



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 277 557**

⑫ Número de solicitud: 200503202

⑬ Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **21.12.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2007**

Fecha de la concesión: **28.05.2008**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2008**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

⑲ Titular/es: **PROYECTO EMPRESARIAL BRUDY, S.L.**
c/ Riera Sant Miquel, 3 - 2n. 4 A
08006 Barcelona, ES

⑳ Inventor/es: **Domingo Pedrol, Joan Carles**

㉑ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉒ Título: **Utilización de ácido docosahexaenoico para el tratamiento del daño celular oxidativo.**

㉓ Resumen:

Utilización de ácido docosahexaenoico para el tratamiento del daño celular oxidativo.

La presente invención se refiere la utilización del ácido docosahexaenoico para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del daño celular oxidativo.

La administración de DHA posee las siguientes ventajas sustanciales: a) Incremento de la actividad antioxidante celular; b) Ausencia de citotoxicidad celular a las dosis administradas; c) Ausencia de modificaciones significativas en el status oxidante celular a las dosis administradas; y d) Actividad antioxidante celular adaptativa.

ES 2 277 557 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de ácido docosahexaenoico para el tratamiento del daño celular oxidativo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización de un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de procesos que llevan asociado un daño oxidativo.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ácidos grasos omega-3 son necesarios para mantener la integridad funcional celular, y en general son necesarios en la salud humana. El ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), un componente omega-3 importante del aceite de pescado y de las algas marinas, se concentra en el cerebro, en los fotorreceptores y en la sinapsis de la retina. Dietas enriquecidas en DHA son metabolizadas inicialmente por el hígado y después distribuidas a través de las lipoproteínas de la sangre para resolver las necesidades de los diferentes órganos. En general, este lípido se incorpora en los fosfolípidos de la membrana celular y tienen efectos en la composición y en la funcionalidad de la misma, en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), en la oxidación lipídica de la membrana, en la regulación transcripcional, en la biosíntesis de eicosanoides y en la transducción intracelular de la señal. Además, en el sistema nervioso central, el DHA está implicado en el desarrollo de la capacidad de aprendizaje relacionada con la memoria, en las funciones excitables de la membrana, en la biogénesis de las células fotorreceptoras y en la transducción de la señal dependiente de proteína quinasa. Una terapia dietética potencial estaría basada en la corrección de los niveles óptimos de ácidos grasos omega-3 para evitar que determinadas patologías puedan originarse o progresar, tal como patologías inflamatorias, procesos tumorales, enfermedades cardiovasculares, depresión y enfermedades neurológicas.

En el sistema nervioso central, tanto el cerebro como la retina, exhiben una capacidad inusual de retención del DHA incluso en situaciones de privación dietética muy prolongada de ácidos grasos omega-3. Varios estudios han descrito el efecto protector del DHA en las neuronas, donde está presente en niveles muy altos. Por ejemplo, está implicado en la protección de las células neuronales de la muerte por apoptosis. Recientemente, se ha demostrado que el DHA, que se encuentra disminuido en el hipocampo de ratas envejecidas, es capaz de proteger cultivos primarios de dichas células contra la citotoxicidad inducida por el glutamato.

También se ha demostrado que en los fotorreceptores de la retina, el DHA modula los niveles de las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 protegiendo así a los fotorreceptores del daño oxidativo provocado por la exposición a los rayos UV. Los segmentos externos del fotorreceptor de la retina contienen rodopsina así como el contenido más alto en DHA que cualquier otro tipo de célula. El DHA se concentra en los fosfolípidos de las membranas externas del disco del segmento del fotorreceptor. Bajo condiciones de reducción de la concentración de DHA óptima se han observado disfunciones retinianas. La célula epitelial pigmentaria de la retina (RPE) es muy activa en la captación, conservación y transporte de DHA. El alto contenido de DHA en el fotorreceptor y en las células RPE está ligado principalmente a dominios en la membrana con unas características físicas que contribuyen a la modulación de receptores, canales iónicos, transportadores, etc., así como también parece regular la concentración de fosfatidilserina.

Hasta la fecha no se conoce si estos efectos están totalmente mediados por el propio DHA o por algún derivado metabólico. Se han identificado en la retina ciertos derivados del DHA. Aunque los enzimas implicados en la síntesis de dichos derivados no se han identificado con exactitud, hay resultados recientes que sugieren la participación de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) seguida de una lipoxigenasa (LOX). La PLA₂ libera el DHA de los fosfolípidos de membrana y la LOX lo convierte en sus derivados metabólicamente activos.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen durante la función celular normal. Los ROS incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical oxidrilo. Su alta reactividad química conduce a la oxidación de proteínas, del DNA o de lípidos. La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión-peroxidasa (GPx) son las enzimas antioxidantes primarias que protegen contra el daño molecular y celular causado por la presencia de ROS. El estrés oxidativo activa múltiples vías metabólicas; algunas son citoprotectoras, y otras conducen a la muerte de la célula. Estudios recientes indican que el desequilibrio entre la producción y la degradación de los ROS son factores de riesgo importantes en la patogénesis de muchas enfermedades en algunos casos relacionado con un deterioro del sistema antioxidante.

El DHA se presenta como una diana de los ROS que provoca daño en la célula del fotorreceptor y en la RPE. La degeneración retiniana inducida por la luz promueve la pérdida de DHA de los fotorreceptores. Por ejemplo, cuando las células RPE están dañadas o mueren, se deteriora la función del fotorreceptor ya que las células RPE son esenciales para su supervivencia. Así, la muerte de la célula RPE por efecto del estrés oxidativo deteriora la visión, particularmente cuando las células de la mácula están afectadas ya que es la responsable de la agudeza visual. La patofisiología de muchas degeneraciones retinianas (e.g., degeneraciones maculares relativas a la edad y enfermedad de Stargardt) implica estrés oxidativo que conduce a la apoptosis de las células de RPE. De hecho, la apoptosis de la célula RPE parece ser el factor dominante en la degeneración macular observada con la edad. Estos estudios sugieren que dichas células han desarrollado mecanismos antioxidantes muy eficaces para protegerse de su alto contenido en DHA y presentan una notable capacidad adaptativa.

Por otra parte, está perfectamente aceptada la relación entre los radicales libres y el envejecimiento, basado en las evidencias que los radicales libres producidos durante la respiración aerobia causan un daño oxidativo que se acumula, y provoca una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos, una interferencia en los patrones de expresión génica y una pérdida de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte. Existe una interrelación entre la generación de oxidantes, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo. Se han realizado numerosos estudios para determinar si las defensas antioxidantes declinan con la edad. Entre ellos, el análisis de los principales componentes de estas: actividad o expresión de las enzimas SOD, CAT, GPx, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa y la concentración de compuestos de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes. Por ejemplo, la sobreexpresión de SOD y CAT en *Drosophila melanogaster* aumenta la expectativa de vida un 30% y disminuye el daño por oxidación proteico. En este contexto, la exposición del tejido cutáneo *in vitro* e *in vivo* a los rayos UV genera radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno, provocando estrés oxidativo celular, que se ha documentado que contribuye de manera importante al envejecimiento. La exposición excesiva de la piel a la radiación ultravioleta puede dar lugar a un daño agudo o crónico. En condiciones agudas se puede provocar un eritema o quemaduras, mientras que en la sobreexposición crónica aumenta el riesgo de cáncer de piel y de envejecimiento. Además, se sabe que las células cutáneas pueden responder al estrés oxidativo agudo o crónico aumentando la expresión de una variedad de proteínas, tales como las enzimas que están implicadas en el mantenimiento de la integridad de la célula y la resistencia al daño oxidativo.

Debido a la multiplicidad de dobles enlaces, los ácidos grasos omega-3 se consideran dianas moleculares para la generación y propagación de los radicales libres durante los procesos de estrés oxidativo relacionados con la generación de peróxidos lipídicos. Hay resultados contradictorios obtenidos en diferentes estudios respecto a la susceptibilidad frente al estrés oxidativo debido a la suplementación dietética con ácidos grasos omega-3. En algunos estudios en humanos, se ha observado un incremento de la oxidación de las LDL, mientras que en otros no se observó ningún efecto. En estudios con animales, el tratamiento con ácidos grasos omega-3 provoca un aumento o una disminución de la susceptibilidad a la oxidación de las LDL. Por otra parte, una sobreexpresión de los genes implicados en el sistema de defensa antioxidante se ha demostrado en hígado de ratones alimentados con una dieta enriquecida en el aceite de pescados durante 3 meses.

Además, diferentes estudios *in vitro* con una línea celular de origen glial han demostrado que las membranas ricas en ácidos grasos omega-3 son más susceptibles al daño oxidativo. La suplementación a largo plazo de estas células con altas concentraciones de DHA dio lugar a niveles incrementados de peróxidos lipídicos en el medio de cultivo, y un mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis inducida por la exposición a peróxido de hidrógeno. Sin embargo, se ha demostrado que la administración intramniótica de docosahexaenoato de etilo reduce la peroxidación lipídica en los cerebros fetales de las ratas. Este comportamiento se ha sugerido que es por un efecto secuestrante de radicales libres vía la activación de enzimas antioxidantes. Un aumento en la capacidad antioxidante del cerebro es importante para la defensa endógena primaria contra el estrés oxidativo porque el cerebro es relativamente rico en ácidos grasos poliinsaturados y es relativamente pobre en enzimas antioxidantes.

Estos resultados contradictorios sugieren que la hipótesis basada en la premisa de que la oxidación de un ácido graso aumenta como el número de enlaces dobles, no tiene aplicabilidad *in vivo* ya que otros mecanismos potenciales pueden actuar para la disminución del daño oxidativo tales como una estructura tridimensional de los ácidos grasos omega-3 en los lípidos y en las lipoproteínas de la membrana que hacen los dobles enlaces menos susceptibles al ataque de los ROS, la inhibición de enzimas pro-oxidantes como la PLA₂ o la mayor expresión de enzimas antioxidantes.

Descripción de la invención

La presente invención concierne al hallazgo inesperado de que la administración de ácido docosahexaenoico (de aquí en adelante también referido como DHA) ya sea libre o incorporado en un triglicérido, entre otros, actúa como un antioxidante celular.

Por lo tanto, es objeto de la presente invención la utilización del ácido docosahexaenoico para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del daño celular oxidativo.

En la presente invención, la expresión “daño oxidativo celular” significa todo proceso que conlleva un desequilibrio entre la generación y degradación de especies oxidantes celulares con un origen endógeno u exógeno.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han encontrado que el DHA es capaz de inhibir la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS), tanto relacionadas con una inducción dependiente de peróxidos como de superóxidos. Concretamente disminuye la producción de anión superóxido y con ello de todas las especies derivadas que se obtienen en la cascada oxidativa, como por ejemplo una disminución muy importante de la peroxidación lipídica. Además, se ha determinado un incremento en la actividad enzimática antioxidante, lo que sugiere una adaptación de la célula induciendo la expresión de agentes antioxidantes, básicamente enzimas, y reprimiendo la expresión de agentes prooxidantes como la fosfolipasa A₂.

En una realización de la presente invención, dicho ácido docosahexaenoico está incorporado en un monoglicérido, diglicérido, triglicérido, fosfolípido, éster etílico o ácido graso libre. Preferiblemente, dicho ácido docosahexaenoico está incorporado en un triglicérido.

ES 2 277 557 B1

En la presente invención por “ácido docosahexaenoico incorporado en un glicérido” se entiende un glicerol con las tres posiciones esterificadas con ácido docosahexaenoico.

5 La elección del triglicérido como estructura química del DHA se basa en los datos derivados de un estudio en el que se comparaba la biodisponibilidad de cuatro concentrados de ácidos omega-3 en forma de esteres etílicos, fosfolípidos, ácidos grasos libres y triglicéridos después de una administración oral, y que demostraron que los triglicéridos reesterificados presentan una biodisponibilidad superior a las otras preparaciones.

10 En una realización preferida de la presente invención, dicho ácido docosahexaenoico se encuentra en un porcentaje en peso de entre el 20 y el 100% respecto al total de ácidos grasos, preferiblemente entre el 40 y el 100% respecto al total de ácidos grasos y más preferiblemente dicho ácido docosahexaenoico se encuentra en un porcentaje en peso de entre el 66 y el 100% respecto al total de ácidos grasos.

