos

A- Todos los ingredientes descritos se ensayan por sí solos frente a controles apropiados para determinar la eficacia en la evaluación en levaduras.

B- Los ingredientes más atractivos de la etapa A se volvieron a ensayar en la evaluación en gusanos para asegurarse de que no se estuviesen observando efectos específicos de levaduras.

(A) Evaluación de una sola composición en levaduras

La evaluación se realizó sustancialmente según los protocolos indicados en el documento WO-2011/004197-A1. Las levaduras se cultivaron a 30 °C en medio rico (YPD), bactopectona al 1 %, extracto de levadura Difco al 1 % (BD and Co.), glucosa al 2 % hasta una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/ml, y se trataron con producto N92 o se trataron de forma simulada durante hasta tres horas. Se determinó la duración de la vida como se describe en Murakami, C. y Kaeberlein, M. (J. Vis. Exp., 27 (2009)). Brevemente, la vida cronológica de levaduras se refiere al perfil de viabilidad de un cultivo de levaduras en envejecimiento a lo largo del tiempo. Un cultivo de levaduras se cultiva en medio líquido hasta que se agota la fuente de carbono glucosa y las células dejan de dividirse. En este momento, se mide la proporción de células que están vivas y, por tanto, capaces de crecer y dividirse tras el suministro de nutrientes frescos, observando las características de crecimiento de un inoculado fresco del cultivo en envejecimiento usando una máquina Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finlandia). Se comparan las viabilidades en diversos momentos para determinar la vida cronológica del cultivo.

El N92 (salvia) se ensayó dos veces en la evaluación en levaduras, una vez a una dilución 1/10. En ambos experimentos, los resultados demuestran una significativa extensión en la mediana de la duración de la vida frente al cultivo control no tratado.

Tabla 1 - N92 (*S. officinalis*) produce una extensión en la mediana de la duración de la vida del 18 % en levaduras.

	Condiciones	Aumento en la mediana de la duración de la vida
Salvia N92	N92	17,95 % +/- 0,14
	N92 1/10	7,69 % +/- 0,08

Los resultados también se muestran en la figura 7.

(B) Evaluación de una sola composición en gusanos

Evaluación en gusanos de N92 - La evaluación se realizó en el nematodo *C. elegans* sustancialmente según los protocolos indicados en el documento WO-2014/111732-A1 (Chronos Therapeutics Ltd). Se cultivaron gusanos nematodos sobre una placa de agar usando procedimientos convencionales para obtener suficientes huevos al comienzo del experimento. Las placas se mantuvieron en el incubador a 20 °C.

Se prepararon las composiciones de ensayo de N92 como patrón, dilución 1/10 y 1/100 y se aplicaron a placas de agar de 12 pocillos prevertidas. Se emplearon un mínimo de 4 replicados por condición incluyendo el control. Después de que las composiciones de ensayo se hubieran secado, se aplicaron bacterias de alimentación de nematodos a las placas (cepa de *E. coli* OP50).

Se recolectaron los gusanos y los huevos previamente colocados en el incubador. Generalmente, esto implica enjuagar las placas con tampón M9 y después realizar 3 ciclos de centrifuga mientras se blanquean los gusanos (de modo que se matan los gusanos y solo sobreviven los huevos). Tras finalizar, se calcula la concentración de huevos y se diluye si es necesario para dispensar 200 huevos por pocillo. Puesto que sobreviven aproximadamente 75 % de huevo, eso da como resultado aproximadamente 150 gusanos por pocillo, que es un número estable considerando el volumen del pocillo y la disponibilidad de alimento. Las placas se incubaron durante 48 horas a 20 °C para permitir la eclosión.

Los gusanos incubados se esterilizaron con FUDR (2'-desoxi-5-fluorouridina), un fármaco quimioterapéutico que se emplea en estudios con *C. elegans* para evitar la formación de la progenie de segunda generación que, de otro modo, complicaría los experimentos de envejecimiento. La FUDR evita la síntesis de ADN y, por tanto, los huevos

no eclosionan y los gusanos jóvenes no se desarrollan.

Después se formaron imágenes con regularidad de los cultivos mediante microscopía de campo brillante en los días 1, +3; +4; +7; +9; +11; +14; +16; +18. Los gusanos fueron alimentados con OP50 según fue necesario, generalmente dispensando *E. coli* cada 2-3 días para evitar la disminución de la población como resultado de la inanición.

Tras terminar la formación de imágenes, los datos se analizaron con un paquete de software MatLab interno y se produjo una hoja de cálculo de Excel como resultado, y se analizó mediante un software estadístico convencional para representar gráficamente las curvas de supervivencia para cada uno de los cultivos.

El producto N92 produce un aumento significativo en la duración de la vida de los gusanos y una significativa extensión en el promedio de duración de la vida en un +11,8 % en comparación con el control sin tratar. Este efecto se observó a la dosificación de 10 mg/ml y fue dependiente de la dosis cuando se ensayó dentro del intervalo de 0,1-10 mg/ml, tal como se muestra en la figura 9. En el ejemplo 4 (a continuación) se muestran otros análisis de estos resultados y la comparación con otros compuestos.

Cuando se compara con las actividades de otras salvias, en concreto, salvia roja (N315), una salvia inglesa (N316) y una salvia suministrada procedente de España (N318), resultó evidente que, en promedio de extensión de la duración de la vida, máxima extensión de la duración de la vida y máxima extensión de la supervivencia, el N92 era el más activo. Los resultados de las comparaciones se muestran en la tabla 2, en la que puede observarse que la composición procedente de N92 fue la única composición que realmente produjo un promedio de extensión de la duración de la vida, máxima extensión de la duración de la vida y máxima extensión de la supervivencia observados en el ensayo. Los resultados de este experimento se muestran también en las figuras 8 y 10 (a-c).

Los resultados de las evaluaciones biológicas en levaduras y gusanos claramente demuestran que la composición N92 ejerce profundos efectos sobre el envejecimiento cronológico y conduce a un aumento en la duración de la vida en ambos organismos modelo ensayados. La robustez de estos resultados entre organismos divergentes sugiere que podrían observarse efectos similares en células de mamífero. Además, también es importante advertir que los efectos beneficiosos no son ubicuos a las composiciones obtenidas de todas las salvias (*S. officinalis*) y son exclusivos de variedades, tal como N92, que generalmente muestran un contenido en tujona inusualmente bajo.

Tabla 2 - Actividad de la composición activa N92 comparada con otras variedades de *Salvia officinalis*

Número N	Nombre del compuesto	Concentración	Cambio en el promedio de la duración de la vida	Máximo cambio en la supervivencia	Máximo cambio en la duración de la vida
N92 (lote 4)	Salvia patentada	10 mg/ml	+12 %	+30 % (a una viabilidad del 75 %)	+20 % (en el día 13)
N315	Salvia roja	10 mg/ml	-11 %	-24 % (a una viabilidad del 25-50 %)	-20 % (en los días 10-13)
N316	Salvia inglesa (granjas Arnold)	10 mg/ml	-11 %	-23 % (a una viabilidad del 50 %)	-18 % (en el día 10)
N318	Extracto de salvia de España	10 mg/ml	-9 %	-23 % (a una viabilidad del 50 %)	-18 % (en el día 10)

Ejemplo 4: Evaluación en el ensayo de vida cronológica de *C. elegans* de extractos de *S. officinalis* en comparación con inhibidores de AChE de molécula pequeña

Los tres inhibidores de AChE recetados más a menudo que se emplean habitualmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer son donepezilo (Aricept™), rivastigmina (Exelon™) y galantamina (Reminyl™). Se prepararon extractos botánicos de *S. officinalis* procedentes de dos fuentes exclusivas como se describió previamente en el ejemplo 2. Los detalles de las composiciones ensayadas se indican en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

Compuesto ref.	Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Suministrador	Descripción del compuesto	Pureza
N350	Donepezilo	Fármaco de molécula pequeña	Sigma-Aldrich	Polvo	≥98 % HPLC
N355	Rivastigmina	Fármaco de molécula pequeña	Sigma-Aldrich	Polvo	≥98 % HPLC
N354	Galantamina	Fármaco de molécula pequeña	Sigma-Aldrich	Polvo	≥94 % TLC
N314	<i>Salvia officinalis</i> - Salvia del Reino Unido, fuente A	Extracto botánico	N/A	Extracto	N/A
N92-4	<i>Salvia officinalis</i> - Salvia del Reino Unido, fuente B	Extracto botánico	N/A	Extracto	N/A

Las muestras se prepararon como una disolución madre con base de DMSO 10 mg/ml, se tomaron partes alícuotas cuando fue necesario, y se realizó una dilución en serie de la disolución madre para N92-4. Las disoluciones madre se conservaron a -20 °C.

- 5 El ensayo se realizó usando la cepa convencional de *C. elegans* con un marcador GFP faríngeo y una mutación *bus-5*. El marcador GFP permite capturar imágenes de los gusanos usando microscopía de fluorescencia. La mutación *bus-5* provoca la pérdida de los antígenos de cutícula "normales", lo cual hace que la cutícula del gusano se haga permeable a los tratamientos, y esto permite la captación directa de los ingredientes de tratamiento evitando los mecanismos protectores del canal del intestino. Los gusanos se criaron en presencia de un tratamiento o un control en placas de agar NGM de 12 pocillos y se mantuvieron a 20 °C con alimento suficiente (*Escherichia coli* cepa OP-50).

15 Se usó un paquete de software de análisis de datos patentado para analizar los efectos de diferentes ingredientes activos sobre aspectos del envejecimiento de los gusanos. El paquete se desarrolló usando un algoritmo de análisis de imágenes MATLAB que se adaptó para reconocer y contar gusanos basándose en su intensidad de fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo. Un gusano vivo se distingue de un gusano muerto basándose en el grado de movimiento entre dos imágenes consecutivas, lo cual permite rastrear el número de gusanos vivos y el número acumulado de gusanos muertos a lo largo del experimento. Una selección similar de imágenes se comprobó de forma manual para asegurarse de que el software había identificado correctamente el número de gusanos. Usando el software en línea OASIS (Yang, Nam, Seo, Han, y Choi, 2011), se procesa la salida de MATLAB, generando curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y las estadísticas asociadas.

20 La salida del análisis estadístico de OASIS proporciona resultados de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher. El resultado de rangos logarítmicos es un ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para el ensayo de duración de la vida global, proporcionando un valor de p fiable que resume el experimento completo. El ensayo exacto de Fisher calcula la significancia de comparaciones de la función de supervivencia en múltiples momentos específicos a lo largo del experimento, en lugar de para la duración de la vida global.

Los resultados del ensayo para cada uno de los compuestos ensayados se muestran en la figura 11.

30 El donepezilo (N350) actuó con una mejora estadísticamente significativa en el promedio de la duración de la vida del +11,3 %, una mejora máxima en la duración de la vida del +19,6 %, y una máxima mejora en la supervivencia de hasta el +15,8 % en el día 13 (como se observa en la figura 11(a)). Los resultados del ensayo de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher muestran una significancia global y para todos los momentos individuales.

