

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de enero de 2023 (19.01.2023)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2023/284902 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 36/899 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CU2022/050005

(22) Fecha de presentación internacional:

23 de mayo de 2022 (23.05.2022)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

2021-0060 13 de julio de 2021 (13.07.2021) CU

(71) Solicitante: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, OSDE BIOCUBAFARMA. [CU/CU]; Ave 25 No 15202 Esq. 21 A, Cubanacán, Playa., La Habana 11300 (CU).

(72) Inventores: GONZÁLEZ CANAVACIOLO, Víctor Luis; Calle 174 e/ 1ra y 5ta Edificio BBE-2 Apto 4, Rpto Flores, Playa., La Habana 11300 (CU). VICENTE MURILLO, Roxana; Guanabacoa # 505 apto. 2 e/ Pérez y Santa Ana, Luyanó, 10 de Octubre., La Habana 10700 (CU). SALAHANGE GONZÁLEZ, Laura; Ave 41 No. 10608 e/ 106 y 108, Marianao., La Habana 11500 (CU). MOLINA CUEVAS, Vivian; Calle 170 e/ 1ra y 5ta Edificio c-2 Apto 25, Rpto Flores, Playa., La Habana 11300 (CU). MENDOZA CASTAÑO, Sarahí; Calle 208 No 1923 altos e/ 19 y 21ª Atabey, Playa., La Habana 11300 (CU).

(74) Mandatario: CABRERA MARCHENA, Leydis Marie; Avenida 25 No 15202, La Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(54) Title: MIXTURE OF COMPOUNDS WITH HIGH MOLECULAR WEIGHTS, OBTAINED FROM SUGAR CANE WAX (SACCHARUM OFFICINARUM L.)

(54) Título: MEZCLA DE COMPUESTOS CON ALTOS PESOS MOLECULARES, OBTENIDA A PARTIR DE LA CERA DE CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM L.)

(57) Abstract: Described is a mixture of compounds with high molecular weights, which has neuroprotective effects, as it inhibits neurological deficit, thereby improving the clinical symptoms and significantly reducing neuronal death and mortality. The mixture also has antioxidant effects that support its neuroprotective efficiency. Also described are compositions for oral dosing which comprise the mixture of compounds as the active ingredient and are used as nutritional or pharmaceutical compositions, being effective for the treatment of neurodegenerative diseases. The active ingredient is fatty acids in the form of alkaline or alkaline earth salts, fatty alcohols and aldehydes of high molecular weight, extracted and purified from sugar cane wax (Saccharum officinarum L.). The combination of these substances, in the proportion specified in the invention, produces a synergistic effect, which ensures the expected pharmacological effect.

(57) Resumen: Se describe una mezcla de compuestos con altos pesos moleculares, la cual presenta efectos neuroprotectores, al inhibir el déficit neurológico, conduciendo a una mejoría en la sintomatología clínica, una reducción significativa de la muerte neuronal y de la mortalidad. Además, presenta efectos antioxidantes que contribuyen a sustentar su eficacia neuroprotectora. También se describen composiciones para dosificación oral, con dicha mezcla de compuestos como ingrediente activo, las que se emplean como composiciones nutricionales o farmacéuticas siendo efectivas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Como ingrediente activo se encuentran ácidos grasos en forma de sales alcalinas o alcalinotérreas, alcoholes grasos y aldehídos de alto peso molecular, extraídos y purificados a partir de la cera de la caña de azúcar (Saccharum officinarum L.). La combinación de estas sustancias, en la proporción específica que revela la presente invención, permite que ocurra un efecto sinérgico, el cual garantiza el efecto farmacológico esperado.

WO 2023/284902 A1

MEZCLA DE COMPUESTOS CON ALTOS PESOS MOLECULARES, OBTENIDA A PARTIR DE LA CERA DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

DESCRIPCIÓN

Sector Técnico

Esta invención está relacionada con las industrias alimentarias y farmacéutica, al presentar una mezcla de Sustancias de Altos Pesos Moleculares (SAPM) con efectos antioxidantes y neuroprotectores, la cual puede ser empleada como Ingrediente Activo (IA) de suplementos nutricionales o formulaciones farmacéuticas. Dicho IA contiene sales de ácidos grasos, alcoholes grasos y aldehídos de alto peso molecular, obtenidos y purificados a partir de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), en proporciones específicas que garantizan un efecto sinérgico, donde el efecto farmacológico de la mezcla descrita en la presente invención es superior a la sumatoria de los efectos farmacológicos de los grupos de compuestos que la componen.

Varias enfermedades relacionadas con el sistema nervioso afectan la calidad de vida y pueden llegar a provocar la muerte de los pacientes, por lo que la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas neuroprotectoras, seguras y eficaces, constituye una problemática actual. Entre las muchas enfermedades en las que se ven afectadas las células del sistema nervioso encontramos la atrofia muscular espinal, la esclerosis lateral primaria, la atrofia muscular progresiva espinobulbal y la esclerosis lateral amiotrófica; siendo esta última la enfermedad neurodegenerativa más conocida y peligrosa al tener un pronóstico mortal. Dicha afección, ampliamente conocida en el ámbito popular por haber llevado a la muerte a personalidades célebres como el científico Stephen Hawking, y los deportistas Lou Gehrig, Gianluca Signorini y Stefano Borgonov, se caracteriza porque las neuronas responsables del movimiento muscular pierden gradualmente su funcionamiento y finalmente mueren, lo cual conlleva a una parálisis muscular progresiva.

Teniendo en cuenta que los trastornos neurológicos afectan la calidad de vida y algunos pueden llegar a provocar la muerte de quienes los padecen, constituyendo importantes problemas de salud a escala mundial, así como el hecho de que las terapias convencionales existentes no logran curarlos ni evitar su progresión en la medida deseada, se hace

necesario buscar nuevos agentes neuroprotectores efectivos para la prevención y tratamiento de estas condiciones médicas.

Por otra parte, también resulta un tema de actualidad la búsqueda de sustancias antioxidantes, pues aunque la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres se produce normalmente durante el metabolismo celular, y en condiciones fisiológicas normales se compensa por un sistema antioxidante que mantiene el equilibrio oxidación-reducción y la sobrevivencia celular, existen varios factores, como la exposición a contaminantes y al medio ambiente, el estilo de vida y diversas patologías, que pueden alterar dicho equilibrio, generando un exceso y acumulación de radicales libres, lo cual provoca Estrés Oxidativo (EO) (Poljsak, 2011). Se ha demostrado que el EO desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de diversas patologías crónico-degenerativas como la aterosclerosis, el cáncer, las cardiopatías y los desórdenes neurovegetativos (Maldonado 2010, Farlane 2004, Guichardant 2009), por lo que el consumo de sustancias antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, generado por el EO, ejerciendo un beneficio adicional sobre la prevención de dichas patologías (Oxilia 2010).

Técnica Anterior

Existen varias patentes y publicaciones sobre la obtención de extractos a partir de la cera de caña de azúcar (*S. officinarum* L.), pero en ningún caso se ha presentado la preparación de una mezcla, con efectos neuroprotectores y antioxidantes, con la composición mostrada en la presente invención. En la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento lo que se presenta es la obtención de mezclas puras de alcoholes para el tratamiento de afecciones relacionadas con el perfil lipídico, la hiperagregabilidad plaquetaria y afecciones coronarias. Con esos mismos objetivos también se han preparado mezclas de alcoholes y ácidos grasos (donde predominan los alcoholes grasos), mezclas puras de ácidos grasos, así como combinaciones de dichas sustancias con diferentes fármacos, con vistas a potenciar los efectos farmacológicos mencionados anteriormente.