15 Los inventores de la presente invención han comprobado que una célula enriquecida con una composición con DHA, de acuerdo con la invención, está mejor preparada para hacer frente a una nueva situación de estrés oxidativo y minimizar de esta forma los efectos adversos que de ella se puedan derivar. Es decir, la presencia del DHA en las biomembranas induce una respuesta adaptativa celular frente al estrés oxidativo. La respuesta adaptativa es un fenómeno celular por el cual la exposición a un agente tóxico (en concentraciones subletales) provoca una respuesta celular que protegerá posteriormente a la célula contra los efectos deletéreos del mismo tóxico a concentraciones letales, dicho en otras palabras, es un efecto benéfico desencadenado con bajo nivel de exposición a un agente que es dañino a altos niveles.

La administración de DHA posee las siguientes ventajas sustanciales:

- 25 a) Incremento de la actividad antioxidante celular;
- b) Ausencia de citotoxicidad celular a las dosis administradas;
- c) Ausencia de modificaciones significativas en el status oxidante celular a las dosis administradas;
- 30 d) Actividad antioxidante celular adaptativa.

Por todo lo anterior, en una realización preferida la presente invención se refiere a la utilización del ácido docosahexaenoico para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del daño oxidativo celular, siendo dicha patología una patología neurodegenerativa, preferiblemente seleccionada del grupo que comprende: escler

35 clerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y distrofia muscular, entre otras.

En otra realización de la presente invención, la patología asociada a un daño oxidativo es una patología ocular, preferiblemente una seleccionada del grupo que comprende retinosis pigmentaria, degeneración macular y cataratas, entre otras.

40

En aún otra realización, la patología asociada con un daño oxidativo es una patología isquémica, preferiblemente un infarto de miocardio, infarto cerebral, etc.

45 En todavía aún otra realización de la presente invención, la patología asociada con un daño oxidativo es un proceso inflamatorio, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende artritis, vasculitis, glomerulonefritis y lupus eritomatoso, entre otras.

En otra realización preferida, la patología asociada a un daño oxidativo es aterosclerosis.

50

La composición farmacéutica que comprende DHA se puede encontrar en forma de aceite o emulsión, los cuales se pueden administrar por vía oral, sublingual, intravenosa, intramuscular, tópica, subcutánea, rectal o incluso por simple puesta en contacto con los órganos olfativos situados en la entrada de las vías respiratorias del principio activo de la microemulsión de la invención en forma líquida o de vapor. Así la administración puede realizarse por pulverización, nebulización o atomización de las microemulsiones o también la administración puede ser realizada por inhalación.

55

Opcionalmente, dicha composición farmacéutica comprende, además, un segundo principio activo.

60 De la misma manera, la composición farmacéutica que comprende DHA se puede utilizar en la industria alimentaria con el fin de enriquecer los productos alimenticios (p.e. productos lácteos como yogures, leche, etc) con un agente antioxidante natural como el DHA.

Por lo tanto, en otra realización la presente invención dicha composición farmacéutica se administra a un paciente que ya está recibiendo un tratamiento contra una patología asociada a un daño oxidativo.

65

Leyendas de las figuras

Figura 1. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la generación intracelular de ROS. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento. (A) La detección de ROS se realizó con DHR 123 en células tratadas con 40 ó 60 mM de AAPH durante 180 min. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. (B) La detección de ROS se realizó con CDCFDA en células tratadas con el sistema xantina/xantina oxidasa durante 180 min. A modo de comparación se incorporan los datos obtenidos con Vitamina E (control) 100 μ M. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Figura 2. Efecto comparativo de la riqueza en DHA de un triglicérido en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la generación intracelular de ROS. (A) Las células se han cultivado en presencia de cada triglicérido durante tres días antes del experimento. La concentración del eje de las abscisas es la equivalente que obtendría con un triglicérido de una riqueza en DHA del 70% en peso. La detección de ROS se realizó con DHR 123 en células tratadas con 40 mM de AAPH durante 180 min. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. (B) Representación de la protección antioxidante respecto a la concentración en DHA en el aceite del 20, 50 y 70%.

Figura 3. Efecto de la concentración del DHA sobre la producción de TBARS en células Foreskin. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento a la concentración indicada. El estrés oxidativo se ha inducido con AAPH 40 mM durante 6 h y 24 h de latencia. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Figura 4. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la generación de aniones superóxido. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento. La detección de aniones superóxido se realizó por quimioluminiscencia inmediatamente después de la inducción oxidativa de las células con AAPH 40 mM y en algunos experimentos en presencia de Tirón 10 mM o de 0,1875 UA/ μ l de SOD exógena. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 5. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la actividad SOD. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento a una concentración de DHA de 0,5 (A), 5 (B) y 50 μ M (C). La actividad SOD se ha evaluado de forma indirecta mediante el análisis del decremento de la quimioluminiscencia generada por el luminol como consecuencia de la actividad SOD endógena. La inducción oxidativa se ha realizado con el sistema xantina 0,1 mM/xantina oxidasa 0,005 U/ml que genera de forma inmediata aniones superóxido. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 6. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la actividad GPx. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento. La actividad GPx se ha evaluado sobre el sistema celular no inducido o inducido con AAPH 40 mM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 7. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células ARPE-19 sobre la generación intracelular de ROS. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento. (A) La detección de ROS se realizó con DHR 123 (A) o con CDCFDA (B) en células tratadas con 40 ó 60 mM de AAPH durante 180 min. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Figura 8. Efecto comparativo de la riqueza en DHA de un triglicérido en el medio de cultivo de células ARPE-19 sobre la generación intracelular de ROS. Las células se han cultivado en presencia de cada triglicérido durante tres días antes del experimento. La concentración del eje de las abscisas es la equivalente que se obtendría con un triglicérido de una riqueza en DHA del 70% en peso. La detección de ROS se realizó con DHR 123 en células tratadas con 40 mM de AAPH durante 180 min. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. (B) Representación de la protección antioxidante respecto a la concentración en DHA en el aceite del 20, 50 y 70%.

Figura 9. Efecto de la concentración del DHA sobre la producción de TBARS en células ARPE-19. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento a la concentración indicada. El estrés oxidativo se ha inducido con AAPH 40 mM durante 6 h y 24 h de latencia. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Figura 10. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la generación de aniones superóxido. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos grasos durante tres días antes del experimento. La detección de aniones superóxido se realizó por quimioluminiscencia inmediatamente después de la inducción oxidativa de las células con AAPH 40 mM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 11. Efecto de la concentración de DHA en el medio de cultivo de células Foreskin sobre la actividad GPx. Las células se han cultivado en presencia de un triglicérido con un 70% en peso de DHA respecto al total de ácidos

grasos durante tres días antes del experimento. La actividad GPx se ha evaluado sobre el sistema celular no inducido o inducido con AAPH 40 mM. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación se incluyen los siguientes ejemplos a modo ilustrativo y no limitativos de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos para evaluar la actividad antioxidante

Cultivos celulares

Como modelos celulares se han utilizado células Foreskin (fibroblastos de epidermis no diferenciados, CRL-2076) y células ARPE-19 (células epiteliales pigmentarias de retina, CRL-2302) que se han obtenido de la American Type Culture Collection. Los cultivos celulares se han mantenido en las condiciones adecuadas de crecimiento: temperatura (37°C), concentración de CO₂ (5%) y humedad (95%) en un incubador especial para esta finalidad. Las células ARPE-19 se mantienen en crecimiento hasta confluencia de 0,3 x 10⁴ células/cm² en frascos de cultivo con medio DMEM-F12 (Biological Industries) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) y glutamina (Biological Industries). Los fibroblastos CRL-2076 se mantienen en crecimiento en frascos de cultivo en medio Dulbecco modificado por Iscove (Biological Industries) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) y glutamina (Biological Industries). Las células son traspasadas para adherencia al sustrato 24 h a 37°C desde los frascos de 75 ml a placas de 6, 12 o 96 pocillos para poder realizar el experimento (10⁶ células/mL).

Integración del DHA a las células

Se añadió el DHA-TG en concentraciones diferentes (0,5-50 µM) partiendo de DHA-TG con una riqueza del 20, 50 y 70% (densidad del aceite 0,92 g/mL), disolviendo el aceite en etanol para la solución stock (1:100) y preparando las soluciones de trabajo en medio de cultivo acondicionado con suero. Las células se cultivaron con medio suplementado de DHA-TG durante 3 días a 37°C.

Inducción de estrés oxidativo

Se usaron para estresar oxidativamente a las células diferentes inductores:

- a) sistema xantina/xantina oxidasa 0,8 mM/10⁻² U/mL que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico, con reducción del O₂ a O₂⁻² y H₂O₂.
- b) 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) 1-100 mM ampliamente usado como iniciador hidrofílico de radicales libres por inducción de la peroxidación lipídica y proteico. El AAPH oxida al DNA, a las proteínas y a los lípidos por acción de los peroxil radicales formados. Además actúa a nivel del sistema de defensa endógeno, ya que inactiva el enzima clave, la SOD, con lo que pierde la capacidad protectora de la CAT y de la GPx.

Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

El nivel de ROS fue medido en cultivos primarios de fibroblastos humanos de piel CRL-2076 y en células epiteliales de retina ARPE-19 empleando la técnica fluorimétrica usando como sondas fluorescentes dihidrorodamina 123 (DHR123, Molecular Probes) y diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (H₂DCFDA, Molecular Probes) en un sistema continuo midiendo cada 30 min hasta 180 minutos. En ambos casos se trata de una medida inespecífica de la generación de ROS. Las sondas fluorescentes se añadieron a las células (1 x 10⁶ células/mL) a una concentración final de 10 µM. La fluorescencia de las sondas oxidadas (2,7-diclorofluoresceína y rodamina 123) fue medida en un lector de fluorescencia Mithras a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm en función del tiempo. La fluorescencia obtenida se modula con las determinaciones de viabilidad celular por la técnica espectrofotométrica del MTT abajo reseñada.

Viabilidad celular

Para evaluar el efecto citotóxico de las diferentes muestras se han realizado estudios de viabilidad celular. Este método consiste en la adición del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma), soluble en medio acuoso, al medio de incubación. Las células viables metabolizan este compuesto y es convertido en sal de formazán. Esta sal es un compuesto colorimétrico insoluble en medio acuoso, soluble en DMSO y que se puede usar como una medida de la viabilidad celular. El método consiste en la adición de 20 µl por pocillo de una disolución de MTT de 7.5 mg/ml (en exceso). Se incuba durante una hora a 37°C de forma que las células viables metabolizan el compuesto y produzcan la sal formazán mientras que las no viables no lo metabolizarán. Tras una hora de incubación se precipitan las células y se añaden 100 µl de DMSO, el cual disolverá la sal formazán. Por último se mide la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad. Se han realizado curvas de viabilidad celular en placas de 96 pocillos sembrando unas 20.000 células por pocillo (tras

un análisis del número de células idóneo en función de su ratio de crecimiento) con un volumen aproximado de 200 μ l de medio por pocillo. El estudio de la eficiencia del producto se realiza después de la exposición de las células al producto durante 72 h en un intervalo de concentraciones lo suficientemente amplio para determinar el valor de la IC_{50} . Los resultados experimentales se han ajustado a la ecuación de Hill mediante el software Sigma Plot 8.0 para determinar la IC_{50} , definida como la concentración de DHA necesaria para disminuir la viabilidad del cultivo al 50% respecto al control.

Determinación de proteínas

La determinación se basa en la detección colorimétrica y cuantificación total de las proteínas con una formulación ácida bicinconílica optimizada que permite medir proteínas en muestras diluidas en un rango de concentración de 0.5-20 μ g/ml. El método emplea un detector de Cu^{+1} , el cual es reducido por las proteínas en medio alcalino a Cu^{+2} . El producto púrpura de reacción se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con el ión cuproso. El complejo soluble en agua absorbe a 562 nm. Mediante una curva de calibración obtenemos una ecuación, obteniendo los resultados expresados en μ g/mL de proteínas. El kit comercial empleado es el MicroBCA de Pierce (N° 23235).

Análisis directo de la generación de ROS

Medida de generación de hidroperóxidos lipídicos

Se empleó la medida del malonildialdehído (MDA) en lisados celulares como marcador de peroxidación lipídica por espectrofotometría UV-Vis. El MDA y los 4-hidroxi-alquienals (HAE) son productos derivados de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres relacionados. La medida directa de estos aldehídos constituye un índice conveniente de la peroxidación lipídica. Se empleó un reactivo cromogénico (N-metil-2-fenil-indol en acetonitrilo) que reacciona con el MDA a 45°C utilizando el kit comercial de peroxidación lipídica de Calbiochem (N° 437634). La condensación de una molécula de MDA con dos moléculas del reactivo cromogénico da un cromóforo estable con máxima absorbancia a 586 nm siendo el límite de detección de 0.1 μ M. La inducción se realizó durante 6 h con AAPH 40 mM y 24 horas de latencia. Se lisaron las células (10^7 células/mL) mediante ciclos de congelación y descongelación en N_2 líquido. Se fraccionaron las muestras para medir MDA y proteína. Los resultados se expresaron en μ M de MDA/mg de proteínas.