Tabla 4 - Efecto del donepezilo a 10 mg/ml sobre la duración de la vida de gusanos

Promedio/mediana de la duración de la vida				
	<i>Promedio restringido</i>			
Nombre	n.º de sujetos	Días	Error estándar	I.C. del 95 %
Control	1752	13,01	0,09	12,82-13,19

ES 2 899 101 T3

N350 10 mg/ml	576	14,48	0,13	14,23-14,74
Ensayo de rangos logarítmicos (ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para la duración de la vida global)				
Condición	Chi ²	Valor de P		Valor de P de Bonferroni
Control frente a N350 10 mg/ml	59,99	0,0e+00		0,0e+00
Ensayo exacto de Fisher (comparación de dos funciones de supervivencia en múltiples momentos a lo largo del ensayo)				
Condición	Valor de P al 25 %	Valor de P al 50 %	Valor de P al 75 %	Valor de P al 90 %
Control frente a N350 10 mg/ml	3,0e-08	2,6e-12	1,8e-11	1,3e-09

5 La rivastigmina (N355) actuó con una mejora estadísticamente significativa en el promedio de la duración de la vida del +7,9 %, una mejora máxima en la duración de la vida del +15,6 %, y una máxima mejora en la supervivencia de hasta el +13,3 % en el día 12 (como se observa en la figura 11(b)). Los resultados del ensayo de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher muestran una significancia global y para todos los momentos individuales.

Tabla 5 - Efecto de la rivastigmina a 10 mg/ml sobre la duración de la vida de gusanos

Promedio/mediana de la duración de la vida				
<i>Promedio restringido</i>				
Nombre	n.º de sujetos	Días	Error estándar	I.C. del 95 %
Control	1752	13,01	0,09	12,82-13,19
N355 10 mg/ml	474	14,04	0,17	13,71-14,37
Ensayo de rangos logarítmicos (ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para la duración de la vida global)				
Condición	Chi ²	Valor de P		Valor de P de Bonferroni
Control frente a N355 10 mg/ml	27,00	2,0e-07		2,0e-07
Ensayo exacto de Fisher (comparación de dos funciones de supervivencia en múltiples momentos a lo largo del ensayo)				
Condición	Valor de P al 25 %	Valor de P al 50 %	Valor de P al 75 %	Valor de P al 90 %
Control frente a N355 10 mg/ml	3,0e-05	3,7e-08	1,4e-05	0,0001

10 La galantamina (N354) actuó con una mejora estadísticamente significativa en el promedio de la duración de la vida del +8 %, una mejora máxima en la duración de la vida del +15,9 %, y una máxima mejora en la supervivencia de hasta el +11,6 % en el día 9 (véase la figura 11(c)). Los resultados del ensayo de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher muestran una significancia global y para todos los momentos individuales.

ES 2 899 101 T3

Tabla 6 - Efecto de la galantamina a 10 mg/ml sobre la duración de la vida de gusanos

Promedio/mediana de la duración de la vida				
<i>Promedio restringido</i>				
Nombre	n.º de sujetos	Días	Error estándar	I.C. del 95 %
Control	1752	13,01	0,09	12,82-13,19
N354 10 mg/ml	540	14,05	0,15	13,76-14,33
Ensayo de rangos logarítmicos (ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para la duración de la vida global)				
Condición	Chi ²	Valor de P		Valor de P de Bonferroni
Control frente a N354 10 mg/ml	23,23	1,4e-06		1,4e-06
Ensayo exacto de Fisher (comparación de dos funciones de supervivencia en múltiples momentos a lo largo del ensayo)				
Condición	Valor de P al 25 %	Valor de P al 50 %	Valor de P al 75 %	Valor de P al 90 %
Control frente a N354 10 mg/ml	3,4e-07	2,8e-06	0,0024	0,0007

5 *Salvia officinalis* - La salvia del Reino Unido, fuente A (N314) actuó con una mejora estadísticamente significativa en el promedio de la duración de la vida del +8 %, una mejora máxima en la duración de la vida del +16,8 %, y una máxima mejora en la supervivencia de hasta el +15 % en el día 12 (como se observa en la figura 11(d)). Los resultados del ensayo de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher muestran una significancia global y para todos los momentos individuales.

Tabla 6 - Efecto del N314 a 10 mg/ml sobre la duración de la vida de gusanos

Promedio/mediana de la duración de la vida				
<i>Promedio restringido</i>				
Nombre	n.º de sujetos	Días	Error estándar	I.C. del 95 %
Control	1042	12,70	0,12	12,47-12,94
N314 10 mg/ml	563	13,72	0,15	13,42-14,01
Ensayo de rangos logarítmicos (ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para la duración de la vida global)				
Condición	Chi ²	Valor de P		Valor de P de Bonferroni
Control frente a N314 10 mg/ml	20,12	7,3e-06		7,3e-06
Ensayo exacto de Fisher (comparación de dos funciones de supervivencia en múltiples momentos a lo largo del ensayo)				
Condición	Valor de P al 25 %	Valor de P al 50 %	Valor de P al 75 %	Valor de P al 90 %
Control frente a N314 10 mg/ml	3,6e-06	4,2e-09	0,0006	0,0119

- 5 **Salvia officinalis** - La salvia del Reino Unido, fuente B (N92-4) se evaluó a tres concentraciones diferentes en el ejemplo 3 (véase anteriormente) y mostró un claro efecto dependiente de la dosis, con una mejora estadísticamente significativa en el promedio de la duración de la vida del +11,8 %, una mejora máxima en la duración de la vida del +26,3 %, y una máxima mejora en la supervivencia de hasta el +21,6 % en el día 12 para la concentración de 10 mg/ml (véase la figura 9). Otros análisis de los resultados del ensayo de rangos logarítmicos y del ensayo exacto de Fisher muestran una significancia global y para todos los momentos individuales a 1 mg/ml y 10 mg/ml.

Tabla 7 - Efecto del N92-4 a 0,1, 1,0 y 10 mg/ml sobre la duración de la vida de gusanos

Promedio/mediana de la duración de la vida				
	<i>Promedio restringido</i>			
Nombre	n.º de sujetos	Días	Error estándar	I.C. del 95 %
Control	3405	12,91	0,07	12,78-13,04
N92-4 0,1 mg/ml	508	13,15	0,17	12,82-13,48
N92-4 1 mg/ml	762	14,12	0,12	13,88-14,36
N92-4 10 mg/ml	602	14,43	0,13	14,17-14,68
Ensayo de rangos logarítmicos (ensayo no paramétrico que compara dos funciones de supervivencia para la duración de la vida global)				
Condición	Chi ²	Valor de P	Valor de P de Bonferroni	
Control frente a N92-4 0,1 mg/ml	3,75	0,0528	0,1583	
Control frente a N92-4 1 mg/ml	46,00	0,0e+00	0,0e+00	
Control frente a N92-4 10 mg/ml	64,19	0,0e+00	0,0e+00	
Ensayo exacto de Fisher (comparación de dos funciones de supervivencia en múltiples momentos a lo largo del ensayo)				
Condición	Valor de P al 25 %	Valor de P al 50 %	Valor de P al 75 %	Valor de P al 90 %
Control frente a N92-4 0,1 mg/ml	0,8008	0,0282	0,2737	0,0381
Control frente a N92-4 1 mg/ml	2,7e-12	3,4e-12	2,7e-08	0,0001
Control frente a N92-4 10 mg/ml	2,5e-12	3,0e-12	8,1e-10	3,1e-07

Conclusiones

- 10 Los compuestos inhibidores de AChE de molécula pequeña aumentan la vida cronológica (CLS) de *C. elegans* significativamente dentro un intervalo estrecho del 8 %-12 %. Todos estos fármacos presentan una actividad de inhibición de AChE, que tiende a demostrar que el aumento en la actividad colinérgica en *C. elegans* está asociado con una extensión de la CLS. Los extractos de *S. officinalis* ensayados en comparación muestran aumentos en la CLS que fueron comparables a los de las moléculas pequeñas ensayadas. Sin embargo, N92-4 mostró, de modo sorprendente, una actividad que excedía incluso la de la molécula pequeña con mejor rendimiento, el donepezilo (véase la figura 12).
- 15

Los extractos botánicos, aunque muestran una variabilidad mucho mayor en sus propiedades dependiendo de la combinación de una serie de factores, tales como la variedad y el cultivar, el origen, los protocolos de producción y los momentos de recolección, el número de años de cultivo, el estadio de desarrollo de la hoja recolectada

específica, el uso de material fresco o secado, la naturaleza del proceso de secado y extracción y, por último, la duración de la conservación del producto vegetal, pueden tener, por tanto, un impresionante potencial como ingredientes terapéuticos/potenciadores que pueden actuar tan bien o mejor que los fármacos terapéuticos clásicos. Mediante la identificación de una huella química específica para un cultivar concreto de *S. officinalis* que posee propiedades biológicas ventajosas, la presente invención proporciona una manera de evitar la variabilidad inherente en el material fuente vegetal que, hasta la fecha, ha disuadido a los médicos y nutricionistas de fiarse de los extractos herbales por sus propiedades terapéuticas beneficiosas. Además, la estrategia de evaluación de CLS de *C. elegans* de la presente proporciona un ensayo robusto y repetible para la identificación y el control de calidad de otros cultivares específicos de *S. officinalis* que tienen una actividad biológica equivalente o incluso mejor en comparación con cultivos convencionales.

Aunque en la presente se han descrito realizaciones concretas de la invención en detalle, esto se ha realizado como ejemplo y solo con fines de ilustración. Las realizaciones mencionadas anteriormente no pretenden ser limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, que aparecen a continuación. Los inventores contemplan que puedan realizarse diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones a la invención sin apartarse del alcance de la invención según se define mediante las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición que comprende una dosificación nutricional o farmacéuticamente eficaz de un extracto de *Salvia officinalis* y un vehículo aceptable para su uso en el tratamiento de patologías relacionadas con la edad en un sujeto humano o animal, en la que las patologías relacionadas con la edad se seleccionan de una o más del grupo que consiste en: cáncer; enfermedad neurodegenerativa, que incluye la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; deterioro cognitivo; osteoporosis; y sarcopenia; y en la que el extracto se obtiene de la hoja de una variedad de *Salvia officinalis* y tiene un contenido en tujona no mayor que aproximadamente 1 ppm.
- 2.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la tujona está a menos de aproximadamente 1 ppm.
- 10 3.- La composición para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la cantidad de alcanfor presente en la composición es menor que 25 ppm, de forma adecuada no mayor que 10 ppm, opcionalmente como máximo 7 ppm.
- 4.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el extracto se obtiene de la hoja secada de *Salvia officinalis*.
- 15 5.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el deterioro cognitivo comprende el deterioro de la memoria relacionado con la edad.
- 6.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el sujeto es un ser humano.
- 7.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el sujeto es un animal no humano.
- 20 8.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición está prevista para la administración oral.
- 9.- La composición para el uso según la reivindicación 8, en la que la composición se administra en forma de una cápsula o un comprimido.
- 25 10.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición comprende al menos 1 %, opcionalmente al menos 3 % en peso del extracto de *Salvia officinalis*.
- 11.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición comprende no más del 85 % en peso del extracto de *Salvia officinalis*.
- 12.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición se administra al sujeto a diario y, opcionalmente, más de una vez diaria.
- 30 13.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición se administra en una cantidad no menor que aproximadamente 1 mg del componente activo, generalmente no menor que aproximadamente 10 mg del componente activo, opcionalmente no menor que aproximadamente 50 mg del componente activo, de modo adecuado no menor que aproximadamente 100 mg del componente activo.
- 35 14.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la composición se administra en una cantidad no mayor que aproximadamente 25 g del componente activo, de modo adecuado no mayor que aproximadamente 10 g, y opcionalmente no mayor que aproximadamente 1 g.
- 40 15.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la composición es capaz de suscitar un aumento en el promedio de la duración de la vida en gusanos de *C. elegans* de al menos un 10 %, de forma adecuada al menos un 12 %, opcionalmente al menos un 20 % en comparación con gusanos que no han sido expuestos a la composición.