Entre los primeros trabajos publicados sobre este tema, encontramos la obtención de una mezcla de alcoholes grasos ($\geq 90\%$) mediante saponificación de la cera de caña de azúcar

y la extracción con disolventes orgánicos, la cual es efectiva en el tratamiento de la hipercolesterolemia, complicaciones ateroscleróticas como la hiperagregabilidad plaquetaria, isquemia y trombosis, a la vez que previene úlceras gástricas y mejora la actividad sexual masculina (Laguna, US5856316). Los importantes efectos farmacológicos demostrados por dicha mezcla motivaron la obtención, a partir de esta cera, de otras mezclas con altos contenidos de alcoholes grasos para estos mismos fines farmacéuticos, tanto por métodos de obtención similares (Almagro, US20070295326A1, Ribeiro BRPI0702137A y Matkin, US20060013842 A1), como por otras tecnologías, como la extracción con fluidos en condiciones supercríticas (Shintaku BRPI0701341A2), la extracción hidrolítica multifase (Somaiya 1058/MUM/2005) y la reacción de la cera con hidrógeno en presencia de un catalizador (Somaiya WO2010103549).

Con el objetivo de lograr productos farmacéuticos con efectos hipocolesterolémicos, cardioprotectores y antiagregantes plaquetarios, también se han obtenido otros extractos y mezclas a partir de la cera de caña de azúcar, como la presentada por Gonzales y colaboradores (US6486205 B2), la cual está formada por ácidos grasos entre 26 y 36 átomos de carbono; la presentada por Kutney y Wessman (US20050234025), quienes proponen la combinación de al menos un alcohol o ácido graso de esta cera con esteroides y/o derivados del ácido ascórbico (sin que especifiquen la proporción entre estas sustancias); y la propuesta por Matkin y colaboradores (US20060013842), quienes proponen una mezcla con un mínimo de 60% de alcoholes grasos, hasta un 40% de ácidos grasos y opcionalmente ácido salicílico, la cual puede ser obtenida, además, a partir de otras ceras animales o vegetales. De igual forma, a partir de otras ceras naturales, como las de abejas, sorgo y mijo, se han obtenido extractos con alcoholes y otras sustancias grasas, a las cuales se le adjudican los mismos efectos farmacológicos sobre el perfil lipídico mencionados anteriormente (Pérez EP1189605B1 y Hargrove y col. US20060127449).

Con respecto al empleo de ácidos grasos en composiciones neuroprotectoras, encontramos que Miller (US20110280852A1) propuso los ácidos grasos insaturados entre 18 y 22 átomos de carbono, activados como nitro o ceto ácidos, mientras que Paquin y Russell (US20020128316 y US20090280199) propusieron el empleo de triglicéridos (o sus ácidos libres) y ácidos grasos del tipo omega-3, respectivamente, mezclados con otras sustancias.

En ningún caso se ha dado a conocer una composición neuroprotectora y a la vez antioxidante, consistente en una mezcla de ácidos grasos con más de 26 átomos de carbono, en forma de sales, en una proporción específica, la cual contiene además alcoholes grasos y aldehídos de alto peso molecular en proporciones específicas.

Problema técnico

Como se ha expresado anteriormente, aunque los trastornos neurológicos son importantes problemas de salud que afectan la calidad de vida y pueden llegar a provocar la muerte, las terapias convencionales existentes no logran curarlos ni evitar su progresión en la medida deseada, por lo que se hace necesario buscar nuevos agentes neuroprotectores efectivos para la prevención y tratamiento de estas condiciones médicas. Por otra parte, también resulta necesario y de actualidad la búsqueda de sustancias antioxidantes, pues existen varios factores que generan un exceso y acumulación de radicales libres, los cuales inciden en el desarrollo y progresión de diversas patologías crónico-degenerativas.

Solución al Problema

Como posible solución a la problemática actual se presenta, como objeto de la presente invención, una mezcla de Sustancias de Alto Peso Molecular (SAPM) con efectos antioxidantes y neuroprotectores, la cual puede ser empleada como Ingrediente Activo (IA) de suplementos nutricionales o formulaciones farmacéuticas. Dicho IA contiene sales de ácidos grasos, alcoholes grasos y aldehídos de alto peso molecular, obtenidos y purificados a partir de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), en proporciones específicas que garantizan un efecto sinérgico, donde el efecto farmacológico de la mezcla descrita en la presente invención es superior a la sumatoria de los efectos farmacológicos de los grupos de compuestos que la componen.

Breve descripción de la Invención

El IA presentado como objeto de la presente invención se caracteriza por contener los grupos de compuestos siguientes en proporciones específicas: ácidos grasos (60-80 % en peso), alcoholes grasos (10-30 % en peso) y aldehídos de alto peso molecular (10-30 % en peso). Los componentes mayoritarios, que son los ácidos grasos, están presentes en la

composición como sales alcalinas o alcalinotérreas en la proporción siguiente: C26:0 entre 0,3 y 5 %, C27:0 entre 0,3 y 5 %, C28:0 entre 20,0 y 40,0 %, C29:0 entre 1,0 y 3,0 %, C30:0 entre 12,0 y 25,0 %, C31:0 entre 0,5 y 2,0 %, C32:0 entre 5,0 y 15,0 %, C33:0 entre 0,5 y 3,0 %, C34:0 entre 5,0 y 18,0 %, C35:0 entre 0,3 y 1,5 %, y C36:0 entre 1,0 y 8,0 %. Los alcoholes alifáticos primarios presentes en la mezcla son compuestos homólogos entre 24 y 34 átomos de carbono, entre los que predomina el 1-octacosanol (C28), y entre los aldehídos predominan los $\alpha\beta$ insaturados con más de 48 átomos de carbono. Este nuevo IA puede ser formulado para su administración oral en forma sólida (tabletas, cápsulas) o líquida (suspensiones), para lo cual se mezcla con excipientes aceptados por la industria farmacéutica.

Se debe señalar que la proporción en que se encuentran las sustancias de alto peso molecular en el IA objeto de la presente invención no se logra de forma natural mediante simples procesos de extracción y purificación, sino que es el resultado de mezclar, en cantidades específicas, las fracciones extraídas y purificadas de cada grupo de sustancias, dependiendo de la pureza con que ha sido obtenida cada fracción. De esta forma la composición final, objeto de la presente invención, es el resultado de un proceso de estandarización, en el que se llevan los contenidos de cada grupo de compuesto a las concentraciones y proporciones específicas descritas en el presente documento, las cuales son las que garantizan una acción sinérgica entre sus componentes y los efectos farmacológicos deseados; según se ha podido determinar mediante estudios farmacológicos.

En este sentido, los potentes efectos farmacológicos de la presente composición son muy superiores a los efectos de administrar separadamente estos tres grupos de sustancias, lo cual puede ser apreciado en los Ejemplos de Realización y demuestra la ocurrencia de un efecto sinérgico no deducible del estado del arte. Así, el IA objeto de esta invención supera de forma significativa los efectos farmacológicos como antioxidante, tanto del extracto de ácidos grasos como de los extractos de alcoholes grasos y de aldehídos de alto peso molecular, y presenta potentes efectos neuroprotectores que no se observan para ninguno de los tres tipos de sustancias que conforman este IA.

El procedimiento para la obtención de la composición farmacéutica objeto de la presente invención se caracteriza por un paso inicial de hidrólisis de la cera de caña, cruda o refinada, con hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, seguida por procesos de extracción selectiva de los alcoholes y aldehídos, y pasos de purificación de las sales remanentes, así como de las fracciones de alcoholes y aldehídos, empleando en todas las etapas mencionadas anteriormente disolventes orgánicos, o CO₂ en condiciones supercríticas, con una estandarización final de los contenidos de los tres grupos de sustancias a las proporciones específicas descritas, las cuales garantizan el efecto farmacológico deseado.