Medida de generación de anión superóxido

La medida directa del anión superóxido se realizó mediante la técnica de Quimioluminiscencia en microplaca mediada por luminol (Calbiochem, N° 574590). La quimioluminiscencia para la detección del anión superóxido es una técnica empleada debido a su potencial para acceder a todos los sitios intracelulares de generación de superóxido, por la alta especificidad de la reacción con luminol, por la mínima toxicidad intracelular y la sensibilidad incrementada respecto a otras técnicas químicas. Su fundamento es que el anión superóxido oxida al luminol en una reacción que produce fotones de luz que son rápidamente medidos en un luminómetro estándar. En nuestros ensayos empleamos un lector de quimioluminiscencia en microplaca de ELISA, MITHRAS y además, dado la corta vida media del radical, se empleó un *enhancer* para incrementar la sensibilidad del ensayo y amplificar la respuesta. Debido a que este reactivo no es tóxico y no desnaturaliza los componentes de los sistemas subcelulares, puede ser usado en células vivas. También se investigó la capacidad de inhibir la producción de anión superóxido utilizando un secuestrante específico de anión superóxido, el tirón (ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno disulfónico, Sigma) empleado frecuentemente para ensayos *in vitro* de bloqueo en la producción de ROS siendo permeable a la membrana celular y por otra parte, se empleó superóxido dismutasa (SOD, Sigma) como bloqueante enzimático, que constituye una enzima de primera línea en la defensa antioxidante endógena. La medida de quimioluminiscencia en las células sometidas al tratamiento inductor de estrés oxidativo con AAPH se analizó cada 60 segundos durante un tiempo total de medida de 4100 segundos, a una frecuencia de 120 seg/ciclo. Se expresaron los resultados en UA de quimioluminiscencia/mg proteína.

Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Medida de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

La GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos a glutatión reducido y la función es proteger a la célula del daño oxidativo. Usa glutatión como último donante de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína. La medida indirecta de GPx se obtiene por la reacción acoplada con glutatión reductasa. El glutatión oxidado (GSSG) producido por la reacción con los hidroperóxidos por acción de la GPx es reciclado a su estado reducido por la glutatión reductasa usando como coenzima el NADPH. La oxidación de NADPH a $NADP^+$ se acompaña de la disminución de su absorbancia a 340 nm. La tasa de disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx de la muestra. Para la detección de la GPx en lisados celulares de cultivos primarios se empleó el kit espectrofotométrico en microplaca de ELISA de Cayman (N° 703102). Se cultivaron las células por adherencia al sustrato 24 h a 37°C. El lisado celular se obtuvo por sonicación en Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM y DTT 1 mM. La actividad de la GPx se obtiene determinando el cambio de A_{340} nm/min (ΔA_{340}) se expresa como nanomoles $NADPH$ /min/mg de proteína de la muestra.

Medida de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Esta metodología quimioluminiscente se basa en el análisis de la actividad SOD en el sobrenadante celular respecto a un control positivo de SOD (Calbiochem N° 574590). La presencia de SOD en el sistema xantina oxidasa-xantina-luminol provoca una disminución de la quimioluminiscencia producida como consecuencia de la dismutación del anión superóxido proporcional a la actividad SOD. El análisis se realiza en un luminómetro MITHRAS a intervalos de 50 mseg hasta un tiempo de reacción final de 520 seg.

Evaluación de la actividad antioxidante del DHA en un modelo de piel humano

En el presente estudio *in vitro* se han utilizado como modelo celular, células Foreskin (fibroblastos de epidermis no diferenciados, ATCC CRL-2076) que constituyen un tipo celular adecuado por su buena respuesta *in vitro* a diferentes inductores oxidantes, además de ser un cultivo primario con requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo normales, y constituye un buen modelo *in vitro* extrapolable a la respuesta *in vivo*, para una potencial aplicación cosmética del DHA.

Resultados

Inicialmente, se han establecido las condiciones necesarias para disponer de un modelo celular activo en todas las condiciones de estudio. Esto quiere decir que los resultados obtenidos hacen referencia a células metabólicamente activas. Estudios previos ya habían demostrado que en células Foreskin concentraciones inferiores a 1000 μM de DHA no afectaban a la viabilidad celular en estudios a 3 días. Tampoco se ve afectada la viabilidad celular durante los estudios de estrés oxidativo con el sistema xantina/xantina oxidasa o con AAPH. También, se ha demostrado que la incorporación de DHA hasta una concentración de 50 μM en un cultivo de células Foreskin durante 3 días no incrementa de manera significativa el nivel oxidativo celular medido como la fluorescencia celular asociada a dos sondas, la dihidrorodamina (DHR 123) y la 2,7-diclorofluoresceína (H_2DCFDA), más específica para anión superóxido y para la detección de hidropéroxidos, respectivamente. Una vez establecidas estas condiciones se procedió a evaluar la capacidad antioxidante general del DHA incorporado en la membrana de las células Foreskin frente al estrés oxidativo inducido por xantina/xantina oxidasa o por AAPH.

Al inducir un estrés oxidativo moderado con AAPH 40 mM y usando la DHR123 como detector de ROS, el DHA muestra un efecto inhibitor en la generación de las especies reactivas del oxígeno, tanto a la concentración de 0,5 μM (59% de protección) como a 5 μM (33% de protección), presentando un menor efecto a 10 μM (26% de protección) o nulo a 50 μM de DHA (Fig. 1A). Cuando las células se someten a una inducción severa con AAPH 60 mM, el DHA muestra un efecto protector frente a la generación de ROS, tanto a la concentración 0,5 μM (40% de protección) como a 5 μM (29% de protección) perdiéndolo a concentraciones superiores de DHA (Fig. 1A).

También podemos destacar la protección que ejerce el DHA 0,5 μM contra el estrés oxidativo inducido por la xantina/xantina oxidasa (Fig. 1B), lo que muestra un efecto secuestrante de las especies reactivas del oxígeno, tanto anión superóxido como hidropéroxidos generados en el proceso oxidativo. Comparando la capacidad antioxidante respecto a un antioxidante lipofílico como es la vitamina E (Fig. 1B), observamos que ejercen una cinética de protección semejante (el DHA inhibe un 33,46% la oxidación celular y la vitamina E un 30%).

El comportamiento en la cinética de protección del DHA presenta siempre un máximo efecto antioxidante entre los 60-120 minutos de efectuada la inducción, denotando una saturación en la capacidad secuestrante de hidropéroxidos y anión superóxido del DHA. El comportamiento antioxidante es dosis dependiente de modo crítico, ya que al aumentar la concentración del mismo pierde la capacidad secuestrante de ROS siendo la concentración de 0,5 μM la más efectiva en su capacidad antioxidante. En este sentido otro parámetro crítico a nivel de optimización de la eficiencia del sistema es la proporción de DHA respecto al total de ácidos grasos. Como se muestra en la Figura 2, a idénticas concentraciones de triglicérido, la disminución de la proporción de DHA a 50 ó 20% reduce de manera drástica la capacidad antioxidante celular, tornándose pro-oxidante a concentraciones bajas o moderadas. Estos resultados parecen indicar que el efecto antioxidante celular del DHA, no depende exclusivamente de la concentración del mismo, sino que también es un factor decisivo su localización molecular en este caso su distribución en la estructura del triglicérido.

En cuanto a la inhibición específica en la producción de ROS se han analizado la generación de peróxidos lipídicos (TBARS) y de aniones superóxido. Los resultados obtenidos indicaron que las células tratadas con AAPH, generaron una mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) respecto a las células no inducidas, expresado como μM de MDA/mg de proteínas (Fig. 3). Como era de esperar, la incorporación de DHA en la membrana de las células Foreskin incrementa ligeramente de una forma dosis dependiente (0,5, 5 y 50 μM) la peroxidación lipídica basal celular (Fig. 3). En las células sometidas a una inducción oxidativa con AAPH 40 mM, el DHA presenta una actividad antioxidante protegiendo a los fibroblastos de la generación de hidropéroxidos lipídicos de membrana siendo su acción del tipo concentración dependiente inversa. La protección con DHA, fue del 87% para 0,5 μM DHA; 85% para 5 μM y 48% para DHA-TG 50 μM (Fig. 3).

Se analizó posteriormente la generación del anión superóxido. Células Foreskin sometidas a un estrés oxidativo con AAPH 40 mM generaron una producción de anión superóxido 2,5 veces superior a las células no inducidas, que mantuvieron el nivel de anión superóxido constante (Fig. 4). En ausencia de inducción oxidativa, las células con DHA

integrado no presentan un nivel superior de anión superóxido intracelular respecto al control (Fig. 4). En condiciones de estrés oxidativo (Fig. 4), el DHA inhibe la generación del anión superóxido en un 16,5% a una concentración de 0,5 μM ; en un 10% a una concentración de 5 μM y en un 9% a una concentración de 50 μM . Se confirmó la especificidad del método mediante la adición de Tirón (ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno disulfónico, compuesto permeable a la membrana celular que opera como secuestrante altamente específico de anión superóxido intracelular) o de SOD extracelular (bloqueante enzimático de primera línea en la defensa antioxidante endógena vía dismutación del anión superóxido intracelular). La producción del anión superóxido en células estresadas con AAPH con o sin DHA previamente integrado en presencia de SOD exógena o de Tirón fue totalmente inhibida obteniéndose unos valores basales (Fig. 4).

Finalmente se analizó si el DHA ejercía su actividad antioxidante a través de una modificación de la actividad de los enzimas antioxidantes celulares de primera línea. Se analizaron la actividad de la SOD y de la GPx en células Foreskin con o sin DHA integrado. En el primer caso se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador de aniones superóxido instantáneo (tiempo total de medida 520 seg, midiendo cada 50 mseg). De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró una buena inducción oxidativa con una cinética rápida observándose directamente la dismutación y no la producción de anión superóxido. Se interpreto como medida indirecta y cualitativa de la actividad SOD el máximo de quimioluminiscencia que se alcanza a los 15 seg de la inducción oxidativa (Fig. 5). Sin DHA integrado, se alcanzaron valores de 310 U.A. quimioluminiscencia/ 10^6 células, disminuyendo a 150 U.A. quimioluminiscencia/ 10^6 células en un sistema preincubado con DHA 0,5 μM (52% de protección antioxidante) (Fig. 5). La eficiencia antioxidante se mantuvo en un 52% y en un 42% de protección en células tratadas con 5 y 50 μM de DHA, respectivamente (Fig. 5). Además, conociendo que el AAPH, oxida tanto el DNA, las proteínas y los lípidos por difusión de los peroxil radicales generados, el DHA como antioxidante podría impedir la inactivación de la SOD, encargada de la dismutación del anión superóxido, manteniendo en la célula la defensa antioxidante endógena de la catalasa y la glutatión peroxidasa. En cuanto a la actividad GPx (Fig. 6), esta se encuentra incrementada en estado basal celular a concentraciones de DHA modestas (hasta un 17% a 5 μM), pero desciende a concentraciones altas (-20% a 50 μM). Este comportamiento se mantiene intacto en estado de estrés oxidativo (Fig. 6). Estos resultados sugieren que el DHA colabora con el sistema de defensa antioxidante endógeno en cuanto a la dismutación del anión superóxido, generando SOD en todo el rango de concentraciones ensayado y también es capaz de controlar la generación de hidroperóxidos a concentraciones moderadas ya que incrementa la actividad GPx.

Evaluación de la actividad antioxidante del DHA en un modelo celular de retina

En el presente estudio *in vitro* se han utilizado como modelo celular, células ARPE-19 (células epiteliales pigmentarias de retina, ATCC CRL-2302) que constituyen un tipo celular adecuado por su buena respuesta *in vitro* a diferentes inductores oxidantes, además de ser un cultivo primario con requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo normales. Además, constituye un buen modelo ocular ya que conserva las propiedades biológicas y funcionales de las células epiteliales pigmentarias de retina.

Resultados

El estudio realizado con esta línea celular es análogo al descrito para las células Foreskin en el apartado anterior. Los requerimientos básicos han sido los mismos con respecto al mantenimiento de la viabilidad celular en todas las condiciones de trabajo (efecto del DHA, del estrés oxidativo). La incorporación del DHA en las dosis analizadas tampoco ha supuesto una alteración significativa en el estado oxidativo celular basal.