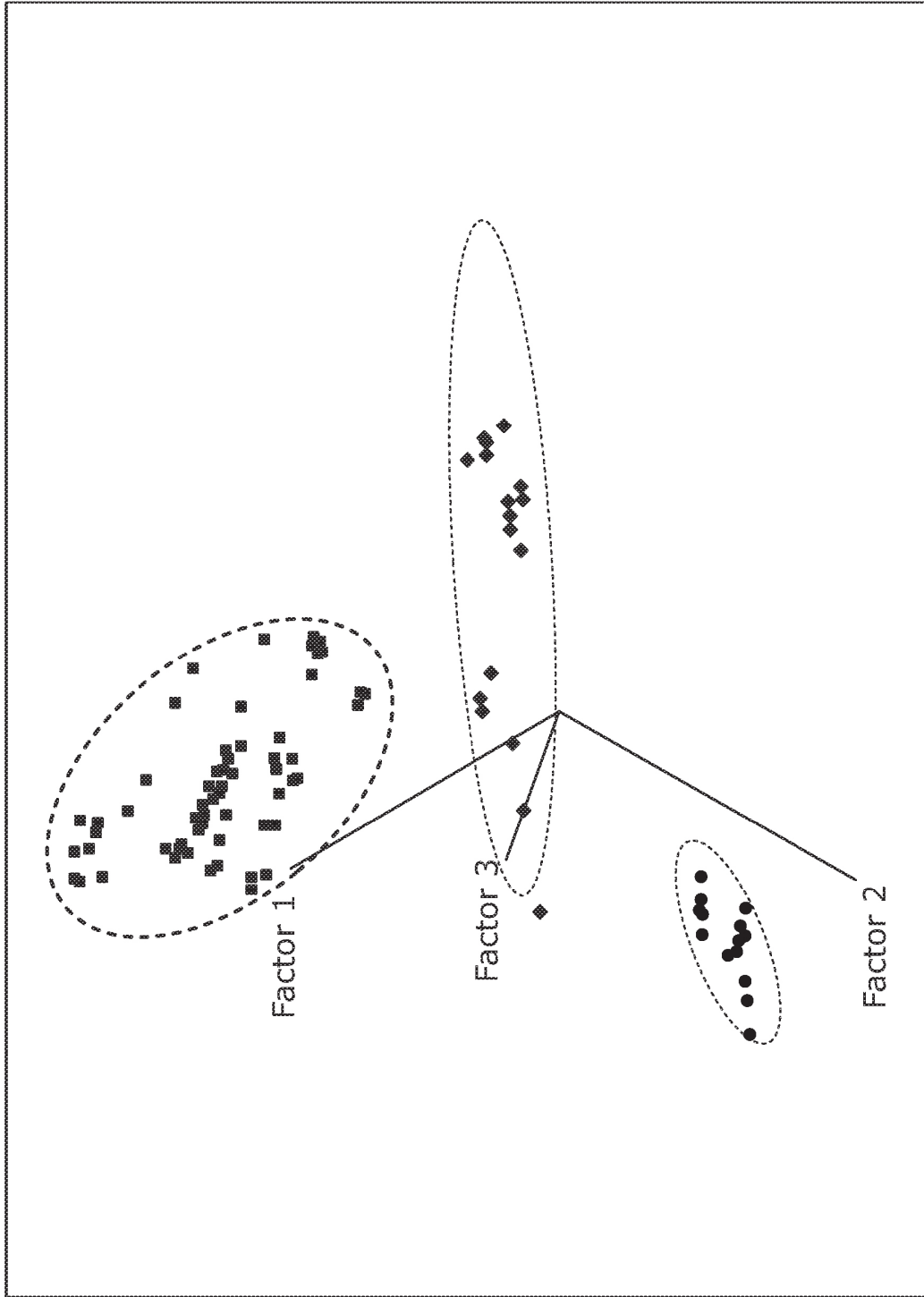


Figura 1

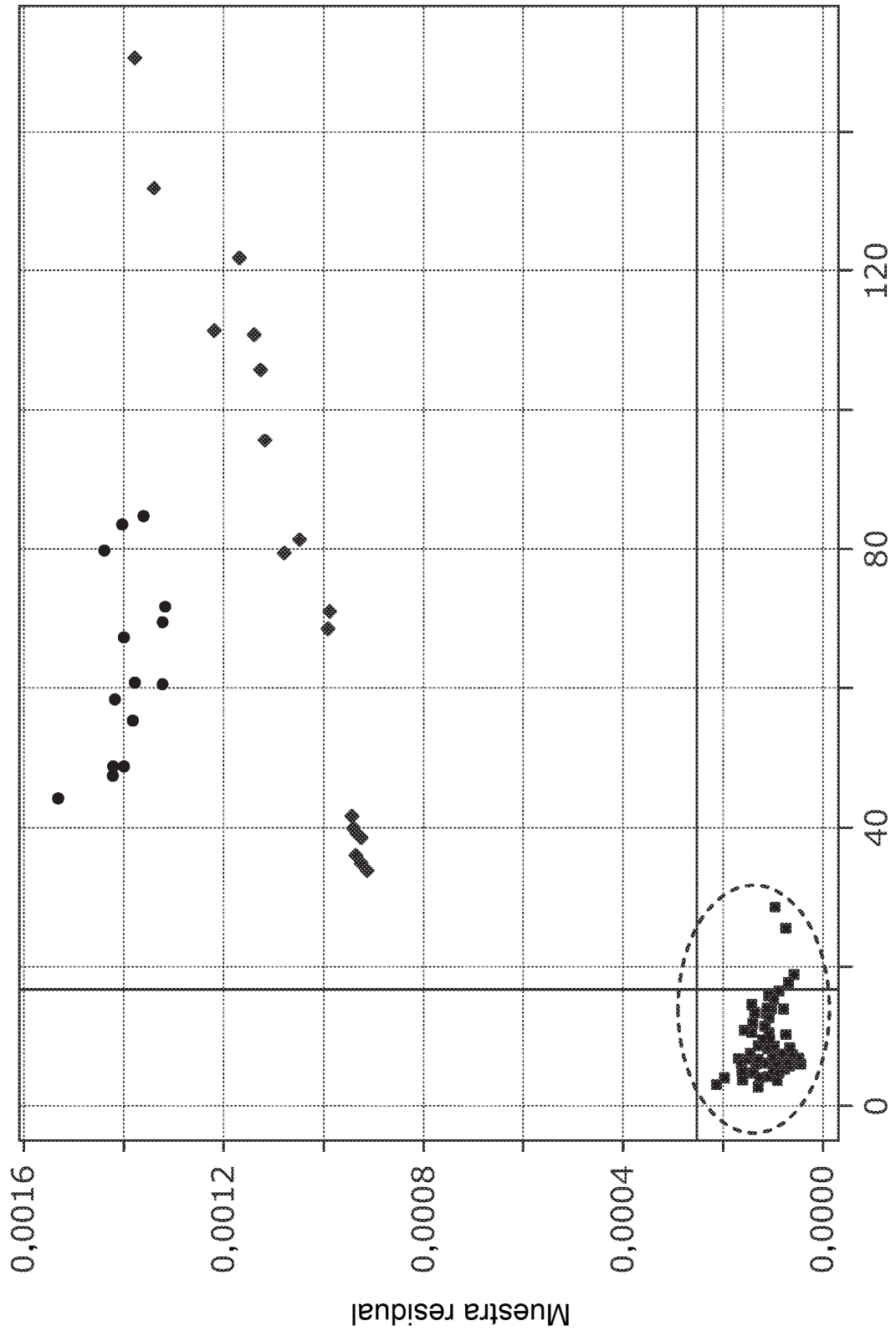


Figura 2

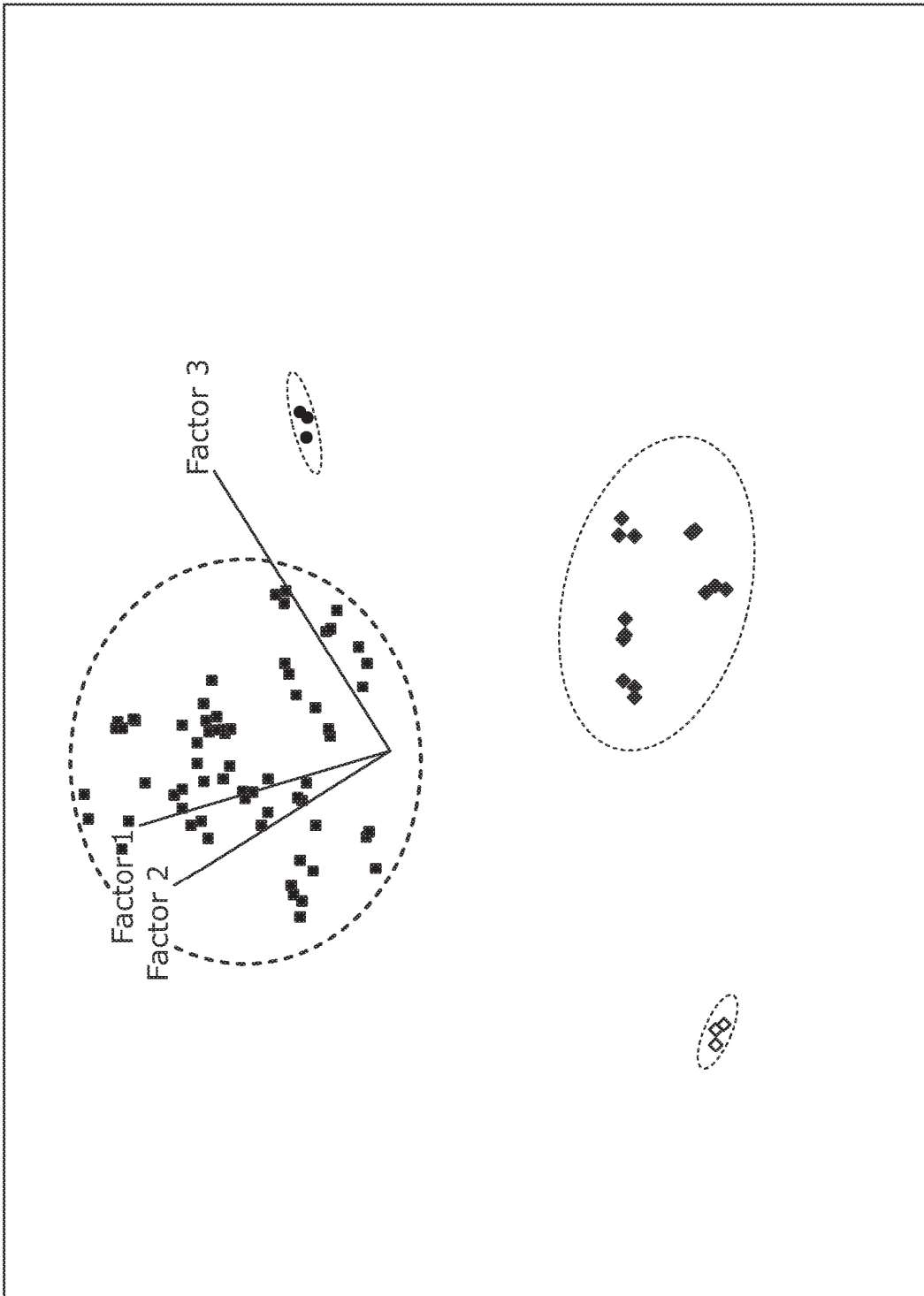


Figura 3

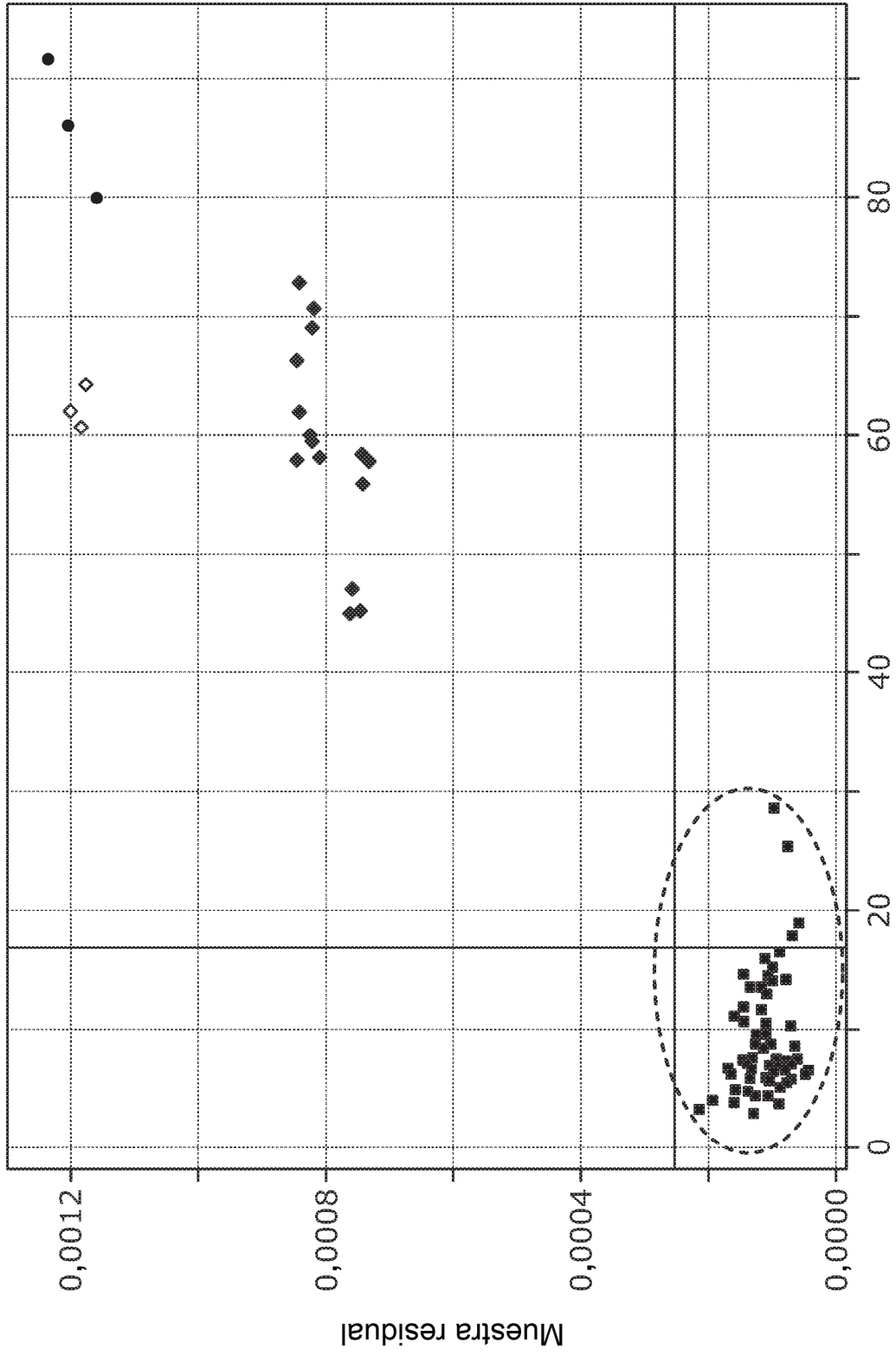