Efectos ventajosos

Las ventajas de esta composición sobre otras existentes, obtenidas también a partir de la cera de la caña, son que presenta mayor eficacia como antioxidante y un efecto neuroprotector que no está presente en ninguna de las composiciones precedentes. Esta invención tiene aplicación industrial, la composición es novedosa, y tiene carácter inventivo, al no ser deducible del estado del arte que la mezcla de tres grupos de sustancias, en las proporciones y concentraciones que se especifican, muestre un efecto sinérgico con los beneficios farmacológicos descritos previamente. La presente invención se relaciona con la industria alimentaria y con la farmacéutica, pues la composición obtenida puede ser utilizada como suplemento nutricional, por sus efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo y también como un medicamento para prevenir las enfermedades neurológicas, y aquellas relacionadas con trastornos del estrés oxidativo.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Obtención de la mezcla de Sustancias de Alto Peso Molecular (SAPM), con efectos neuroprotector y antioxidante.

Un kg de cera de caña cruda fue sometido a un proceso de hidrólisis básica con hidróxido de potasio, posteriormente a lo cual la cera saponificada se sometió a extracción con CO₂ en condiciones supercríticas, y tanto la mezcla de sales remanentes como las fracciones de alcoholes y aldehídos extraídas con CO₂ fueron sometidas a pasos de purificación con hexano y acetona. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases y por espectrofotometría para determinar sus contenidos de sales, alcoholes y aldehídos, y posteriormente se mezclaron en las proporciones requeridas para lograr la proporción

siguiente: 76 % de ácidos grasos como sales potásicas, 13 % de alcoholes grasos y 11 % de aldehídos de alto peso molecular; donde los ácidos grasos estuvieron en la proporción siguiente: C26:0 1,5%, C27:0 1,4 %, C28:0 30,6 %, C29:0 1,2 %, C30:0 13,5 %, C31:0 1,0 %, C32:0 8,3 %, C33:0 1,7 %, C34:0 11,6 %, C35:0 1,4 %, y C36:0 3,8 %.

Ejemplo 2. Obtención de la mezcla de Sustancias de Alto Peso Molecular (SAPM), con efectos neuroprotector y antioxidante.

Un kg de cera de caña refinada fue sometido a un proceso de hidrólisis básica con hidróxido de calcio, posteriormente a lo cual la cera saponificada se sometió a extracción con hexano en caliente, se enfrió la fracción orgánica y el sólido recristalizado se sometió a un proceso de purificación mediante lavados sucesivos con etanol y acetona. Tanto la mezcla de sales remanentes como la fracción extraída y purificada fueron analizadas por cromatografía de gases y por espectrofotometría para determinar sus contenidos de sales, alcoholes y aldehídos, y posteriormente se mezclaron en las proporciones requeridas para lograr la proporción siguiente: 70 % de ácidos grasos como sales de calcio, 19 % de alcoholes grasos y 11% de aldehídos de alto peso molecular; donde los ácidos grasos estuvieron en la proporción siguiente: C26:0 1,2 %, C27:0 1,1 %, C28:0 26,3 %, C29:0 1,1 %, C30:0 15,3 %, C31:0 0,7 %, C32:0 6,9 %, C33:0 1,5 %, C34:0 11,4 %, C35:0 1,0 %, y C36:0 3,7 %.

Ejemplo 3. Evaluación de los efectos neuroprotector y antioxidante en modelo de inducción de isquemia cerebral.

Para la evaluación del efecto neuroprotector de la mezcla de sustancias de altos pesos moleculares, objeto de la presente invención se utilizó un modelo experimental de isquemia cerebral global por oclusión y reperusión de las arterias carótidas. La composición de Sustancias de Alto Peso Molecular (SAPM) obtenida en el ejemplo 1 fue sometida a un ensayo preclínico con animales, en el que se comparó su efecto farmacológico con los efectos de los extractos puros de Ácidos Grasos en forma de Sales (AcGS), de alcoholes grasos (AlcG) y de aldehídos de alto peso molecular (AldG), los cuales se administraron en la dosis equivalente a la proporción en que cada uno se presenta en 200 mg/kg del Ingrediente Activo SAPM. Además, el efecto del SAMP se comparó con el efecto del extracto puro de ácidos grasos libres (AcGL) administrados a dosis iguales.

Se utilizaron *Mongolian gerbils* machos (60-80 g), los cuales fueron adaptados durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida. Las diferentes sustancias a evaluar se prepararon como suspensiones en un vehículo acacia/agua (1 %).

Una vez culminada la cuarentena los gerbils se distribuyeron en 8 grupos: un control negativo que solo recibió vehículo y no se le indujo la isquemia cerebral (IC) y 7 grupos con IC inducida. Uno de los grupos con IC inducida fue el control positivo, tratado solo con el vehículo, y los otros 6 grupos con IC se trataron con SAPM (200 mg/kg), AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg), AldG (28 mg/kg), AcGL (200 mg/kg), y con aspirina (60 mg/kg) como sustancia de referencia. Todos los tratamientos se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (0,5 mL/70 g de peso corporal) 1 hora previa a la inducción de la isquemia. La isquemia cerebral global se indujo mediante isquemia y perfusión bilateral. Para ello los gerbils se anestesiaron en atmósfera de halotano, se realizó una incisión en la línea media ventral del cuello y se expusieron las dos arterias carótidas comunes. Se procedió a aislar y separar dichas arterias colocando un hilo de seda negro a su alrededor, y seguidamente se les permitió recuperarse de la anestesia por 30 min. Culminado este tiempo, se retiró el hilo de seda y se colocó una presilla de presión en cada carótida de manera tal que obstruyera totalmente el flujo sanguíneo durante 5 min. La presilla fue entonces retirada para permitir la recirculación sanguínea durante 24 horas.

La evaluación de la función neurológica se realizó a las 4 horas de la isquemia/reperfusión (según McGraw, 1977), como sigue: 0: ausencia de síntomas; 1: curvatura del torso o erizamiento del pelo; 2: ptosis; 3: movimiento en círculos (circling behaviour); 4: patas traseras extendidas y 5: convulsiones. La actividad locomotora de los gerbils se evaluó en campo abierto a las 24 horas post-isquemia (según Katsumata y cols, 2006). Para ello cada gerbil se colocó en el centro de una caja de 60,5 cm de largo x 30 cm de alto x 46 cm de ancho con el fondo dividido en 12 cuadrantes de 14,5 cm². Durante 6 minutos se cuantificó las veces que los gerbils cruzaron los diferentes cuadrantes con las patas delanteras y las veces que realizaron paradas o empinamientos.

Culminada la observación conductual, los gerbils se anestesiaron en atmósfera de halotano

y se tomaron muestras de sangre de la vena cava que se colectaron en tubos plásticos y se mezclaron con EDTA (10 %). Inmediatamente se removieron sus cerebros para el análisis histológico. La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 10 min para la obtención del plasma, donde se realizó la cuantificación bioquímica de peroxidación lipídica y oxidación proteica. Para la determinación de la peroxidación lipídica se cuantificó la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) (según Ohkawa et al., 1979) en plasma, y se expresa como nmol malondialdehído (MDA)/mg de proteína.