Al inducir un estrés oxidativo moderado con AAPH 40 mM y usando la DHR123 como detector de ROS, el DHA muestra un efecto inhibitor en la generación de las especies reactivas del oxígeno, tanto a la concentración de 0,5 μM (43% de protección) como a 5 μM (32% de protección), presentando un menor efecto a 50 μM (4% de protección) de DHA (Fig. 7A). Cuando las células se someten a una inducción severa con AAPH 60 mM, el DHA muestra un efecto protector frente a la generación de ROS, tanto a la concentración 0,5 μM (13% de protección) y menor a concentraciones superiores de DHA (Fig. 7A). Estos resultados son similares a los obtenidos con las células Foreskin, aunque cabe destacar como aspecto diferencial la menor protección observada frente a una inducción oxidativa severa. Utilizando para la detección de ROS la CDCFDA más específica de peróxidos, también se pone de manifiesto la protección que ejerce el DHA contra el estrés oxidativo inducido por AAPH (Fig. 7B).

También la cinética de protección del DHA presenta siempre un máximo efecto antioxidante entre los 60-120 minutos de efectuada la inducción, denotando una saturación en la capacidad secuestrante de hidroperóxidos y anión superóxido del DHA. Cuantitativamente, la capacidad antioxidante es dosis dependiente de modo crítico, ya que al aumentar la concentración del mismo pierde la capacidad secuestrante de ROS siendo la concentración de 0,5 μM la más efectiva en su capacidad antioxidante (Fig. 7A y 7B). En este sentido otro parámetro crítico a nivel de optimización de la eficiencia del sistema es la proporción de DHA respecto al total de ácidos grasos. La disminución de la proporción de DHA respecto al total de ácidos grasos del 70% al 50-20% reduce de manera importante y no proporcional su capacidad antioxidante celular a las concentraciones óptimas (0,5-5 μM), igualándose a concentraciones elevadas (Fig. 8A y 8B), pero a diferencia de las células Foreskin en ninguna proporción se torna el DHA pro-oxidante. Estos resultados confirman que el efecto antioxidante celular del DHA, no depende exclusivamente de la concentración del mismo, sino que también es un factor decisivo su localización molecular en este caso su distribución en la estructura del triglicérido.

En cuanto a la inhibición específica en la producción de ROS se han analizado la generación de peróxidos lipídicos (TBARS) (Fig. 9) y de aniones superóxido (Fig. 10). Los resultados obtenidos son muy similares a los obtenidos con las células Foreskin. Las células tratadas con AAPH, generan una mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de aniones superóxido respecto a las células no inducidas. La incorporación de DHA en la membrana de las células ARPE-19 incrementa ligeramente de una forma dosis dependiente (0.5, 5 y 50 μM) la peroxidación lipídica basal celular, pero en las células sometidas a una inducción oxidativa, el DHA presenta una actividad antioxidante celular inhibiéndolas de la generación de hidroperóxidos lipídicos de membrana con una relación inversa a su concentración. La protección con DHA, fue del 64% para 0,5 μM DHA; 58% para 5 μM y 42% para DHA 50 μM (Fig. 9). Se analizó posteriormente la generación del anión superóxido. En ausencia de inducción oxidativa, las células con DHA integrado no presentan un nivel superior de anión superóxido intracelular respecto al control (Fig. 10). Un estrés oxidativo con AAPH 40 mM genera una producción de anión superóxido que es inhibido parcialmente por el DHA (20-16% a concentraciones de 0,5-50 μM).

Finalmente se analizó si el DHA alteraba la actividad del enzima GPx como antioxidante celular de primera línea (Fig. 11). La actividad GPx se encuentra incrementada en estado basal celular a todas las concentraciones de DHA ensayadas (12-40%) y este comportamiento se mantiene intacto en estado de inducción oxidativa que además presenta una actividad GPx 2,5 veces superior (Fig. 11). Al igual que en las células Foreskin, estos resultados sugieren que el DHA ejerce parte de su efecto antioxidante modulando la actividad del sistema enzimático de defensa antioxidante endógeno celular.

REIVINDICACIONES

1. Utilización del ácido docosahexaenoico para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del daño celular oxidativo.

2. Utilización según la reivindicación 1 **caracterizada** por el hecho de que dicho ácido docosahexaenoico está incorporado en un monoglicérido, diglicérido, triglicérido, fosfolípido, éster etílico o ácido graso libre.

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicho ácido docosahexaenoico está incorporado en un triglicérido.

4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 **caracterizada** por el hecho de que dicho ácido docosahexaenoico se encuentra en un porcentaje en peso de entre el 20 y el 100% respecto al total de ácidos grasos.

5. Utilización según la reivindicación 3 **caracterizada** por el hecho de que dicho ácido docosahexaenoico se encuentra en un porcentaje en peso de entre el 40 y el 100% respecto al total de ácidos grasos.

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2-4 **caracterizada** por el hecho de que dicho ácido docosahexaenoico se encuentra en un porcentaje en peso de entre el 66 y el 100% respecto al total de ácidos grasos.

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha composición farmacéutica comprende, además, otro principio activo.

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha composición farmacéutica se administra a un paciente que está recibiendo un tratamiento contra el daño celular oxidativo.

9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha patología asociada con un daño oxidativo es una patología neurodegenerativa.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha patología asociada con un daño oxidativo es una patología ocular.

11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha patología asociada con un daño oxidativo es una patología isquémica.

12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha patología asociada con un daño oxidativo es un proceso inflamatorio.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada** por el hecho de que dicha patología asociada a un daño oxidativo es aterosclerosis.

14. Utilización según la reivindicación 9 **caracterizada** por el hecho de que dicha patología neurodegenerativa es una del grupo que comprende esclerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y distrofia muscular.

15. Utilización según la reivindicación 10 **caracterizada** por el hecho de que dicha patología ocular es una del grupo que comprende retinosis pigmentaria, degeneración macular y cataratas.

16. Utilización según la reivindicación 11 **caracterizada** por el hecho de que dicha patología isquémica es infarto de miocardio o infarto cerebral.

17. Utilización según la reivindicación 12 **caracterizada** por el hecho de que dicha patología es una del grupo que comprende artritis, vasculitis, glomerulonefritis y lupus eritematoso.