Figura 4

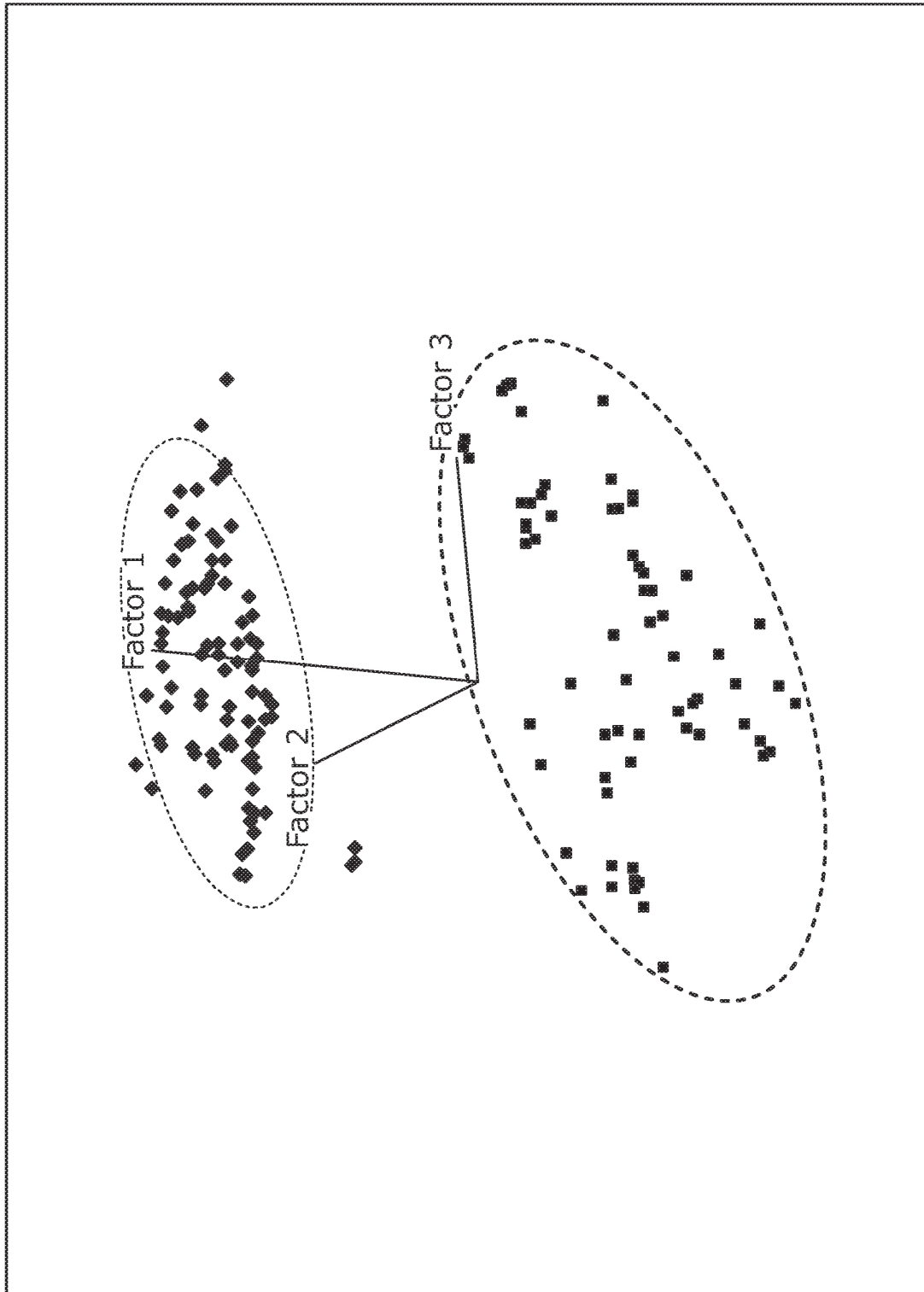


Figura 5

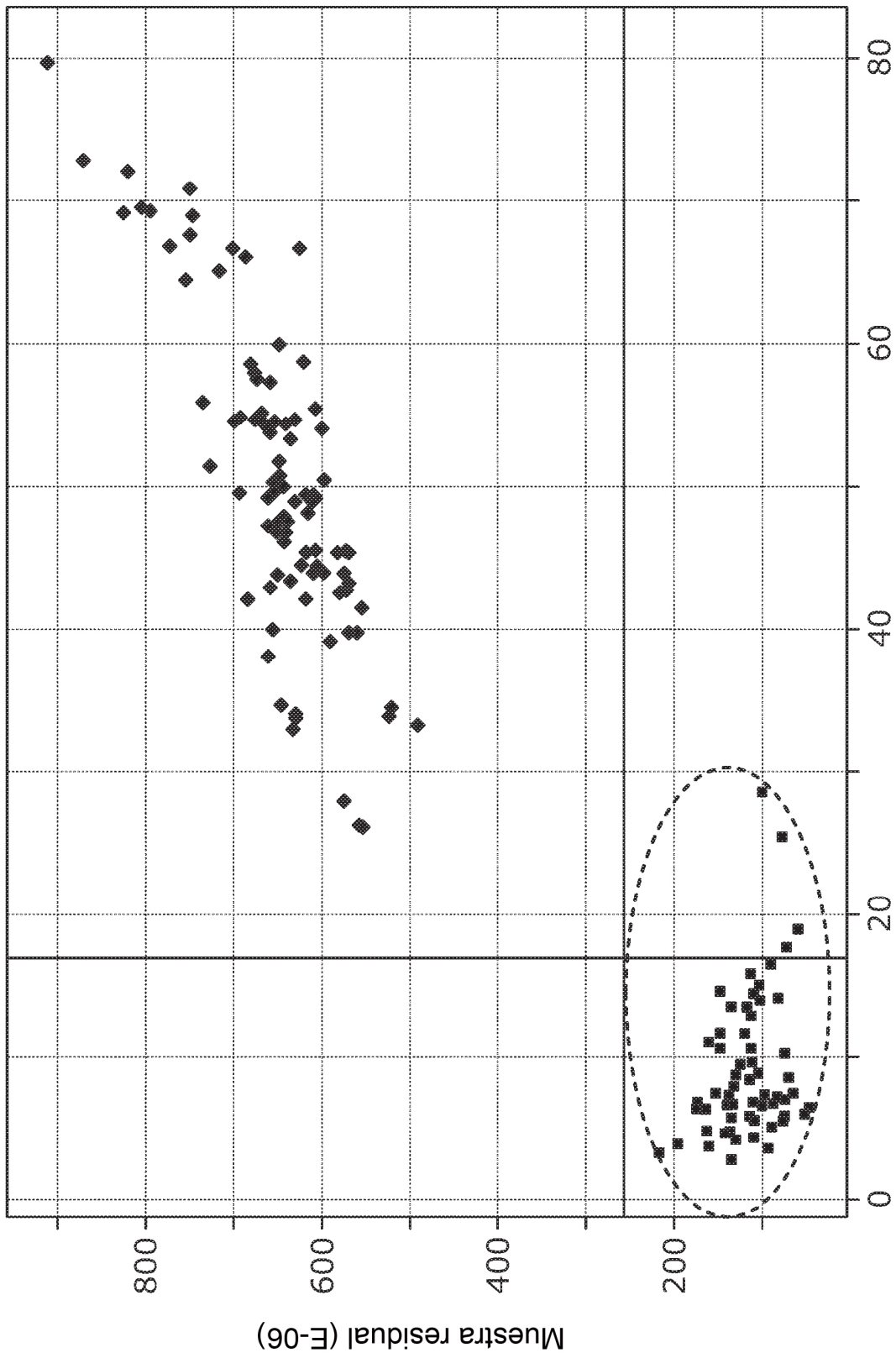


Figura 6

Efecto del tratamiento con N92 sobre la mediana de la duración de la vida en levaduras