Para la determinación de la oxidación proteica se determinaron los grupos sulfidrilos (SH) (técnica descrita por Miao-Lin Hu, 1994). Se tomó una alícuota de 50 μ L de plasma, 950 μ L de DTNB 10 mM. Se incubó por 20 min a temperatura ambiente. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 412 nm. El blanco se preparó con DTNB y el total de grupos SH se calculó usando una absortividad de 13,600 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y se expresó en mmol. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Marxwell, 1987).

Para el análisis histológico los cerebros se fijaron en formaldehído tamponado al 10%, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y las secciones que contenían el hipocampo se colorearon con hematoxilina y eosina. Las secciones de cada cerebro se evaluaron por un sistema de puntaje por microscopía de luz para la determinación de daño de las células piramidales del área CA1 del hipocampo con promedios bilaterales. Este sistema de puntaje histopatológico (basado en el método utilizado por Bartus et al., 1998) fue: 0=células coloreadas normales, densamente pobladas, con soma redondeado y un núcleo central bien coloreado; 1=algún encogimiento e irregularidad en la forma celular, con una región pálida cromatolítica rodeada por un anillo periférico de citoplasma; 2= alguna pérdida celular aparente con áreas de células picnóticas; 3= moderada pérdida celular y picnosis; 4= pérdida de la sustancia de Nissl, indicando marcada depleción de neuronas y solo alguna neurona ocasional entre numerosas microglías.

Resultados

La isquemia cerebral global, incluso por un corto período de tiempo, conduce a la neurodegeneración selectiva en regiones vulnerables del cerebro, por ejemplo, la región

Cortical Adyacente (CA) del hipocampo. Particularmente, las neuronas piramidales CA1 se encuentran entre las células más vulnerables al daño por isquemia/reperfusión (Sharma, 2005 y Kirino, 2000). El modelo de isquemia cerebral global inducido por la ligadura bilateral de las dos arterias carótidas comunes durante 5 minutos y su reperfusión por 24 h constituye un modelo útil en la evaluación de sustancias con potencial efecto beneficioso en el ictus isquémico (Ravinder, 2009). La evaluación neurológica de acuerdo con puntaje de síntomas clínicos de McGraw y el aumento en la actividad locomotora medida en la prueba de campo abierto constituyen indicadores de daño histológico en el tejido cerebral (McGraw, 1977; Katsumata, 2006).

Los resultados mostraron la presencia de los síntomas clínicos y aumento de la locomoción en los animales controles positivos, alteraciones antagonizadas por la aspirina, lo cual concuerda con lo referido para este modelo y sustenta su validez en nuestras condiciones experimentales. Este estudio demuestra que la composición SAPM (200 mg/kg) presenta capacidad en reducir significativamente los síntomas clínicos (91,6 % de inhibición) y la hiperlocomoción (86,1% de inhibición) inducidos por la isquemia cerebral global en *Mongolian gerbils*. El tratamiento con cada extracto puro de los componentes individuales del SAPM (AcGS, AlcG y AldG), produjo reducciones moderadas, pero significativas, del puntaje de síntomas clínicos (36,6; 21,6 y 11,6 % de inhibición, respectivamente) y de la hiperlocomoción (33,4; 21,7 y 11,1 % de inhibición, respectivamente), respecto al grupo control positivo. La comparación del SAMP (200 mg/kg) con cada extracto puro de sus componentes individuales resultó significativa, mostrando mayor eficacia, e incluso siendo superior a la sumatoria de los efectos de los tres extractos, lo que demuestra un efecto sinérgico o de potenciación entre los 3 componentes al administrarse de manera conjunta en el IA SAMP. (Tabla 1)

Por otra parte, la administración con SAMP (200 mg/kg) también produjo una protección de los síntomas clínicos, significativamente superior al del extracto puro de AcGL (200 mg/kg), lo que demuestra una mejor protección neurológica con el extracto que combina la presencia de ácidos grasos en forma de sales, los alcoholes grasos y los aldehídos grasos. (Tabla 1)

Tabla 1. Efectos sobre el puntaje de síntomas clínicos y la actividad locomotora (campo abierto) en *Mongolian gerbils* con I-R cerebral global.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Puntaje de SC	Inhibició n (%)	Cruces (#)	Inhibició n (%)
Control negativo (Vehículo)	0	$0 \pm 0^{***}$	--	$250.8 \pm 14.8^{**}$	--
Control positivo (Vehículo + I/R)	0	3.00 ± 0.52	---	355.5 ± 12.4	---
SAPM + I/R	200	$0.25 \pm 0.12^{***ab}$	91,6	$265,3 \pm 9,4^{**ab}$	86,1
AcGS + I/R	132	$1,90 \pm 0,35^{**}$	36,6	$320,5 \pm 13,5^*$	33,4
AlcG + I/R	40	$2,35 \pm 0,25^*$	21,6	$332,7 \pm 13,5^*$	21,7
AldG + I/R	28	$2,65 \pm 0,40^*$	11,6	$343,8 \pm 12,2^*$	11,1
AcGL + I/R	200	$1,85 \pm 0,32^{**}$	38,3	$322,8 \pm 15,1^*$	31,2
ASA + I/R	60	$0,40 \pm 0,35^{**}$	86,6	$286,2 \pm 15,2^*$	66,2

Datos como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media)

SC: Síntomas clínicos

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparación con el grupo control positivo
a $p < 0,05$ comparación con AcGS y AcGL; b $p < 0,001$ comparación con AlcG y con AldG
(U de Mann Whitney)

La Tabla 2 muestra los resultados del estudio histológico. Los cerebros de los controles negativos no mostraron alteraciones, mientras la totalidad de los cerebros de los controles positivos presentó desaparición y daño de numerosas células piramidales de la región CA1. El tratamiento con aspirina (60 mg/kg), sustancia de referencia, redujo moderada (32,4%) y significativamente el puntaje histológico de daño cerebral, lo cual valida los resultados en nuestras condiciones experimentales.

El tratamiento con SAMP (200 mg/kg) redujo significativamente el puntaje histológico de

daño cerebral (89,8 % de inhibición) inducido por la isquemia reperusión bilateral en *Mongolian gerbils*. Los extractos puros individuales con AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg) y AldG (28 mg/kg) redujeron significativamente el puntaje histológico respecto al control positivo. La comparación entre el SAMP y cada uno de los extractos de sus componentes individuales arrojó una mayor eficacia no solo respecto a cada extracto puro, sino superior a la sumatoria de los tres. Este resultado concuerda con lo observado sobre la sintomatología clínica y refuerza el criterio del sinergismo entre los tres componentes presentes en el IA SAMP.

La administración con SAMP (200 mg/kg) también resultó más eficaz que el extracto puro de AcGL (200 mg/kg) para proteger del daño histológico, lo que corrobora lo observado sobre la sintomatología clínica, corroborando una mejor protección neurológica con el extracto que combina la presencia de ácidos grasos en forma de sales, los alcoholes grasos y los aldehídos grasos. (Tabla 2)

Tabla 2. Efectos sobre el puntaje histológico de cerebros de Mongolian gerbils con I-R.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Puntaje histológico	Inhibición (%)
Control negativo (Vehículo)	0	0,00 ± 0,00 ***	--
Control positivo (Vehículo + I/R)	0	2,96 ± 0,07	---
SAPM + I/R	200	0,30 ± 0,09***ab	89,8
AcGS + I/R	132	1,97 ± 0,06 **	33,4
AlcG + I/R	40	2,32 ± 0,06 *	21,6
AldG + I/R	28	2,66 ± 0,05 *	10,1
AcGL + I/R	200	1,95 ± 0,07 **	34,1
ASA + I/R	60	2,00 ± 0,15 **	32,4

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

*p<0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001 comparación con control positivo

a p <0,05 comparación con AcGS y AcGL; b p <0,001 comparación con AlcG y con AldG
(U de Mann Whitney)

Los resultados del estudio sobre las variables oxidativas asociadas al proceso de isquemia cerebral global inducido por isquemia y reperfusión en *Mongolian gerbils* se muestran en la Tabla 3. El proceso de isquemia y reperfusión incrementó las concentraciones plasmáticas de MDA (indicador de peroxidación lipídica) y de grupos sulfhidrilos (indicador de oxidación proteica) en el grupo control positivo, respecto a la de los animales sanos del grupo control negativo.