FIGURA 1A

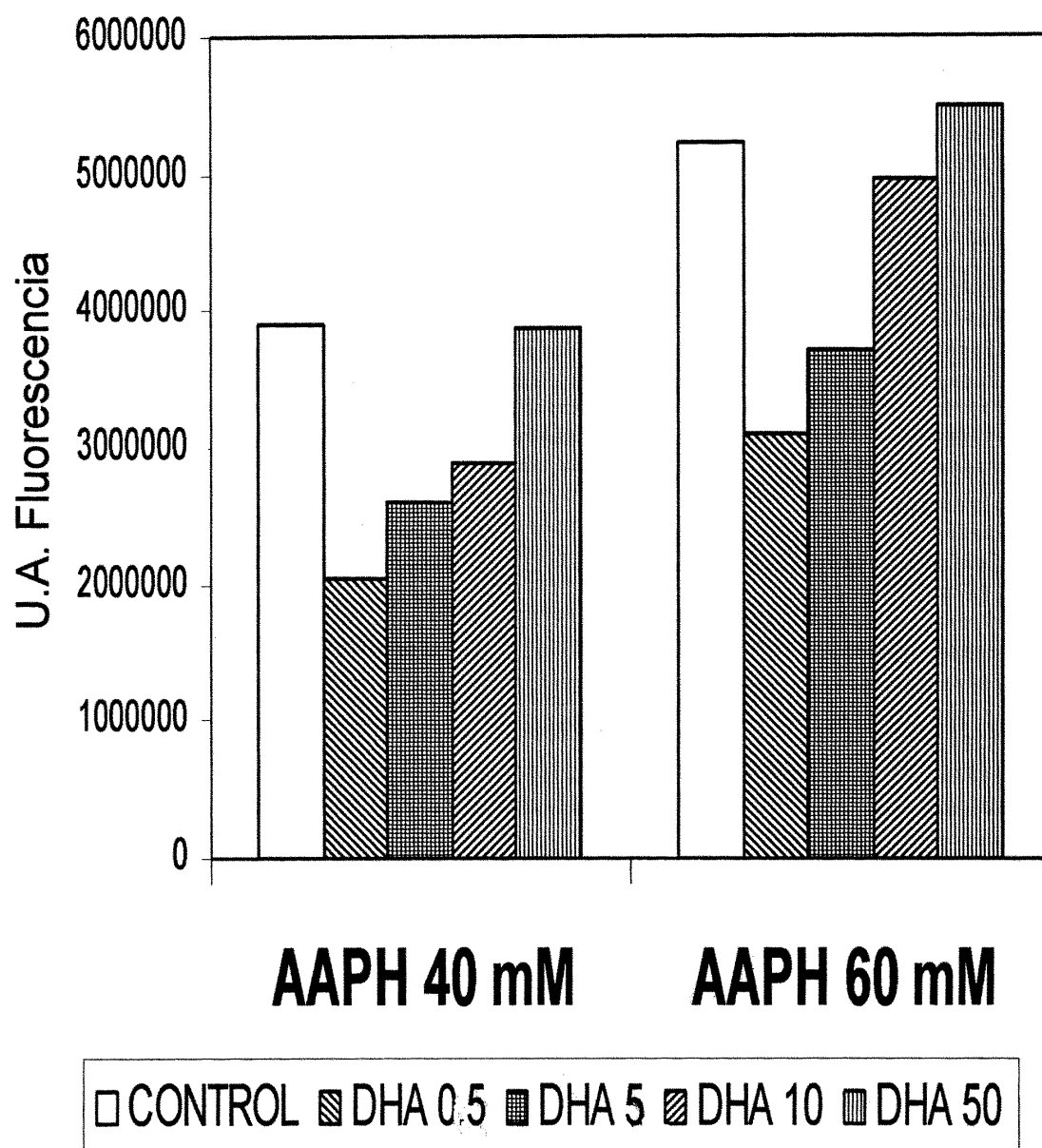


FIGURA 1B

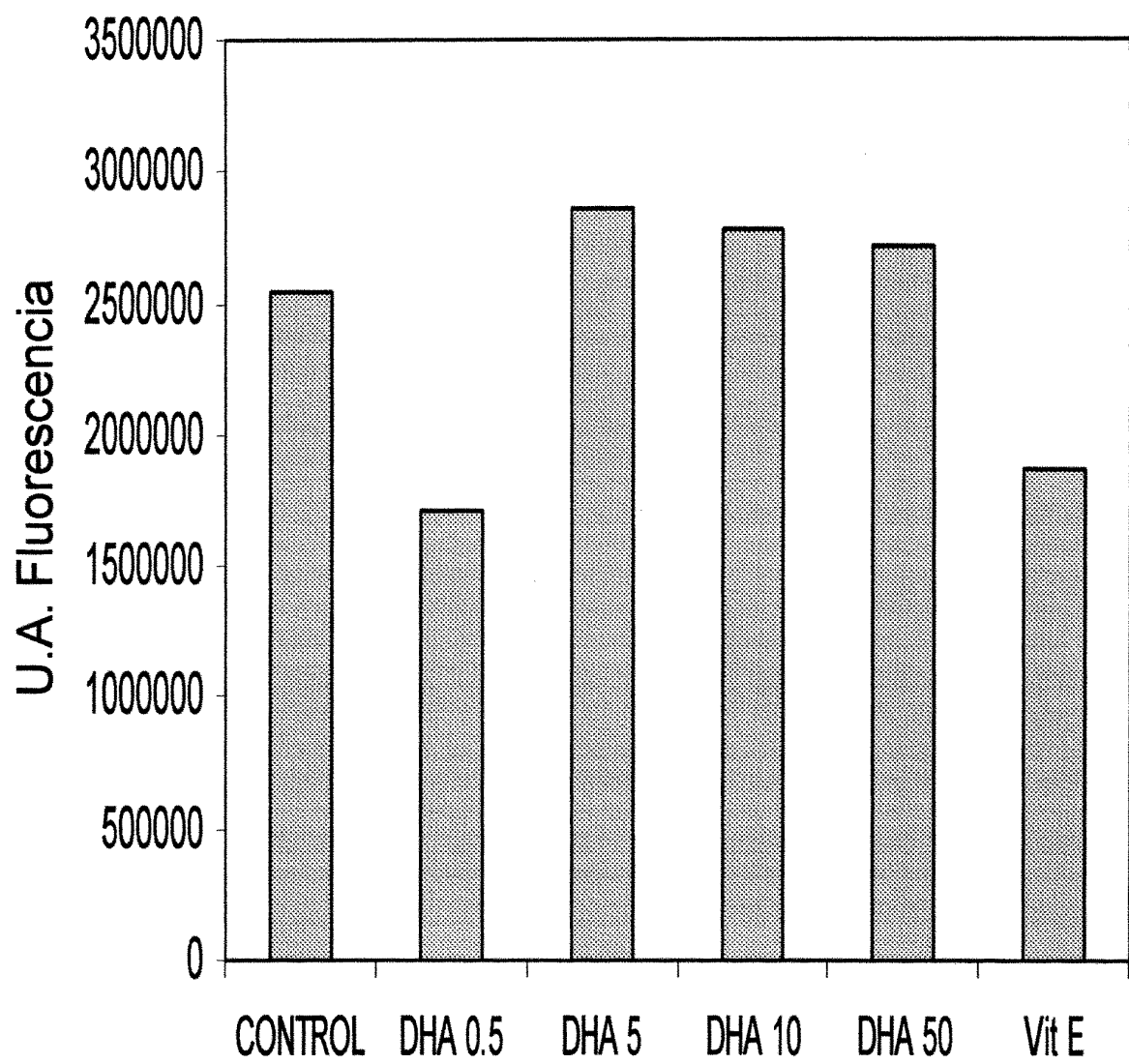


FIGURA 2A

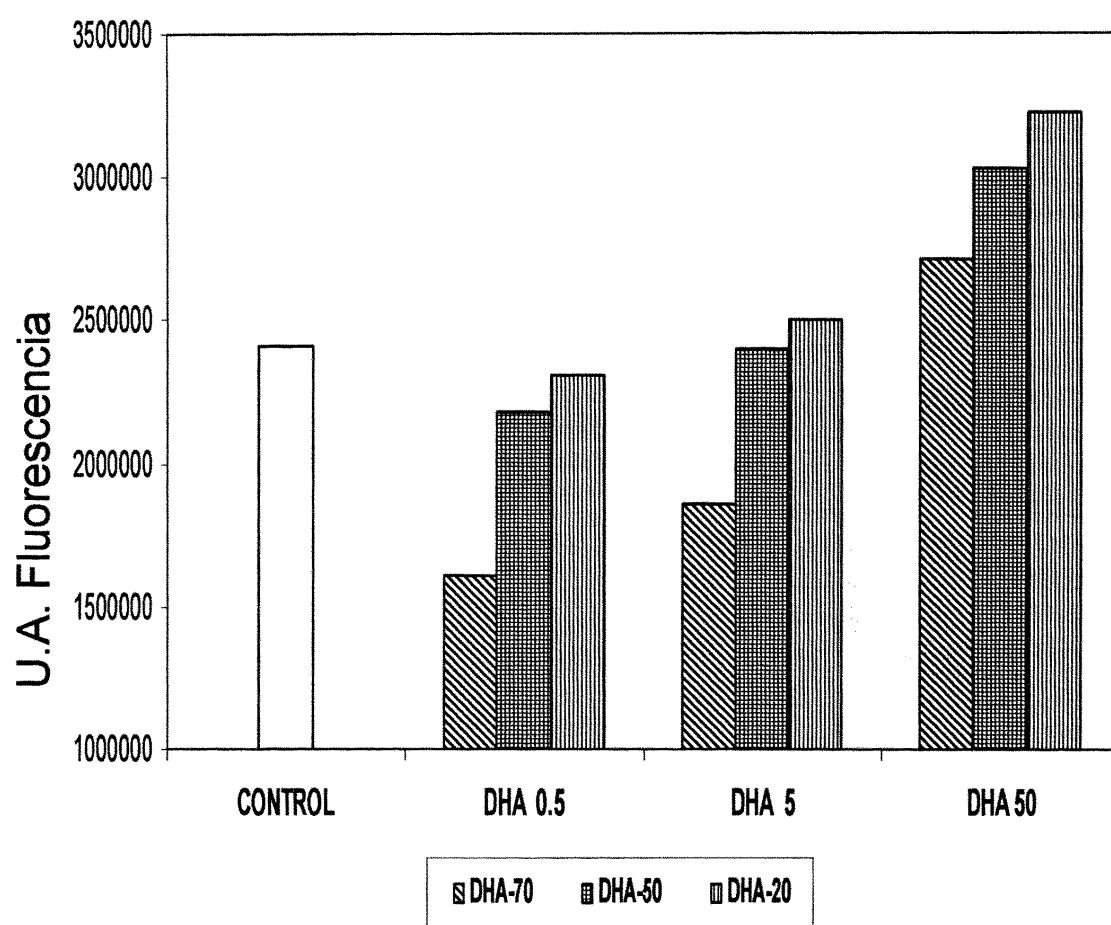


FIGURA 2B

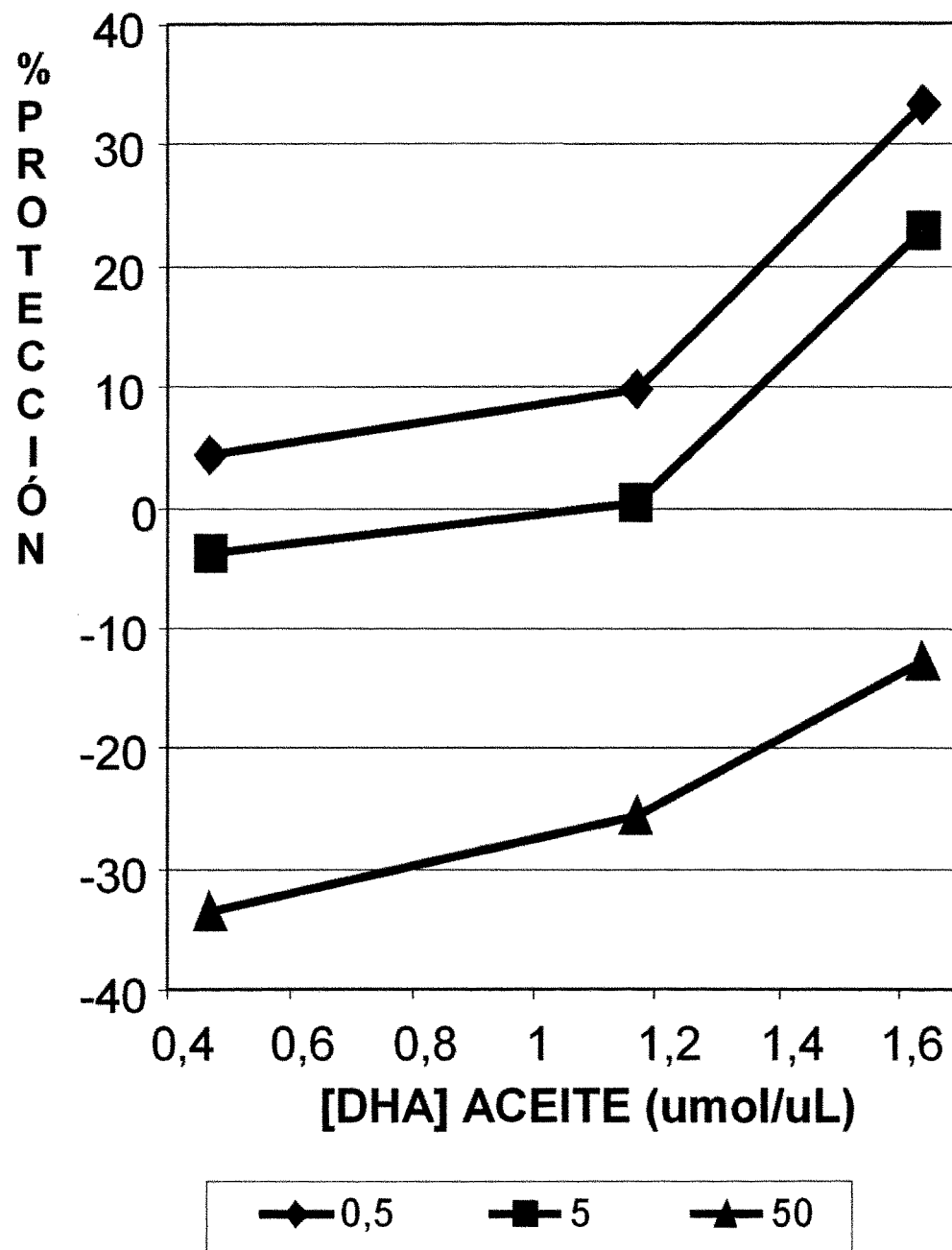


FIGURA 3

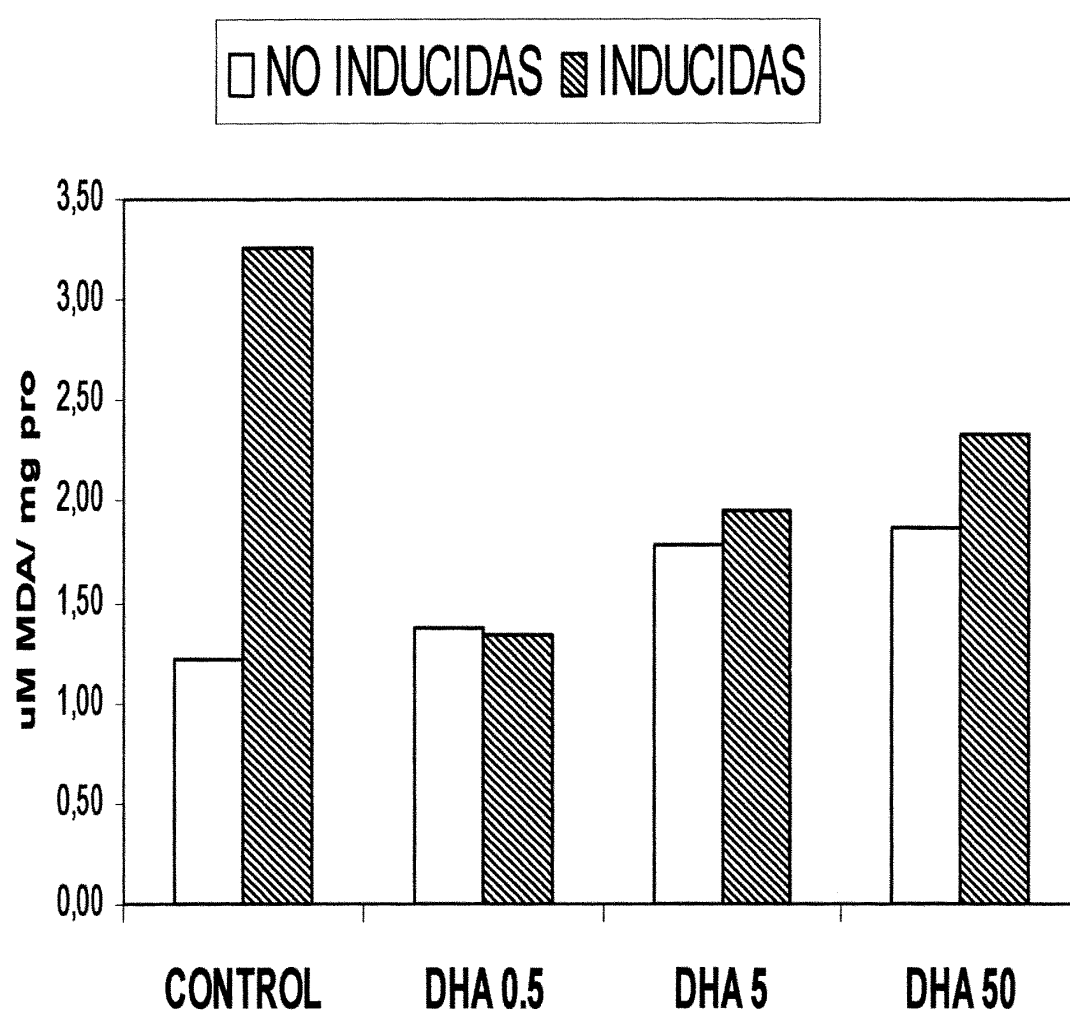


FIGURA 4

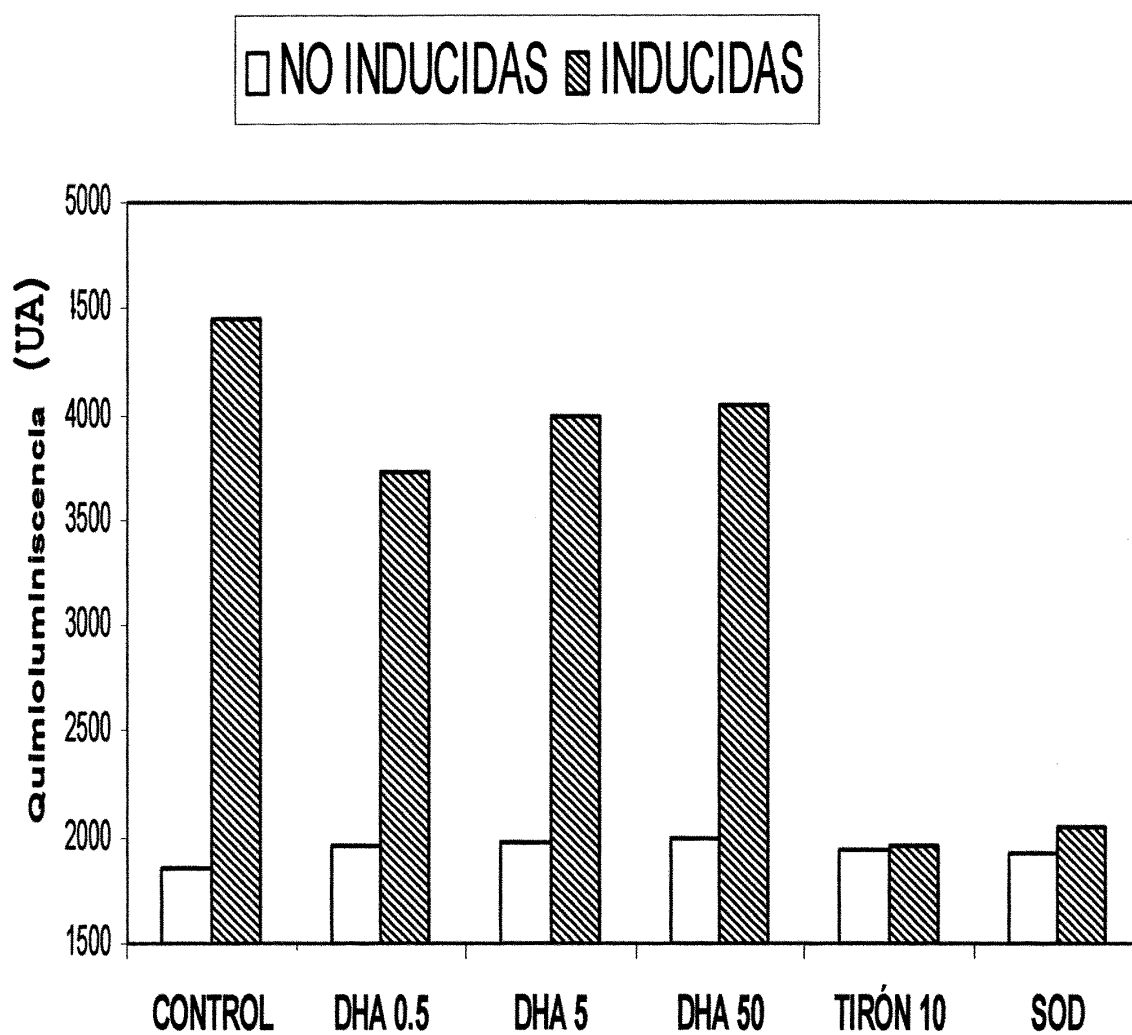


FIGURA 5

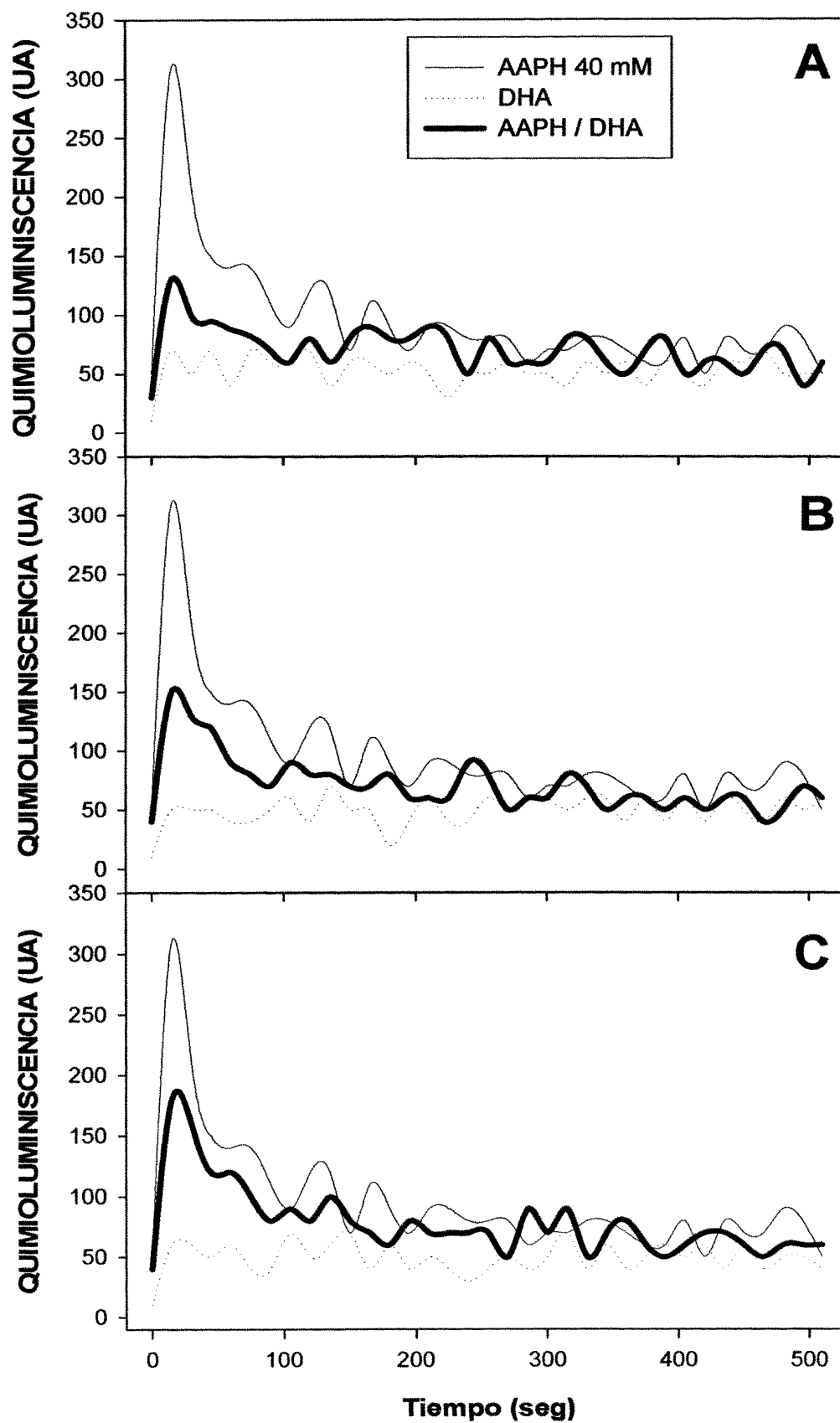


FIGURA 6