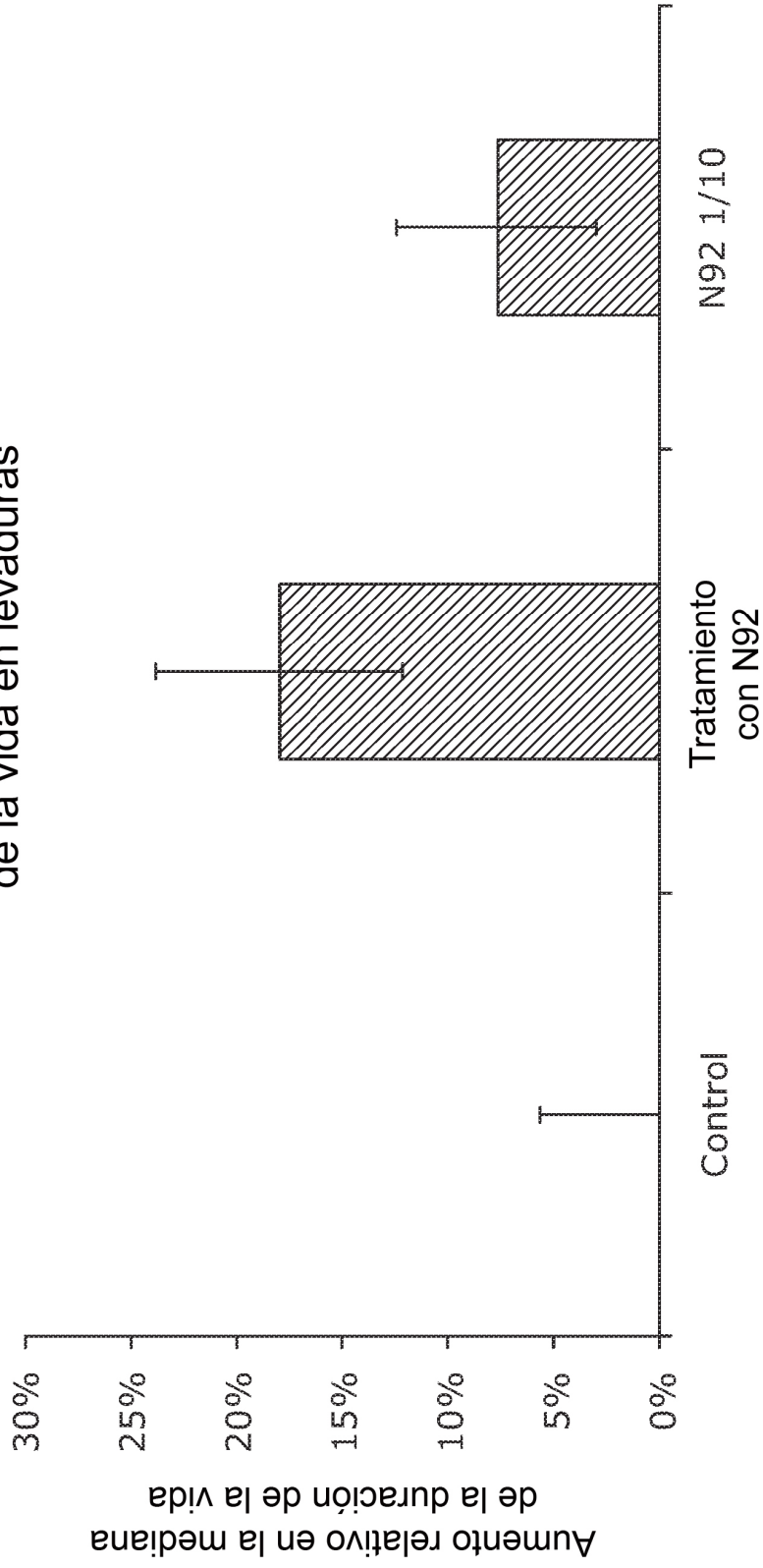


Figura 7

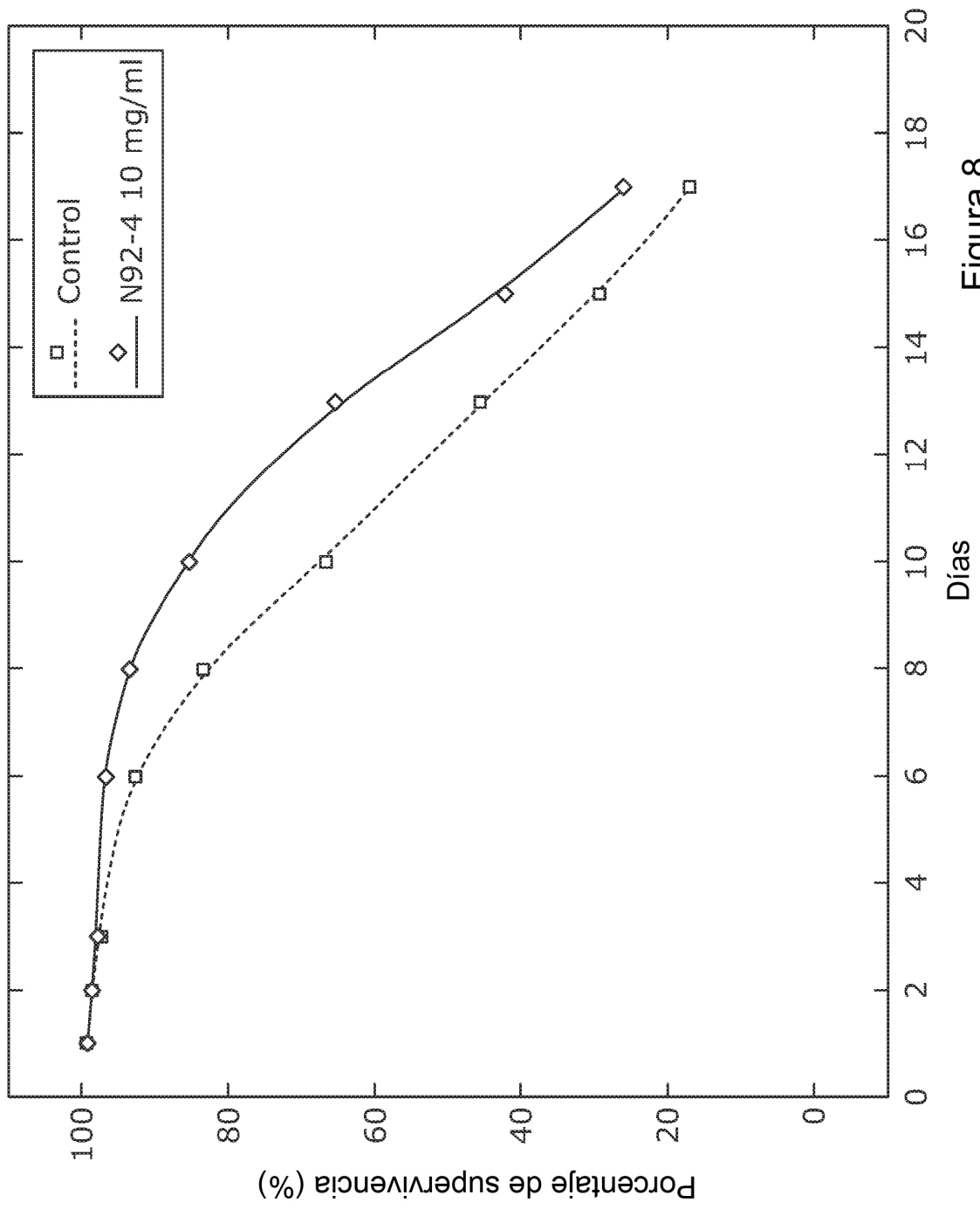


Figura 8

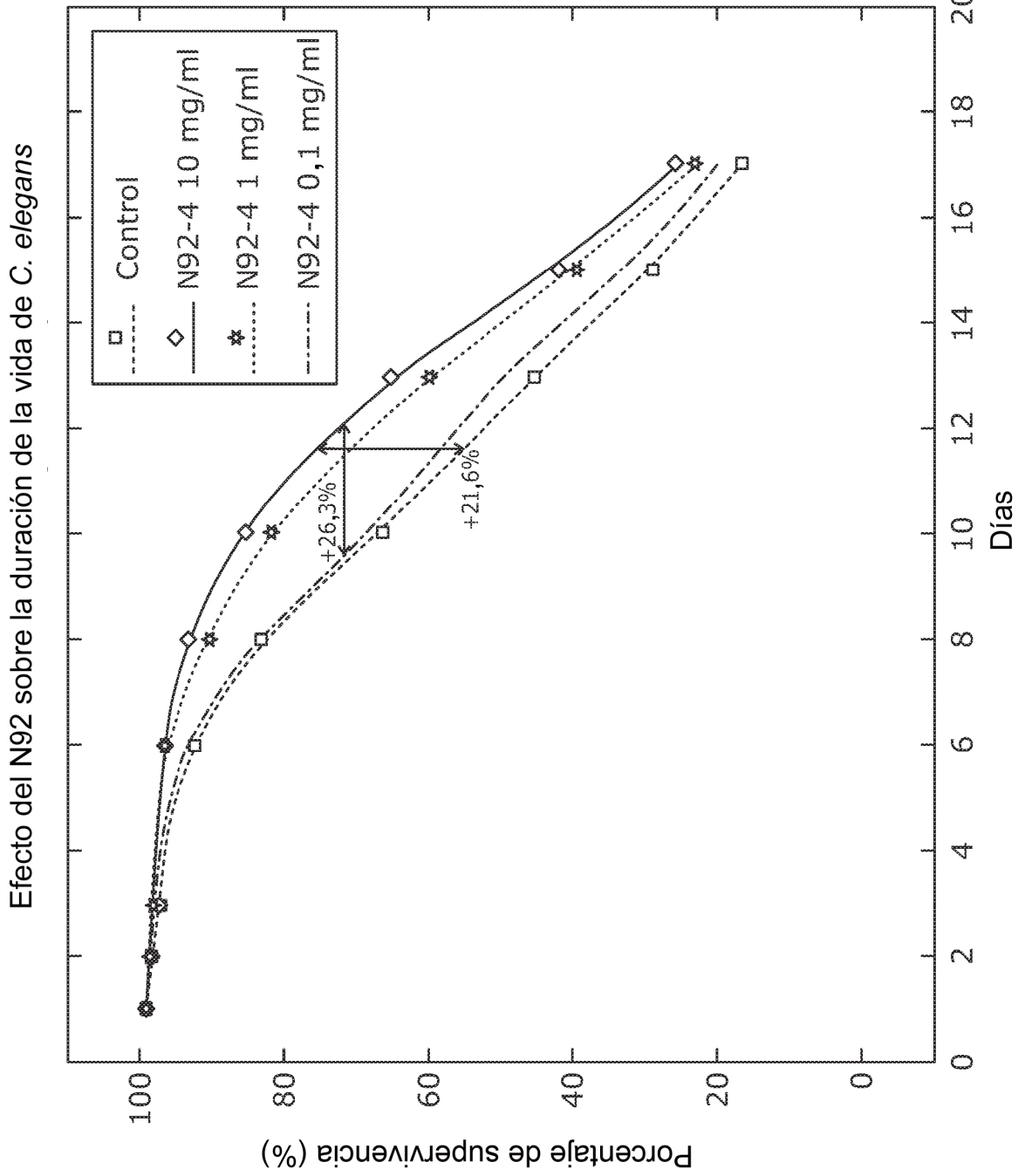