La administración oral con SAMP (200 mg/kg) previno significativamente el incremento en las concentraciones plasmáticas de MDA y grupos SH (97.7 y 80 % de inhibición, respectivamente), comparado con el grupo control positivo. Los extractos puros individuales con AcGS (132 mg/kg) y AlcG (40 mg/kg) redujeron significativamente las concentraciones plasmáticas de MDA (41.5 y 25.9 % de inhibición, respectivamente) y grupos SH (80 y 36% de inhibición, respectivamente) respecto al control positivo. Por su parte, el extracto puro con AldG (28 mg/kg) produjo una ligera reducción sobre MDA (11% de inhibición) y grupos SH (12% de inhibición), sin que alcanzara significación estadística. La comparación entre el SAMP y cada uno de los extractos de sus componentes individuales arrojó una mayor eficacia no solo respecto a cada extracto puro, sino superior a la sumatoria de los tres. Por tanto, estamos en presencia de un efecto antioxidante de esta nueva sustancia SAMP, que protege tanto las estructuras lipídicas como proteicas, cuya eficacia se corresponde con un efecto sinérgico entre sus tres componentes.

Por otra parte, el extracto AcGL (200 mg/kg) también produjo un efecto antioxidante al reducir significativamente los valores plasmáticos de MDA (40% de inhibición) y grupos SH (36 % de inhibición) comparados con el control positivo. No obstante, la comparación del SAMP (200 mg/kg) con el AcGL (200 mg/kg) mostró una eficacia antioxidante superior del SAMP, lo cual sustenta su mayor eficacia neuro-protectora, demostrada tanto en la sintomatología clínica como en el puntaje histológico de daño cerebral.

El tratamiento con ASA (60 mg/kg) no modificó ninguna de estas variables oxidativas, lo cual se corresponde con su perfil de acción, ya que su eficacia neuro-protectora se sustenta en su actividad anti-plaquetaria y no en efectos antioxidantes.

Tabla 3. Efectos sobre las concentraciones plasmáticas de MDA y grupos sulfidrilos de *Mongolian gerbils* con I-R cerebral.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	MDA (nM/ mgPt)	Inhibición n (%)	SH (mmol)	Inhibición n (%)
Control negativo (Vehículo)	0	38,8 ± 3,01**	--	0,40 ± 0,02**	--
Control positivo (Vehículo + I/R)	0	72,16 ± 5,88	---	0,65 ± 0,03	---
SAPM + I/R	200	39,55 ± 1,55***ab	97,7	0,45 ± 0,01 ***ab	80
AcGS + I/R	132	58,3 ± 1,8 **	41,54	0,56 ± 0,02 **	36
AlcG + I/R	40	63,5 ± 2,3 *	25,9	0,59 ± 0,01 *	24
AldG + I/R	28	68,50 ± 3,42	11	0,62 ± 0,02	12
AcGL + I/R	200	58,8 ± 2,1 **	40,04	0,56 ± 0,02 **	36
ASA + I/R	60	72,30 ± 4,63	0,0	0,62 ± 0,03	12

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

*p<0,05; *** p< 0,001 comparación con control positivo

a p <0,05 comparación con AcGS y AcGL; b p <0,001 comparación con AlcG y con AldG (U de Mann Whitney)

Ejemplo 4. Evaluación del efecto neuroprotector en modelo de inducción de isquemia en médula espinal.

El efecto neuroprotector de la mezcla de SAPM objeto de la presente invención también fue investigado mediante un modelo experimental de inducción de isquemia en médula espinal. La composición obtenida en el ejemplo 2 fue sometida a un ensayo preclínico en el que se comparó su efecto farmacológico con los efectos de extractos puros de Ácidos Grasos en forma de Sales (AcGS), de alcoholes grasos (AlcG) y de aldehídos de alto peso molecular

(AldG), los cuales se administraron a dosis equivalentes a la de esas respectivas sustancias en 200 mg/kg del Ingrediente Activo SAPM. Además, el efecto del SAMP se comparó con el del extracto puro de ácidos grasos libres (AcGL) administrados a dosis iguales.

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda machos (1.8 – 2.2 kg), los cuales fueron adaptados durante 15 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida.

Las sustancias SAPM, AcGS, AlcG, AldG, AcGL y aspirina se prepararon como suspensiones en un vehículo acacia/agua (1 %). Una vez culminada la cuarentena los conejos se distribuyeron en 8 grupos: un control negativo que solo recibió vehículo y no se le indujo la isquemia y 7 grupos con isquemia de médula espinal: un control positivo tratado solo con el vehículo, y 6 grupos se trataron con SAPM (200 mg/kg), AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg), AldG (28 mg/kg), AcGL (200 mg/kg), y aspirina (2 mg/kg) como sustancia de referencia. Todos los tratamientos se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (1 mL/2 kg de peso corporal) durante 10 días.

Para la inducción de la isquemia en médula espinal los conejos se anestesiaron con tiopental (20 mg/kg i.v). El abdomen fue depilado, aplicada una solución antiséptica, realizándose una incisión en la línea media ventral y penetrado el espacio retroperitoneal. La aorta y la arteria renal izquierda fueron disecadas y expuestas. La aorta fue ligada colocándose una presilla inmediatamente debajo de la arteria renal izquierda durante 20 minutos, al cabo de los cuales se retiró iniciándose el período de perfusión. La incisión fue suturada. A las 4 y 24 horas de perfusión el déficit neurológico de los animales fue evaluado a ciegas por 2 observadores independientes (de acuerdo con Zivin y cols., 1982). La escala empleada fue la siguiente:

Grado 0: parálisis completa

Grado 1: déficit neurológico parcial

Grado 3: normal

Los animales se sacrificaron a las 24 horas de la reperusión. Para el análisis histológico se extrajeron secciones de médula. Una vez extraídos los segmentos de medula espinal (lumbar) se fijaron en formaldehído tamponado al 10%. Las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4µm en un micrómetro horizontal. Las secciones se colorearon con hematoxilina y eosina. Posteriormente se observaron en un microscopio Olympus BH2. Las lesiones medulares se evaluaron a ciegas utilizando el criterio descrito por De Girolami, 1982 y Zivin, 1982.

3- Ninguna lesión

2- Leve: Cuando en la muestra de la sustancia gris solo se detecten de 1 a 10 neuronas necróticas con menos del 33% de la sustancia involucrada.

1-Moderada: Cuando en la muestra de la sustancia gris solo se detecten de 10 a 20 neuronas necróticas con 33 – 66 % del área de sección involucrada.

0-Severa: Cuando en la muestra de la sustancia gris solo se detecte que contenga más de 20 neuronas necróticas con más del 66 % del área de sección involucrada.