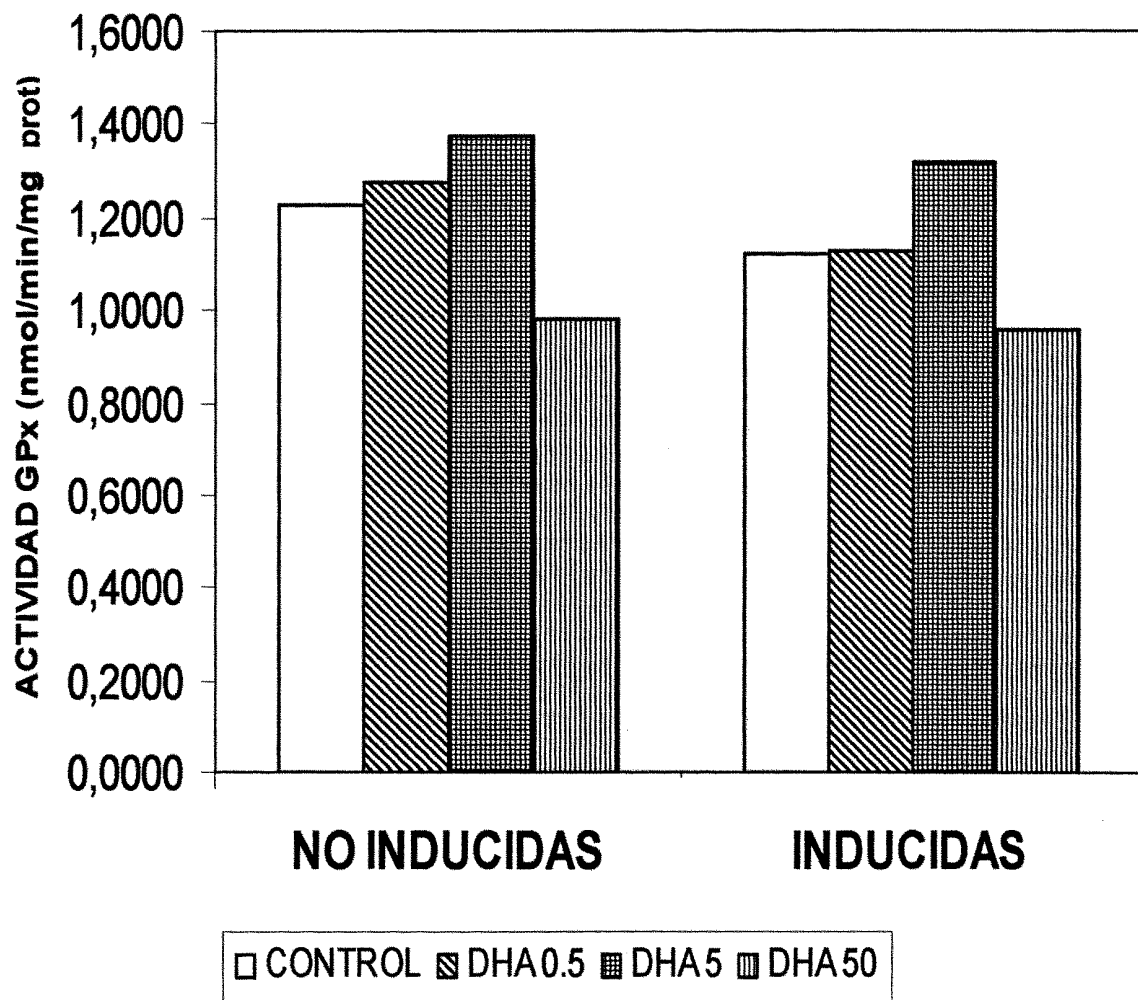


FIGURA 7A

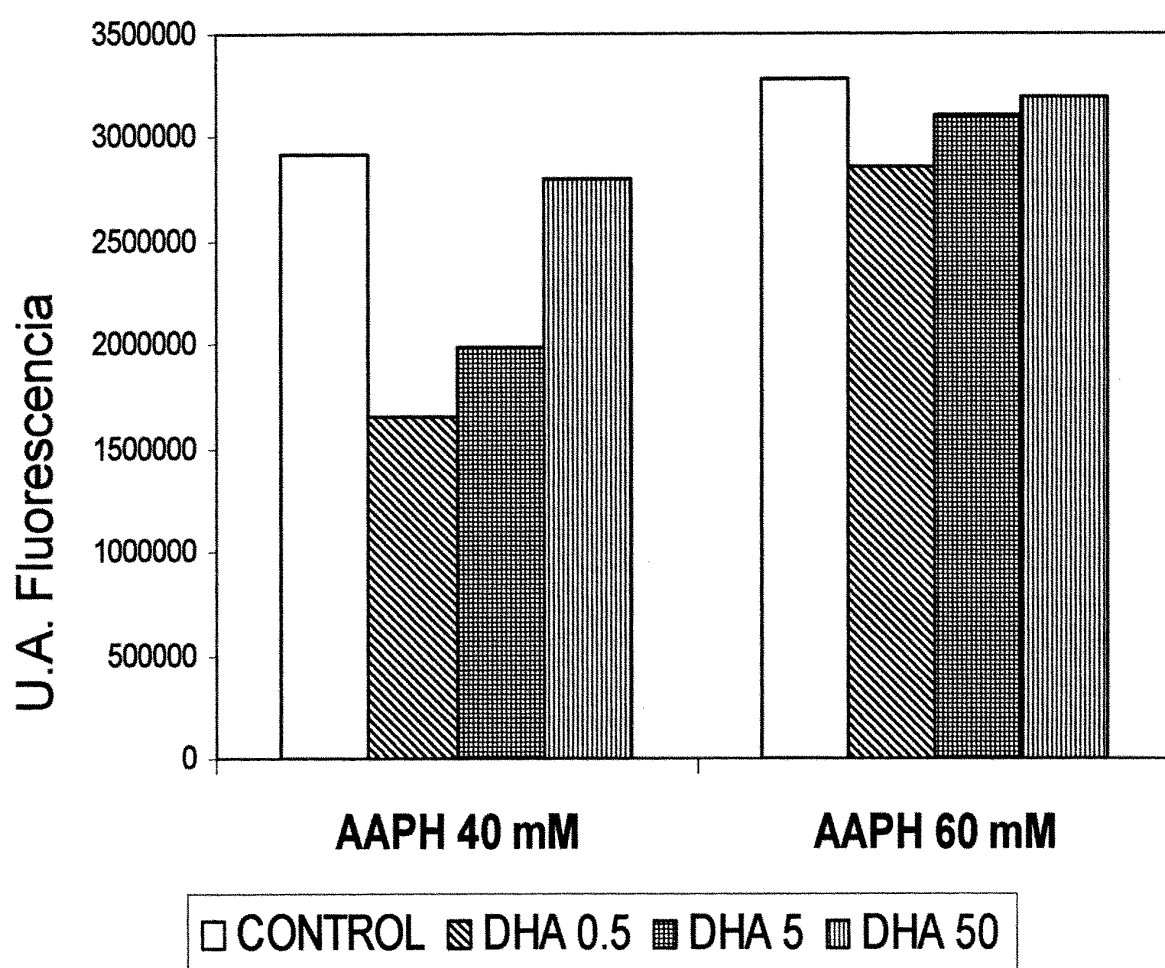


FIGURA 7B

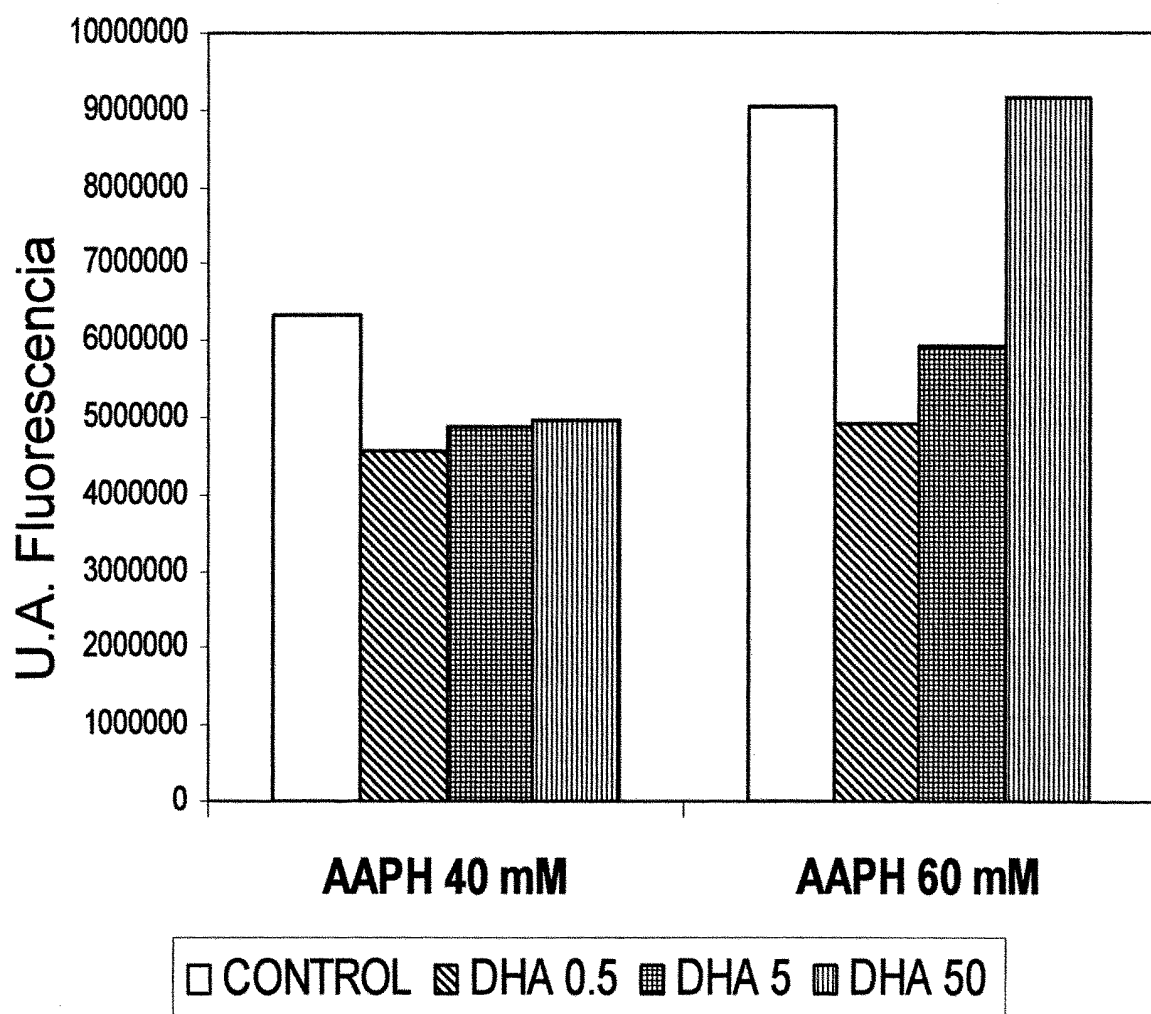


FIGURA 8A

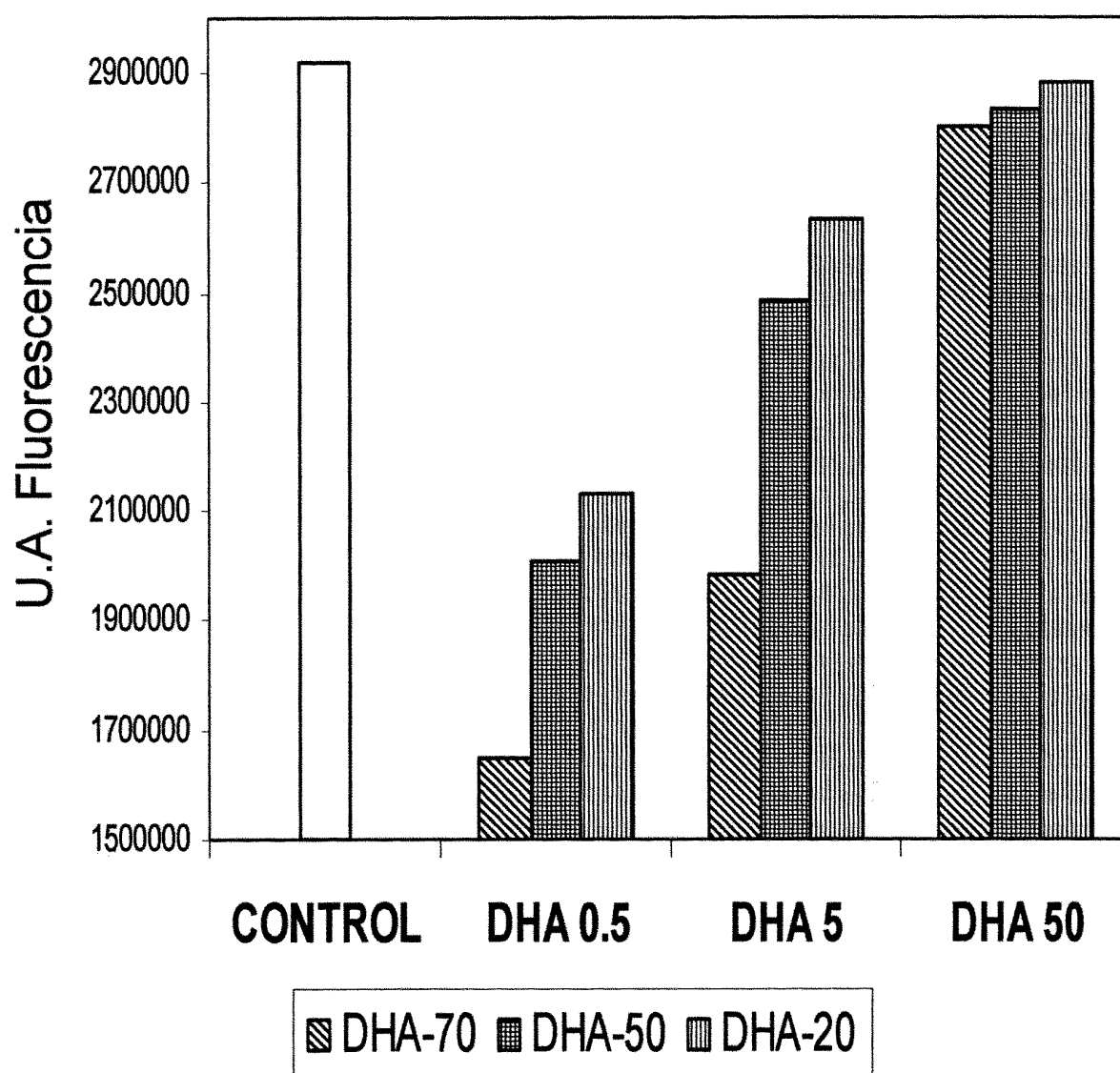


FIGURA 8B

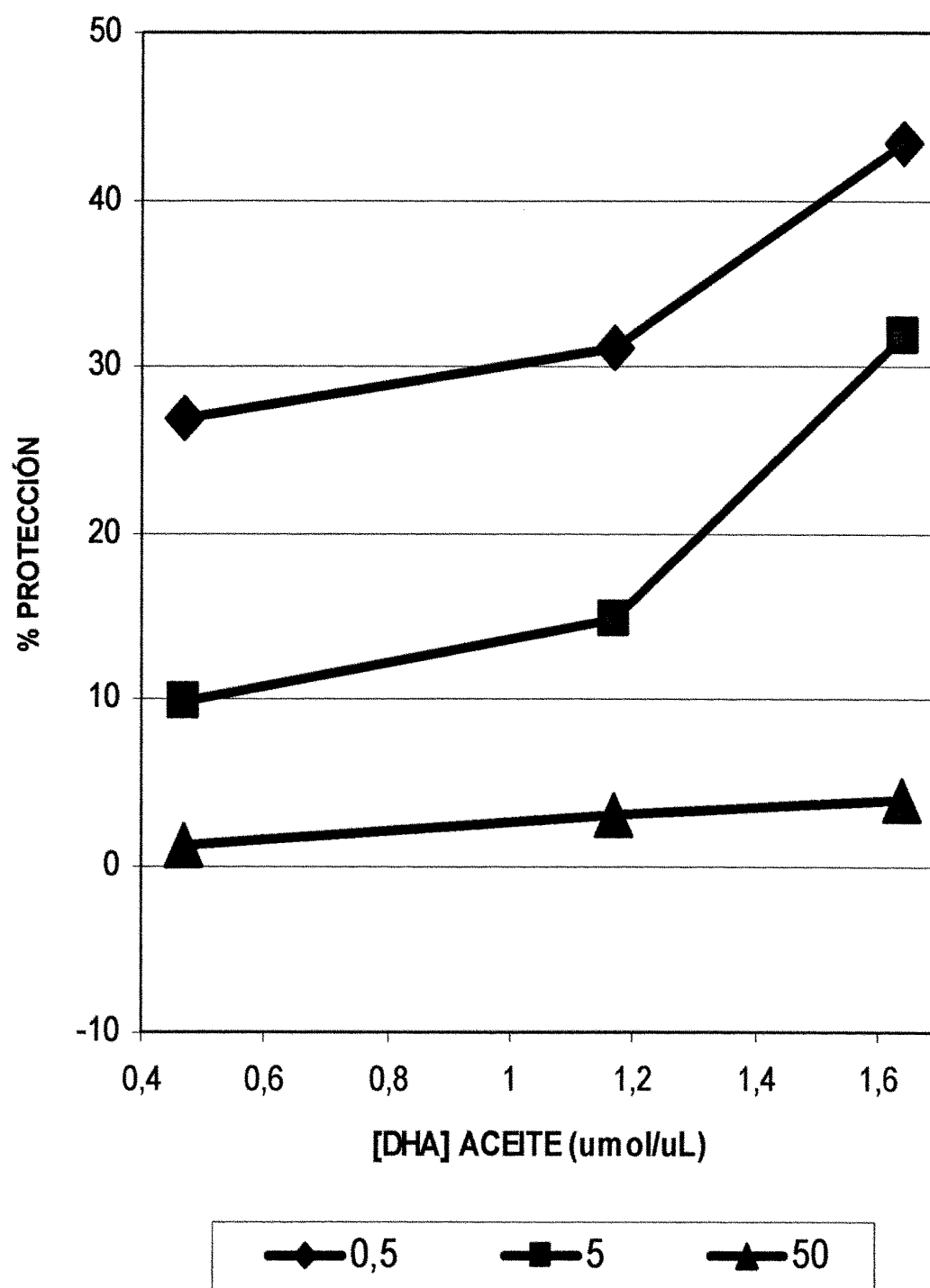


FIGURA 9

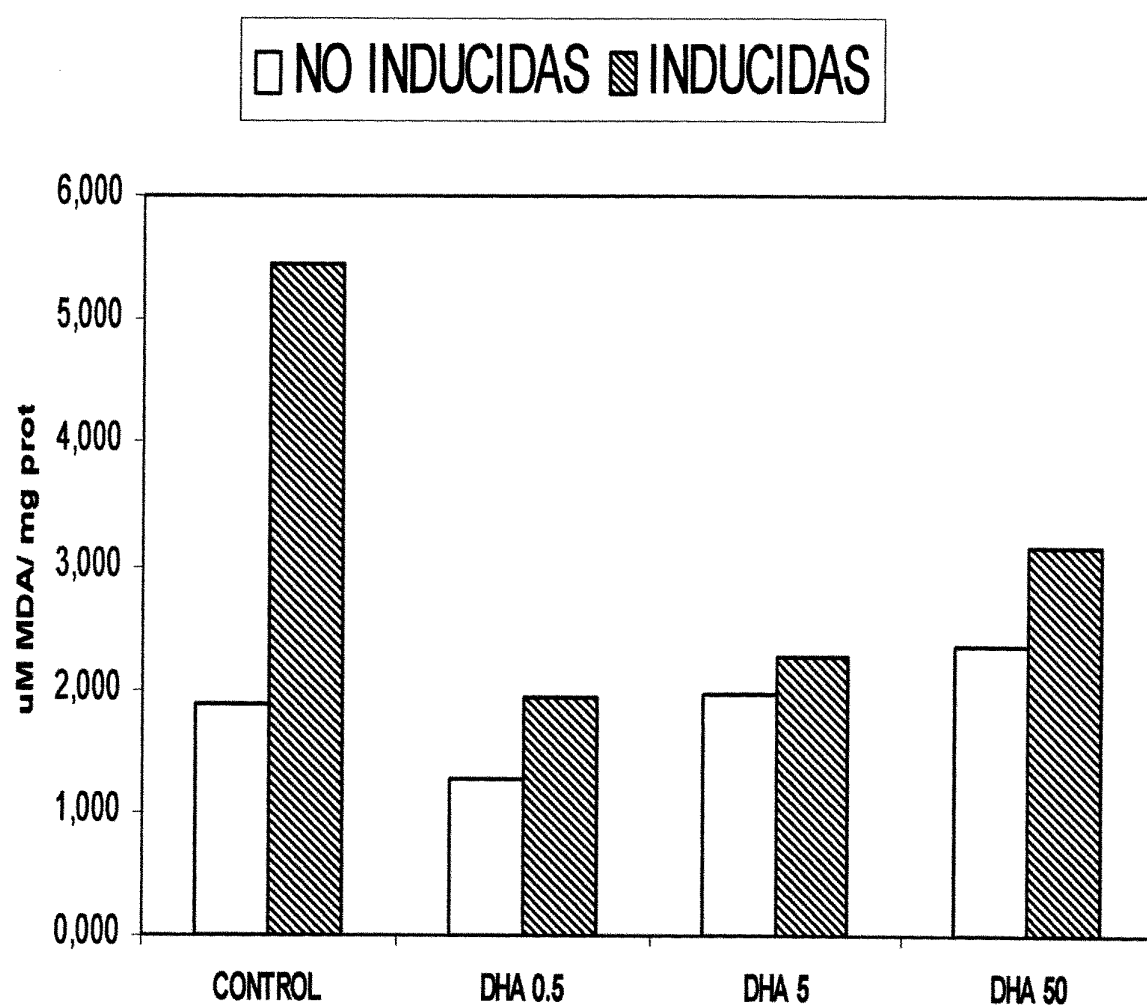


FIGURA 10

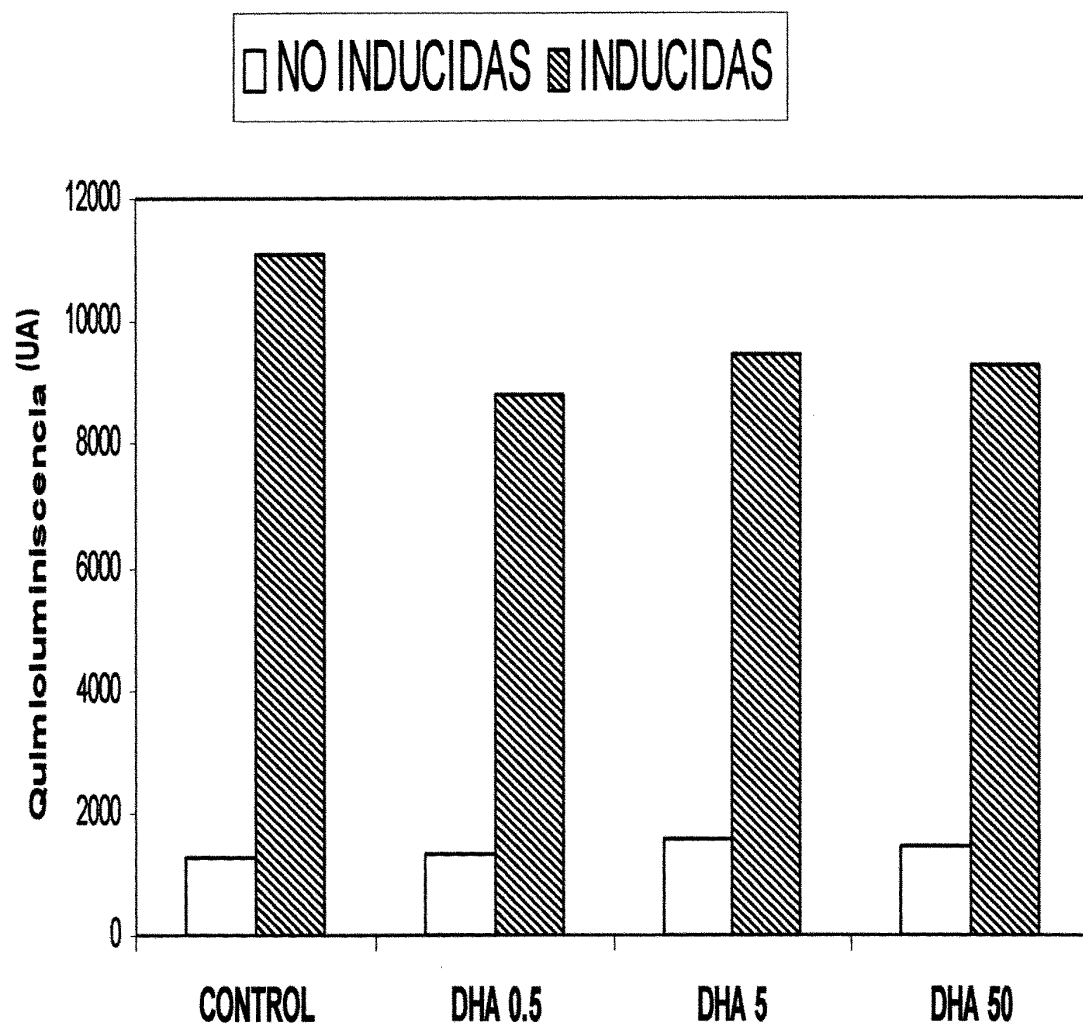
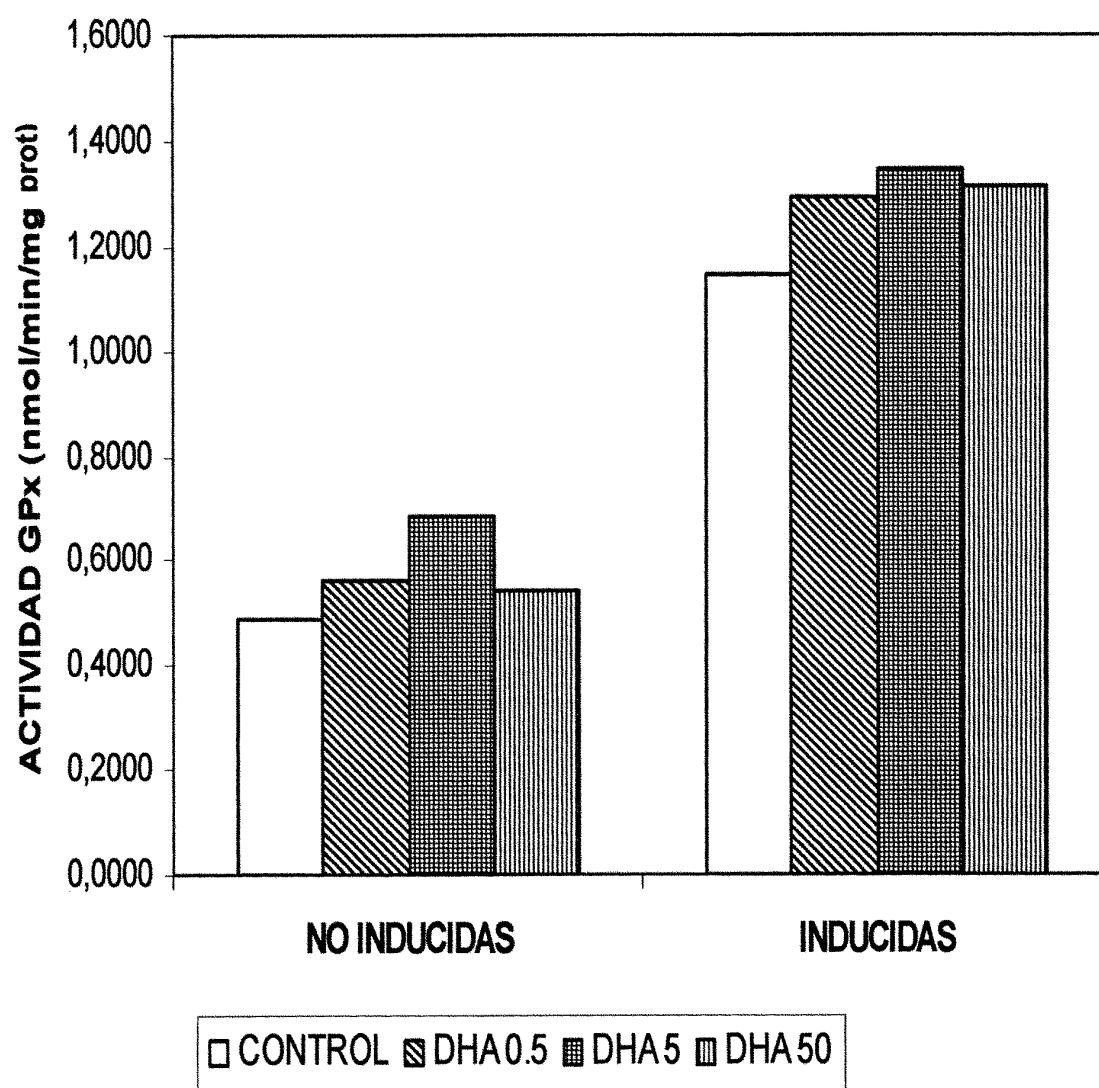


FIGURA 11





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 277 557

⑫ Nº de solicitud: 200503202

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2218525 T3 (MARTEK BIOSCIENCES CORP) 16.11.2004, todo el documento.	1-10,14-15
X	EP 0765661 A2 (SHISEIDO CO LTD) 02.04.1997, todo el documento.	1-8,12,17
X	EP 1310249 A1 (QUATEX NV) 14.05.2003, todo el documento.	1-8,11,16
X	ES 2174833 T3 (FRESENIUS KABI AB) 16.11.2002, todo el documento.	1-2,7-8,12-13,17
X	EP 1466597 A1 (CLINIGENETICS) 13.10.2004, todo el documento.	1-3,7-8,13
X	ES 2040242 T3 (SCOTIA PHARMACEUTICALS LTD.) 16.10.1993, todo el documento.	1,7-9,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.06.2007

Examinador

B. Vila Riudavets

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)