Figura 9

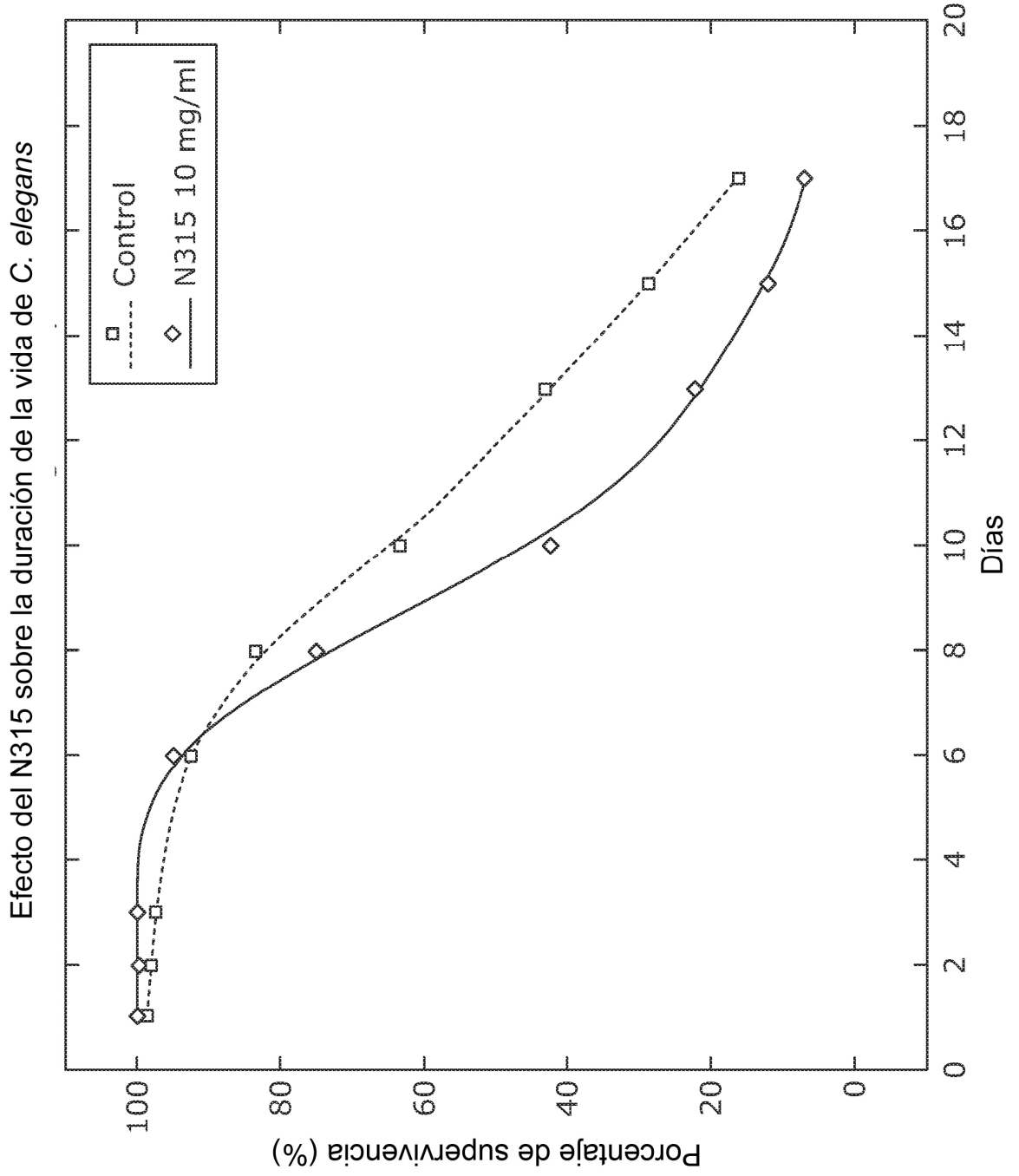


Figura (10a)

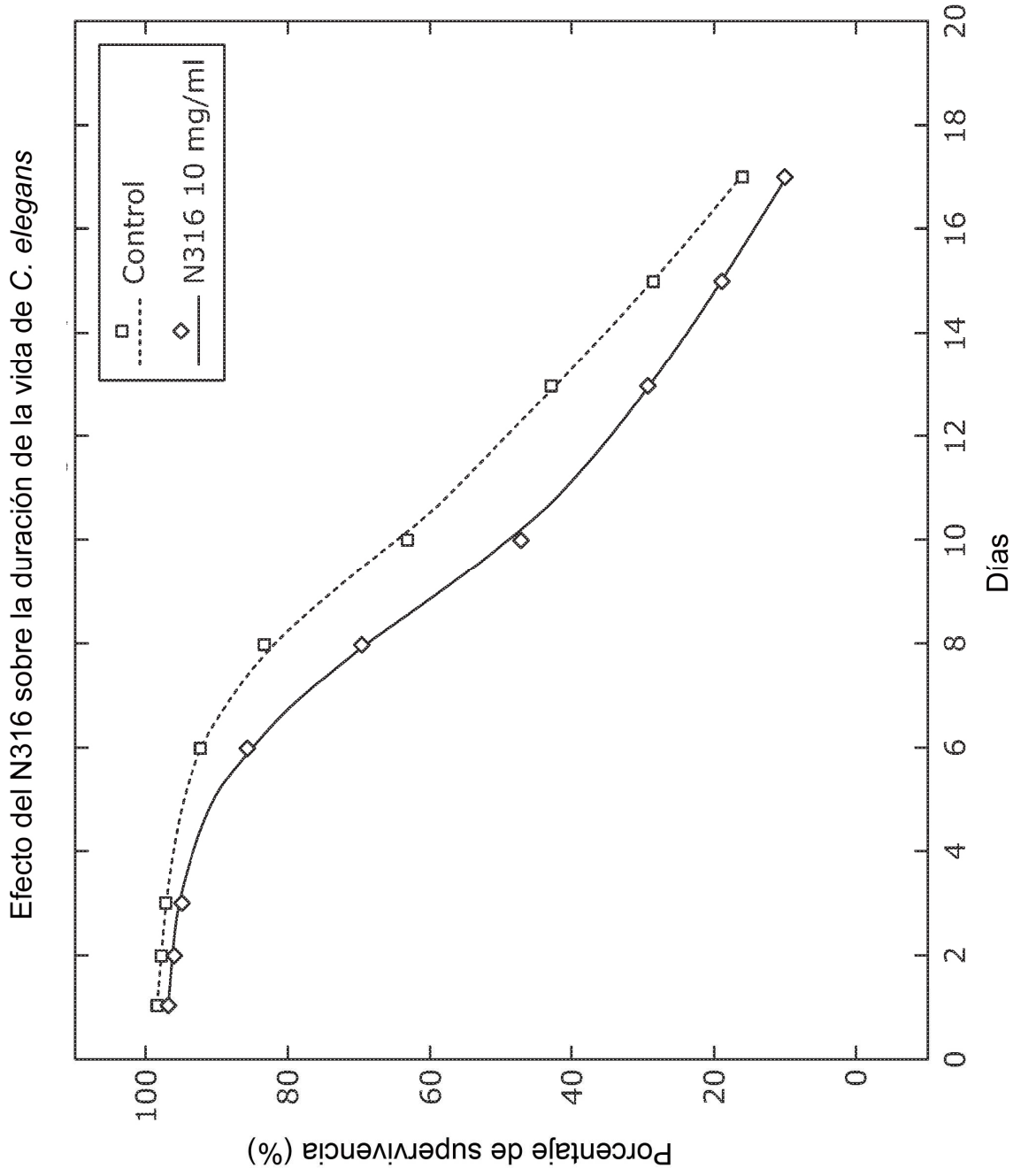
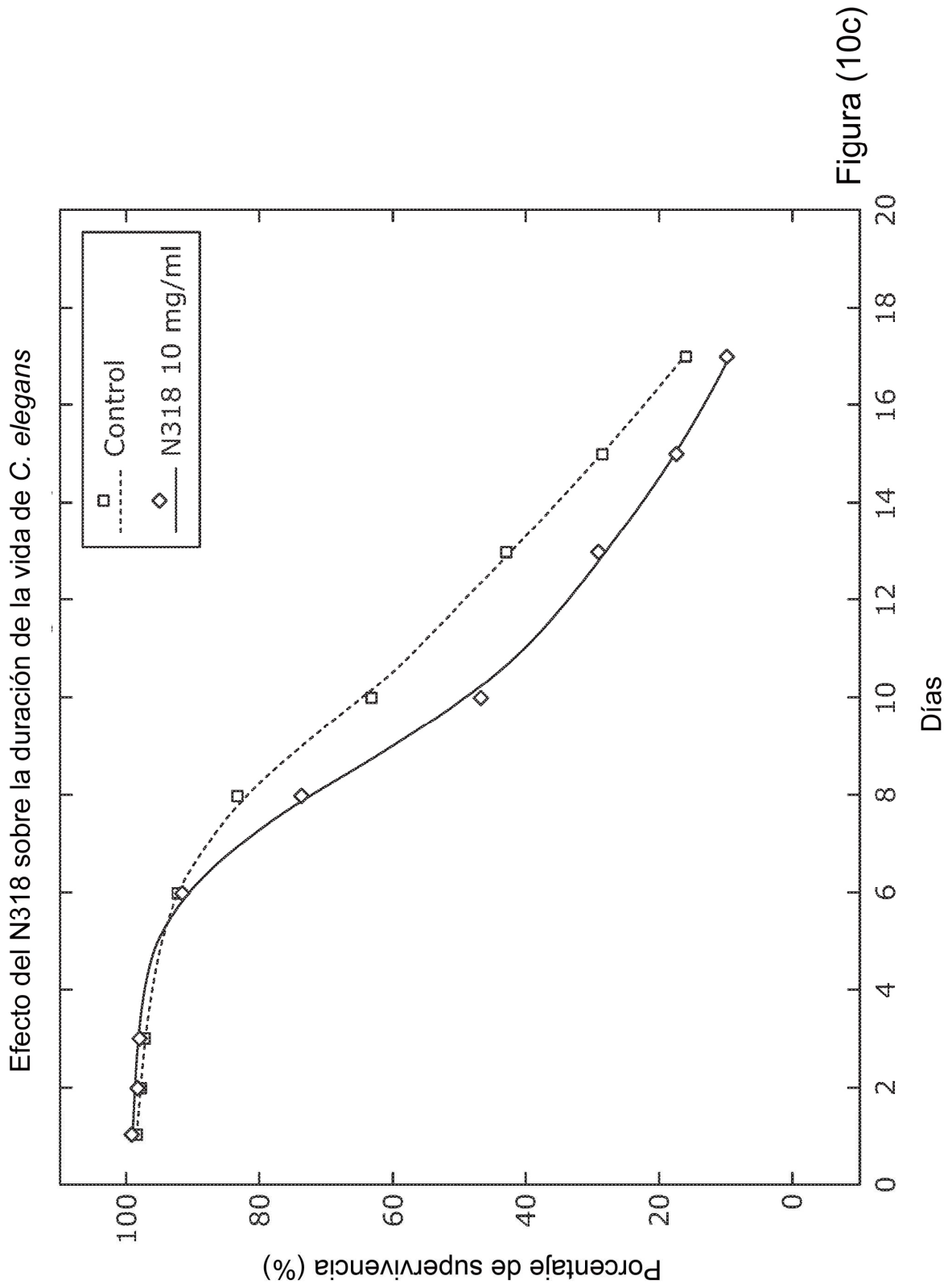