Resultados

La oclusión y reperusión de la aorta abdominal produce en el conejo un daño neurológico que se traduce en la parálisis de las patas posteriores y su incapacidad para saltar. La tabla 4 muestra el puntaje de los síntomas clínicos del déficit neurológico, y el porcentaje de la mortalidad. Con 20 minutos de oclusión de la aorta abdominal, los animales controles positivos presentaron esta sintomatología, con un puntaje significativamente inferior al del grupo control negativo (animales sanos), a la vez que presentaron un 80% de mortalidad. La administración de aspirina (2 mg/kg), sustancia de referencia, protegió significativamente tanto de la sintomatología clínica como la mortalidad, lo cual valida los resultados obtenidos en las condiciones experimentales. Los tratamientos con dosis repetidas de SAPM (200 mg/kg) incrementaron significativamente el puntaje de síntomas clínicos a las 4 y 24 horas de reperusión de la aorta abdominal, y redujo la mortalidad en su totalidad. Los tratamientos con AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg) y AldG (28 mg/kg) protegieron significativamente de la sintomatología clínica a las 4 y 24 horas, mientras que solo el AcGS redujo la mortalidad a un 50% comparado con el grupo control positivo (80%). La comparación del SAMP (200 mg/kg) con respecto a los extractos puros de sus componentes individuales

también arrojó significación estadística, indicando mayor eficacia del SAMP que cada uno por separado. Además, el extracto con AcGL (200 mg/kg) también protegió de la sintomatología clínica y de la mortalidad, si bien su comparación con el SAMP mostró mayor eficacia de este último.

Por tanto, la comparación entre los resultados de los tratamientos mostró mayor eficacia de la SAPM respecto a los demás para mejorar los síntomas clínicos, a las 4 y 24 horas de la reperfusión, así como para reducir la mortalidad. La composición SAPM protegió significativamente de la mortalidad, de modo tal que la frecuencia de muertes en el grupo tratado con esta sustancia (0,0 %) fue significativamente inferior a la de los controles positivos (80 %), lo que indica un 100 % de protección.

El análisis histológico (Tabla 5) mostró lesiones severas en las médulas de los animales del grupo control positivo, caracterizadas por la necrosis neuronal y la vacuolización del neurópilo. La aspirina produjo una protección modesta, pero significativa, respecto al control positivo.

El tratamiento con SAPM (200 mg/kg) inhibió significativamente el daño histológico en la médula espinal, ocasionado por el déficit neurológico, alcanzando la mayor eficacia de todos los tratamientos aplicados (93,3% de inhibición). Los tratamientos con AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg), y AldG (28 mg/kg) protegieron moderadamente del daño histológico (40, 24 y 11,6 % de inhibición, respectivamente), siendo la eficacia del SAMP superior a la de cada uno de ellos e incluso superior a la sumatoria de los efectos de los tres. Este resultado indica la presencia de un efecto sinérgico de las tres sustancias presentes en el IA SAMP para proteger del déficit neurológico en médula espinal de conejos con isquemia y reperfusión. Además, la protección del SAMP fue superior a la observada con el extracto puro de AcGL, lo que demuestra ventajas para este nuevo IA.

En conclusión, el tratamiento con la composición SAPM presentó ventajas en el beneficio neuroprotector al reducir, con mayor eficacia, la sintomatología clínica, la mortalidad y el puntaje de daño histológico en médula espinal.

Tabla 4. Efectos sobre la sintomatología y mortalidad en conejos con daño de la médula espinal inducido por isquemia-reperfusión.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Puntaje		Mortalidad 24 h (%)
		4hs	24 hs	
Control negativo (Vehículo)	0	$2 \pm 0^{***}$	$2 \pm 0^{***}$	0
Control positivo (Vehículo + I/R)	0	$0,30 \pm 0,17$	$0,15 \pm 0,1$	80
SAPM + I/R	200	$1,75 \pm 0,3^{***ab}$	$1,5 \pm 0,13^{***ab}$	0++ cd
AcGS + I/R	132	$1,05 \pm 0,26^{**}$	$0,82 \pm 0,18^{**}$	50 +
AlcG + I/R	40	$0,82 \pm 0,18^*$	$0,72 \pm 0,11^*$	60
AldG + I/R	28	$0,54 \pm 0,16^*$	$0,48 \pm 0,1^*$	70
AcGL + I/R	200	$1,1 \pm 0,22^{**}$	$0,80 \pm 0,15^{**}$	50 +
ASA + I/R	2	$0,90 \pm 0,25^*$	$0,50 \pm 0,24^*$	40+

Datos como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparación con control positivo

a $p < 0,05$ comparación con AcGS y AcGL; b $p < 0,001$ comparación con AlcG y con AldG
(U de Mann Whitney)

+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; comparación con control positivo

c $p < 0,01$ comparación con AcGS y AcGL; d $p < 0,05$ comparación con AlcG y con AldG
(test de la probabilidad exacta de Fisher)

Tabla 5. Efectos sobre el puntaje histológico de médula espinal de conejos con I-R.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Puntaje histológico	Inhibición (%)
Control negativo (Vehículo)	0	$3,00 \pm 0,00^{***}$	--
Control positivo (Vehículo + I/R)	0	$0,00 \pm 0,05$	--
SAPM + I/R	200	$2,80 \pm 0,19^{***ab}$	93,3
AcGS + I/R	132	$1,20 \pm 0,14^{**}$	40
AlcG + I/R	40	$0,72 \pm 0,13^*$	24
AldG + I/R	28	$0,35 \pm 0,08^*$	11,6

AcGL + I/R	200	1,22 ± 0,13 **	40,6
ASA + I/R	60	0,9 ± 0,15 *	30

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

*p<0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001 comparación con control positivo

a p <0,05 comparación con AcGS y AcGL; b p <0,001 comparación con AlcG y con AldG
(U de Mann Whitney)

Ejemplo 5. Evaluación del efecto neuroprotector en modelo de daño neuronal inducido con un agente tóxico.

El efecto neuroprotector de la mezcla de SAPM objeto de la presente invención también fue investigado mediante un modelo experimental de inducción de daño neuronal inducido con ácido kaínico. La composición obtenida en el ejemplo 2 fue sometida a un ensayo preclínico en el que se comparó su efecto farmacológico con los efectos de extractos puros de Ácidos Grasos en forma de Sales (AcGS), alcoholes grasos (AlcG) y de aldehídos de alto peso molecular (AldG), preparadas con dosis iguales a las dosis de esas respectivas sustancias en el Ingrediente Activo SAPM. Además, se comparó con un extracto puro de Ácidos Grasos libres (AcGL).

Se utilizaron ratas Wistar machos (250-300g), los cuales fueron adaptados durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 0C, humedad relativa de 60 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida.

Las sustancias SAPM, AcGL, AcGS, AlcG, AldG y aspirina se prepararon como suspensiones en un vehículo acacia/agua (1 %). Una vez culminada la cuarentena las ratas se distribuyeron en 7 grupos: un control negativo al que no se le provocó daño neuronal, pues solo recibió vehículo y 6 grupos con neurotoxicidad. De estos últimos, uno fue un control positivo tratado solo con el vehículo, y los otros 5 grupos se trataron con SAPM (200 mg/kg), AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg), AldG (28 mg/kg) y AcGL (200 mg/kg). Todos los tratamientos se administraron por vía oral mediante entubación intragástrica (5 mL/kg de peso corporal) 30 minutos previa a la inducción neurotóxica.

La neurotoxicidad se indujo mediante inyección de ácido kaínico (6 mg/kg; i.p) a las ratas. Una hora después se evaluó la actividad exploratoria de las ratas en campo abierto (Fernández, 1987). Para ello, las ratas fueron colocadas en el centro de una caja (60,5 cm de largo x 30 cm de alto x 46 cm de ancho, fondo dividido en 12 cuadrantes de 14,5 cm²), y se cuantificó las veces que cruzaron (C) los diferentes cuadrantes, así como las veces que realizaron paradas o empinamientos (P) durante los 6 minutos siguientes a su colocación en el dispositivo.