Figura (10b)



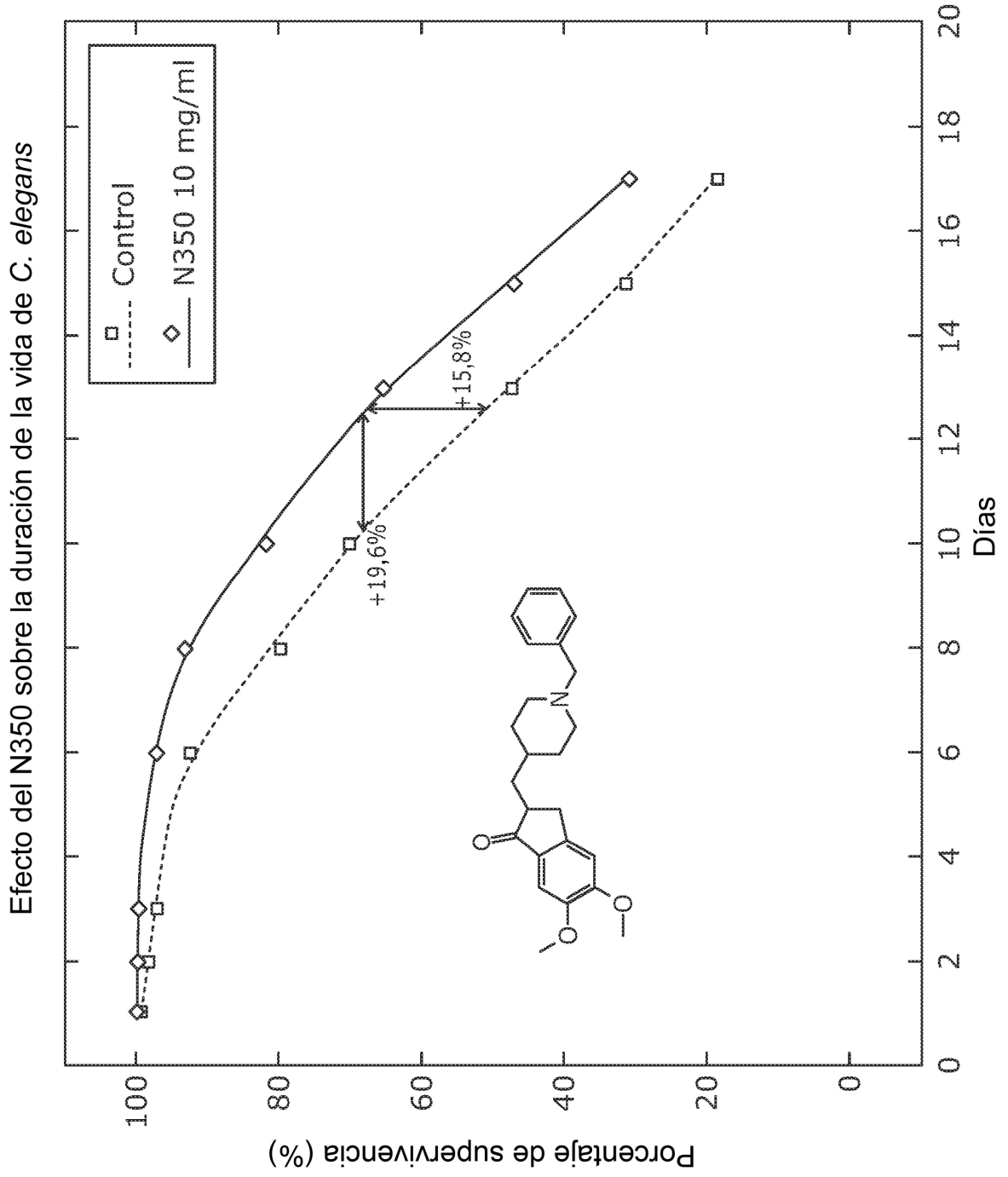


Figura (11a)

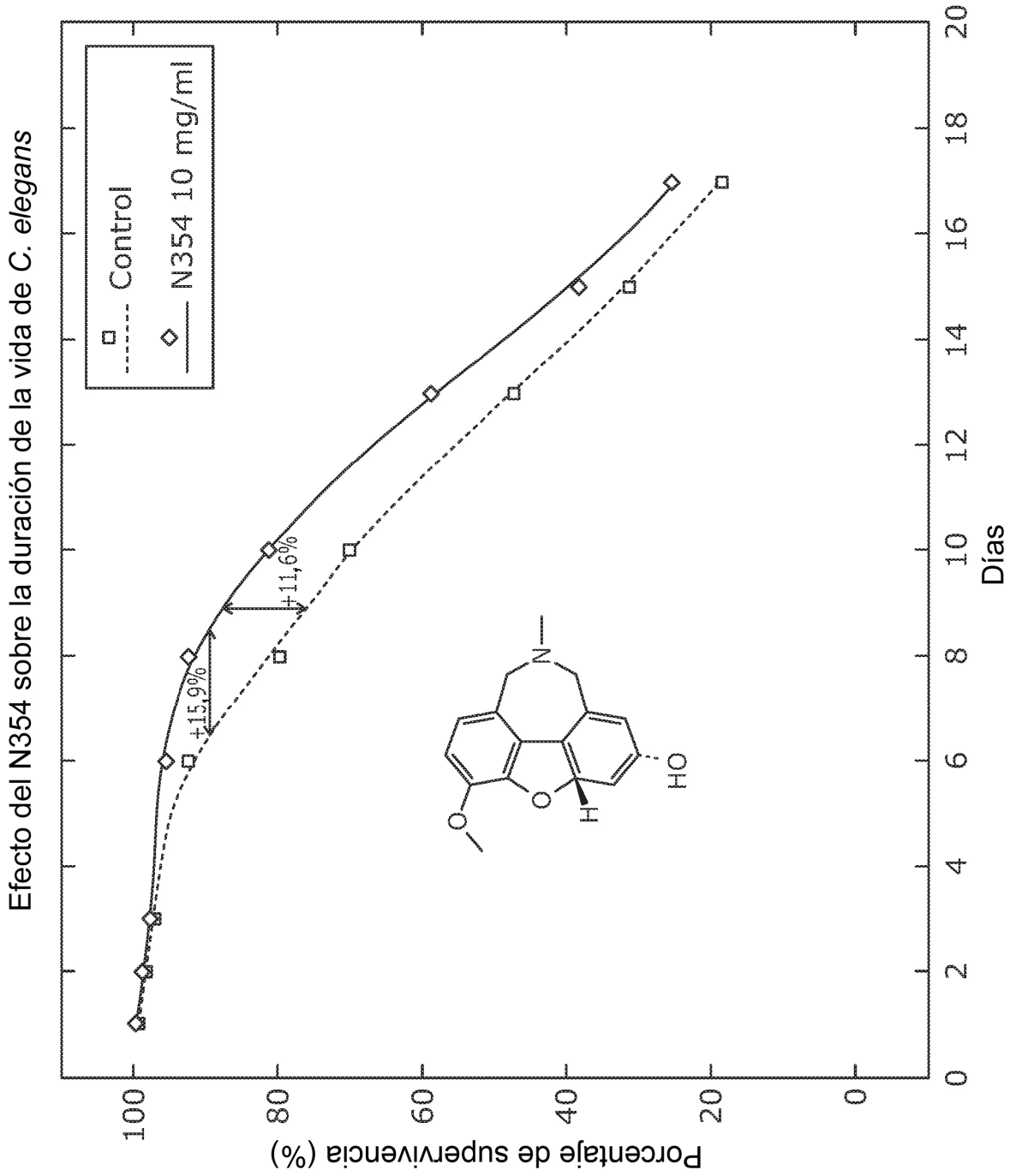


Figura (11b)

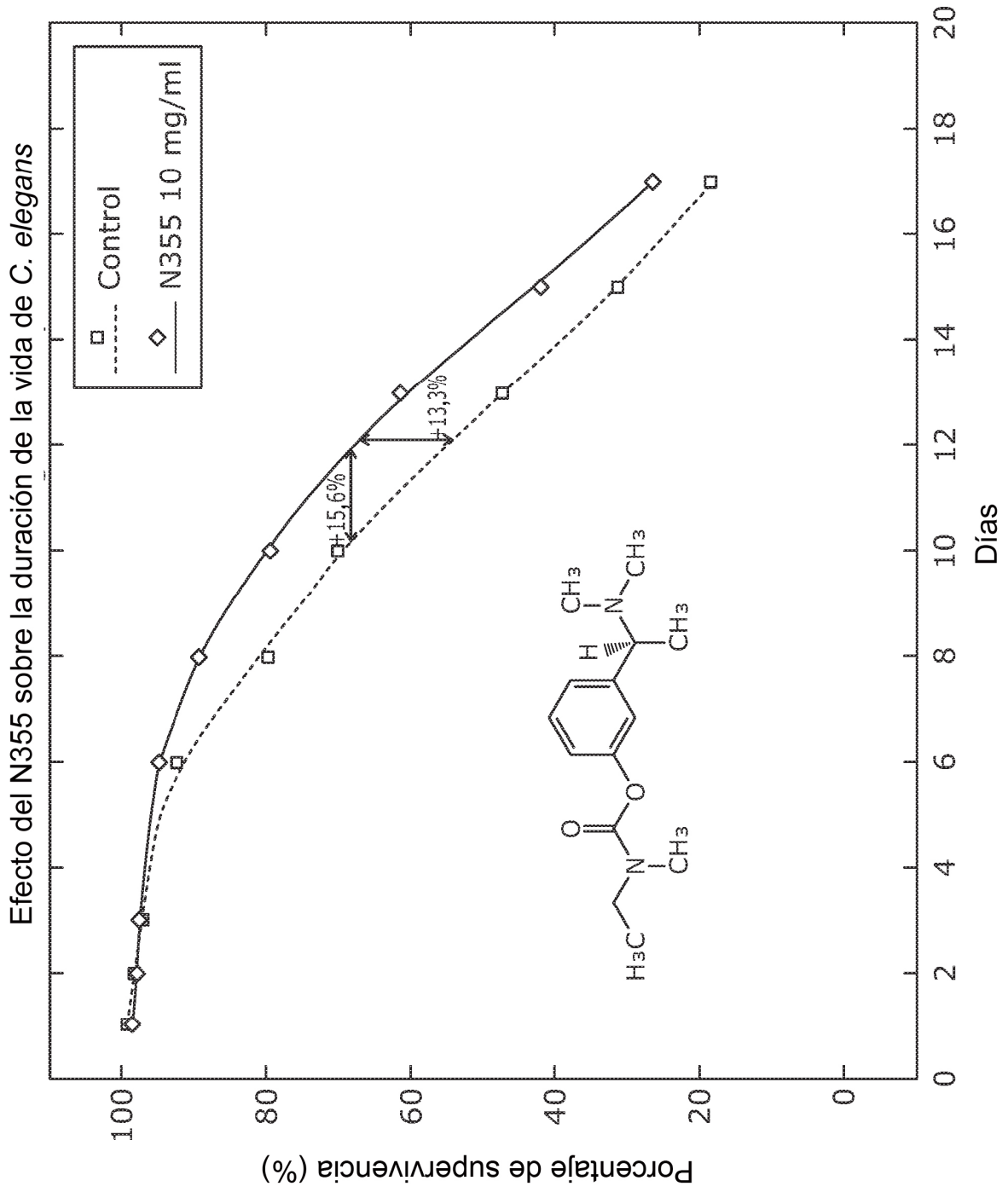


Figura (11c)

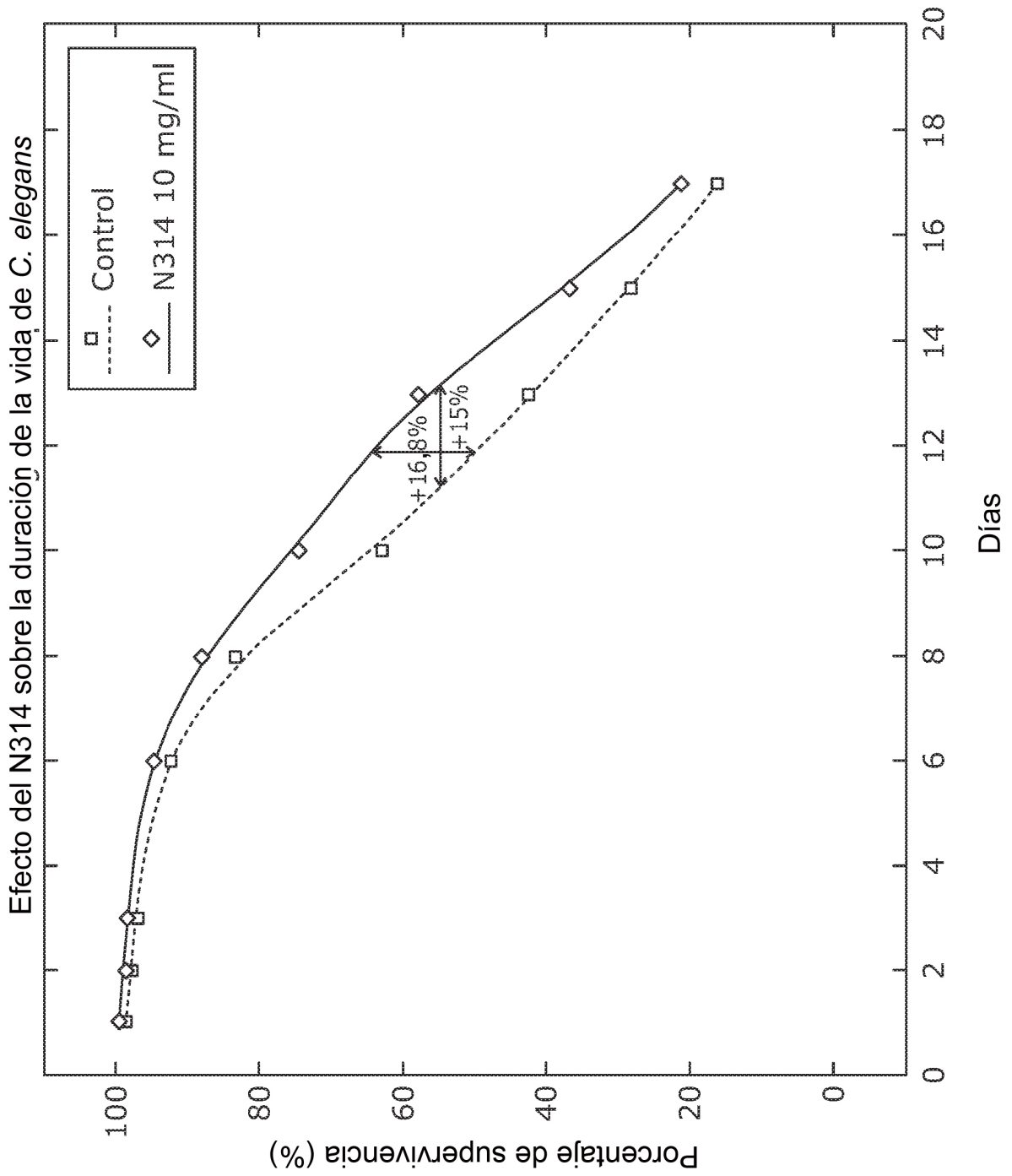


Figura (11d)

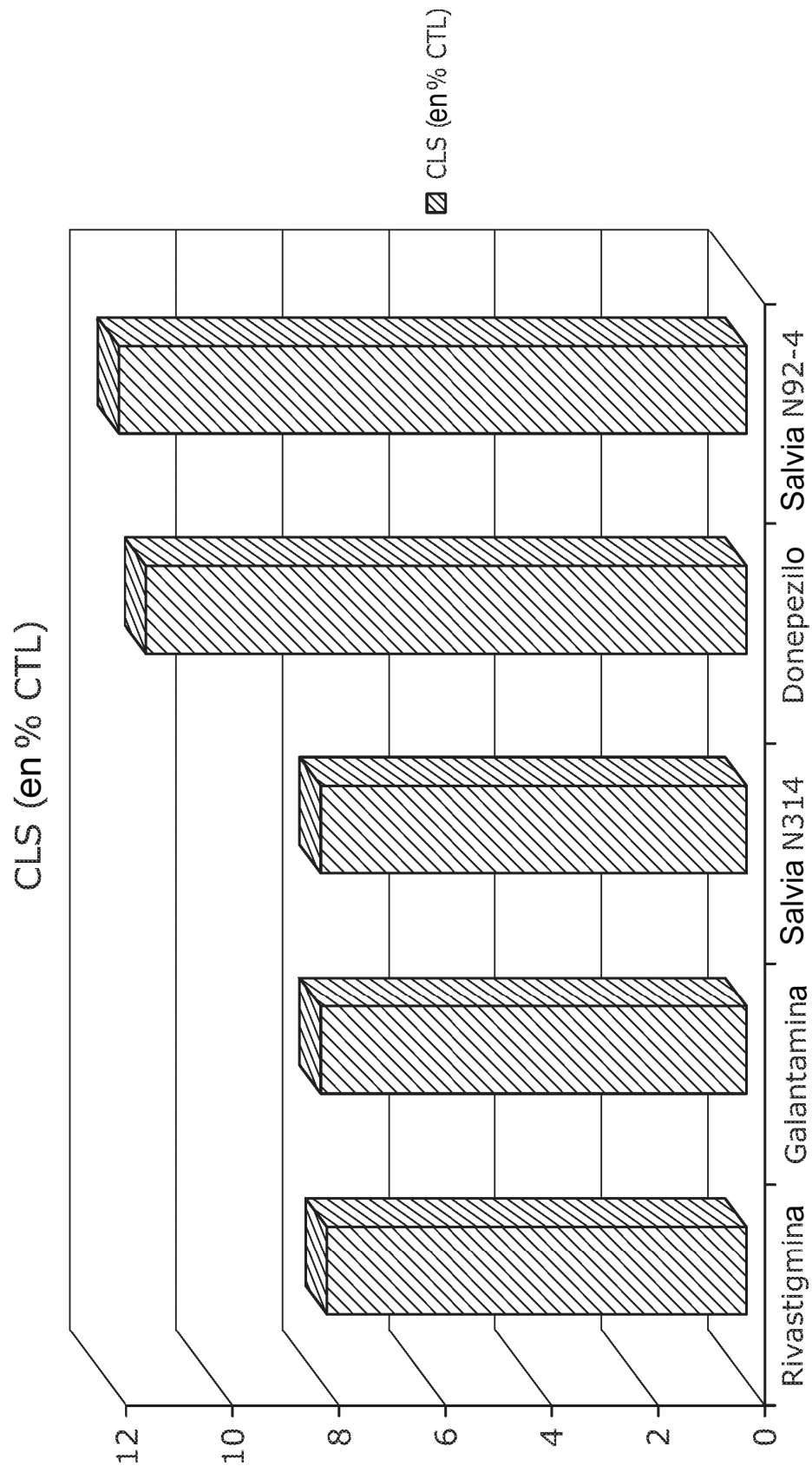


Figura 12