Una vez culminado el experimento conductual, las ratas se sacrificaron en atmósfera de halotano, y los cerebros fueron extraídos rápidamente, fijándose en formaldehído tamponado al 10 %. Las secciones tangenciales de cerebro fueron posteriormente embebidas en parafina, cortadas y coloreadas con fuchsina ácida al 1 % durante 30 segundos para la detección de muerte neuronal (Lee, 2000). La presencia de neuronas acidofílicas (positivas al ácido kaínico) es una variable indicativa de daño neuronal (Lee, 2002). Para el conteo de células positivas al ácido kaínico se estudiaron en un microscopio de luz las neuronas piramidales de CA1 y CA 3 del hipocampo de cada rata en una extensión de 250 μ m² en el centro de dichas regiones (Savaskan, 2002).

Resultados

El ácido kaínico es un análogo del glutamato, que inyectado por vía sistémica o intracerebral produce neurotoxicidad debida a una degeneración neuronal selectiva, en la cual participan los receptores a esta sustancia (Coyle, 1983; Borg, 1991). Dependiendo de la dosis administrada, el ácido kaínico puede inducir ataques no convulsivos o convulsivos, de tal modo que dosis no convulsivantes inducen cambios en la conducta espontánea y dañan el proceso relativo al mantenimiento de atención, siendo posible analizar estos efectos sobre la conducta animal (Mikulecka, 1999).

La administración de ácido kaínico indujo una reducción de ambos componentes de la actividad exploratoria (cruces y paradas) y de la actividad exploratoria global respecto al grupo control negativo, lo que se corresponde con los cambios conductuales referidos en la literatura y le confiere validez al modelo en nuestras condiciones experimentales. La administración oral de dosis únicas con SAPM (200 mg/kg) incrementó ambos

componentes, así como la actividad total, respecto al grupo control positivo, alcanzando la mayor eficacia de todos los tratamientos. Los tratamientos con AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg) y AldG (28 mg/kg) incrementaron los cruces y las paradas, así como la actividad total, si bien este último solo alcanzó significación estadística sobre la total. El SAMP (200 mg/kg) presentó mayor eficacia que cada uno de sus componentes individuales (AcGS, AlcG y AldG) sobre todas las variables conductuales medidas, e incluso superior a la sumatoria de los efectos de las tres sustancias. Además, la eficacia del SAMP para incrementar los cruces, paradas y su sumatoria, fue superior a la del extracto de AcGL (200 mg/kg), lo que corrobora la ventaja de este nuevo IA. (Tabla 6)

La Tabla 7 muestra los resultados del estudio histológico. Como se esperaba, la administración sistémica de ácido kaínico produjo una pérdida neuronal, la cual se relaciona con los efectos que esta excitotoxina induce en el hipocampo de la rata, al inducir la pérdida de las neuronas piramidales en las regiones del hipocampo CA1 y CA3 (Mikulecka, 1999; Pérez, 1996). La administración con SAPM (200 mg/kg) disminuyó significativamente el grado de muerte neuronal (85.3% de inhibición). Los extractos puros de AcGS (132 mg/kg), AlcG (40 mg/kg) y AldG (28 mg/kg) redujeron moderadamente la muerte neuronal (35, 22.05 y 11.7 % de inhibición, respectivamente). La comparación entre los efectos del SAMP con cada uno de sus componentes individuales arrojó diferencias significativas, indicando mayor eficacia de este extracto que presenta las tres sustancias de forma combinada. Al mismo tiempo, su eficacia fue superior a la sumatoria de los efectos individuales de cada sustancia por separado, lo que indica la presencia de un efecto sinérgico en la neuroprotección del SAMP en este modelo.

Por su parte, el extracto de AcGL (200 mg/kg) también ejerció un efecto neuroprotector al proteger moderadamente de la muerte neuronal ejercida por el AK (30.8% de inhibición, si bien en este caso también el extracto SAMP resultó superior en eficacia.

Por tanto, el hecho de que la composición SAMP protegiera de la muerte neuronal en este modelo corrobora sus efectos neuroprotectores observados en los modelos descritos en los ejemplos anteriores, y su eficacia superior al resto de los tratamientos, así como su efecto sinérgico entre las sustancias que lo componen representa ventajas potenciales en los tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas.

Tabla 6. Efectos sobre la actividad exploratoria (campo abierto) de ratas con neurotoxicidad inducida por ácido kaínico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Cruces (#)	Paradas (#)	Cruces + Paradas (#)
Control negativo (Vehículo)	0	40,0 ± 3,83***	15,8 ± 1,88***	55,8 ± 3,41***
Control positivo (Vehículo + AK)	0	17,7 ± 4,56	4,3 ± 1,12	22,0 ± 3,2
SAPM + AK	200	38,7 ± 2,5**ab	15,00 ± 1,9**ab	53,7 ± 4,3 **ab
AcGS + AK	132	27,5 ± 2,3 *	10,3 ± 1,5 *	37,8 ± 3,5 *
AlcG + AK	40	24,0 ± 4,2*	8,1 ± 0,9 *	32,1 ± 2,2*
AldG + AK	28	21,8 ± 3,7	6,6 ± 1,1	28,4 ± 2,8*
AcGL+ AK	200	28,6 ± 3,4*	10,2 ± 2,5*	38,8 ± 4,5*

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

*p<0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001 comparación con control positivo

a p <0,05 comparación con AcGS y AcGL; b p <0,001 comparación con AlcG y con AldG (U de Mann Whitney)

Tabla 7. Efectos sobre la sobre la muerte neuronal en ratas con neurotoxicidad inducida por ácido kaínico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Muerte neuronal (#)	Inhibición (%)
Control negativo (Vehículo)	0	0,00 ± 0,00 ***	--
Control positivo (Vehículo + AK)	0	34,00 ± 1,25	---
SAPM + AK	200	5,0 ± 0,8 ***ab	85,3
AcGS + AK	132	22,1 ± 1,5 *	35
AlcG + AK	40	26,5 ± 1,2 *	22,05
AldG + AK	28	30,0 ± 0,6 *	11,7
AcGL+ AK	200	23,5 ± 1,10 *	30,8

Datos como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media)

(# de células positivas a la coloración fuschina ácida)

*p<0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001 comparación con control positivo

a p <0,05 comparación con AcGS y AcGL; b p <0,001 comparación con AlcG y con AldG
(U de Mann Whitney)

Ejemplo 7. Obtención de tabletas

5 kg de la composición obtenida en el ejemplo 1, se mezclaron con 5 kg de carboxymetilcelulosa, 30 kg de lactosa y 10 kg de celulosa microcristalina en un tambor de acero inoxidable tipo rotatorio a 5 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 1 kg de estearato de magnesio a la mezcla anterior y el granulado completo se continuó mezclando en el tambor rotatorio a 5 rpm durante 5 minutos.

La mezcla final se prensó con una tableteadora a una velocidad de 30 000 tabletas/hora para obtener tabletas con un peso promedio de 450 mg. Estas tuvieron forma redonda convexa por ambas caras con diámetro de 12 mm, su tiempo de desintegración en agua fue menor de 20 min, su friabilidad fue menor de 1 %, y su dureza estuvo entre 44 y 60 N, según métodos USP.

Ejemplo 8. Recubrimiento de las tabletas

Las tabletas obtenidas en el ejemplo anterior pueden ser recubiertas. Para ello, se mezclaron con los ingredientes siguientes en una mezcladora de propela para formar una suspensión recubridora: 25 kg de acetofalato de celulosa en una solución acuosa al 28 %, 0,6 kg de talco, 0,9 kg de dióxido de titanio. Las tabletas recubiertas tuvieron un peso final de 470 mg. A la disolución de recubrimiento se le puede añadir colorante y las tabletas recubiertas se les pueden dar brillo con cera o parafina.

Ejemplo 9. Obtención de cápsulas

El granulado obtenido en el Ejemplo 7 puede ser encapsulado de forma alternativa. Para ello, cápsulas duras de gelatina tamaño 1 se llenaron con 430 mg del granulado obtenido en el ejemplo 7 con lo cual se obtuvieron cápsulas con las características siguientes: peso promedio 455.0 $\pm$ 30 mg, desintegración en agua, menor de 20 minutos.

Ejemplo 10. Preparación de suspensión

200 g de la composición presentada en el Ejemplo 2, 40 kg de sorbitol, 5.00 g de preservantes (mezcla de metil y propil parabenos disueltos en alcohol) se mezclaron con 158 litros de agua en reactor de acero inoxidable provisto con propela de agitación. Posteriormente se añadió 2 kg de esencia de manzana y se continuó la agitación. La suspensión formada se envasó a razón de 115 mL en frascos de vidrio ámbar con tapas plásticas y se recomendó una cucharada (15 ml) como unidad posológica.

MEZCLA DE COMPUESTOS CON ALTOS PESOS MOLECULARES, OBTENIDA A PARTIR DE LA CERA DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de compuestos con altos pesos moleculares, obtenida a partir de la cera de caña de azúcar, caracterizada por estar conformada por ácidos grasos entre 26 y 36 átomos de carbono en forma de sales alcalinas o alcalinotérreas, alcoholes alifáticos primarios entre 24 y 34 átomos de carbono y aldehídos $\alpha\beta$ insaturados con más de 48 átomos de carbono.
2. Mezcla de compuestos con altos pesos moleculares, según reivindicación 1, caracterizada por contener entre 60 % y 80 % en peso de ácidos grasos en forma de sales alcalinas o alcalinotérreas en la proporción siguiente: C_{26:0} entre 0,3 y 5 %, C_{27:0} entre 0,3 y 5 %, C_{28:0} entre 20,0 y 40,0 %, C_{29:0} entre 1,0 y 3,0 %, C_{30:0} entre 12,0 y 25,0 %, C_{31:0} entre 0,5 y 2,0 %, C_{32:0} entre 5,0 y 15,0 %, C_{33:0} entre 0,5 y 3,0 %, C_{34:0} entre 5,0 y 18,0 %, C_{35:0} entre 0,3 y 1,5 %, y C_{36:0} entre 1,0 y 8,0 %; así como alcoholes alifáticos primarios homólogos (10-30 % en peso) entre 24 y 34 átomos de carbono, entre los que predomina el 1-octacosanol; y aldehídos (10-30 % en peso), entre los que predominan los $\alpha\beta$ insaturados con más de 48 átomos de carbono.
3. Mezcla de compuestos con altos pesos moleculares, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque las sustancias que contiene son obtenidas a partir de cera cruda o refinada de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante un proceso que involucra la saponificación de la cera con hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, seguida por sucesivas etapas de extracción y purificación de fracciones de sales de ácidos grasos, alcoholes y aldehídos de alto peso molecular, con disolventes orgánicos o fluidos de CO₂ en condiciones supercríticas, seguidas por la estandarización final de las concentraciones de dichos compuestos a las concentraciones requeridas.
4. Mezcla de compuestos con altos pesos moleculares, según las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizada por su empleo en composiciones neuroprotectoras y antioxidantes.
5. Composición nutricional que se caracteriza por contener la mezcla de compuestos de alto peso molecular, acorde con las reivindicaciones de la 1 a la 4, en dosis entre 5 y 50 mg por unidad posológica, así como excipientes aceptados por la industria alimentaria.

6. Composición nutricional, acorde con la reivindicación 5, en forma de tabletas o cápsulas para uso oral, la cual se caracteriza por contener, además de la mezcla de compuestos de alto peso molecular, excipientes de relleno, adhesivos, desintegrantes, lubricantes y colorantes.
7. Composición nutricional, acorde con la reivindicación 5, en forma de suspensión para uso oral, la cual se caracteriza por contener, además de la mezcla de compuestos de alto peso molecular, suspendentes, preservantes, colorantes, edulcorantes, saborizantes y disolventes.
8. Composición farmacéutica caracterizada por contener la mezcla de compuestos de alto peso molecular acorde con las reivindicaciones de la 1 a la 4, en dosis entre 5 y 50 mg por unidad posológica, así como excipientes aceptados por la industria farmacéutica.
9. Composición farmacéutica, acorde con la reivindicación 8 en forma de tabletas o cápsulas para uso oral, la cual se caracteriza por contener, además de la mezcla de compuestos de alto peso molecular, excipientes de relleno, adhesivos, desintegrantes, lubricantes y colorantes.
10. Composición farmacéutica, acorde con la reivindicación 8, en forma de suspensión para uso oral, la cual se caracteriza por contener, además de la mezcla de compuestos de alto peso molecular, suspendentes, preservantes, colorantes, edulcorantes, saborizantes y disolventes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2022/050005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A23D, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, PATENW

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004076732 A1 (VALIX MARJORIE GAN) 22/04/2004, paragraphs [0010]-[0021], [0023], [0028], [0029]; Table I; examples.	1-5
A	US 2011124894 A1 (ALMAGRO RAFAEL) 26/05/2011, paragraphs [0018], [0024], [0028], [0030]; Figures 2 and 4.	1-5
A	US 2006013842 A1 (MATKIN JOHN R <i>et al.</i>) 19/01/2006, paragraphs [0017], [0018]; examples.	1-5
A	US 6225354 B1 (PEREZ PEDRO P) 01/05/2001, column 1, lines 5-27; column 6, line 29-column 7, line 30.	1-5
A	EP 0488928 A2 (CENT NAC INVESTIG SCIENT) 03/06/1992, examples 1, 2; claims.	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14/10/2022

Date of mailing of the international search report
(18/10/2022)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
N. Vera Gutierrez

Telephone No. 91 3495544

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2022/050005

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002058705 A1 (GONZALES BRAVO LUIS <i>et al.</i>) 16/05/2002, paragraphs [0001], [0016], [0020], Table I; examples 1-5.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU2022/050005

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/899 (2006.01)

A23D9/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P39/06 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU2022/050005

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2004076732 A1	22.04.2004	CU22832 A3 JP2001521562 A HK1026710 A1 EP0975716 A1 EP0975716 A4 CN1252090 A CN1085244C C CA2286121 A1 BR9808103 A WO9845390 A1 AU6713998 A AU719777B B2	29.01.2003 06.11.2001 22.12.2000 02.02.2000 09.10.2002 03.05.2000 22.05.2002 15.10.1998 08.03.2000 15.10.1998 30.10.1998 18.05.2000
----- US2011124894 A1	----- 26.05.2011	----- NONE	-----
----- US2006013842 A1	----- 19.01.2006	----- NONE	-----
----- US6225354 B1	----- 01.05.2001	US2002099099 A1 US2002058713 A1 US2004019119 A1 US7141611 B2 US2003096876 A1 US6596776 B2 WO0078697 A2 WO0078697 A3 NZ516386 A JP2003502396 A ES2252034T T3 DK1189605T T3 DE6002388T T2 CA2375396 A1 AU6404600 A AU782595B B2 AT308980T T EP1189605 A2 EP1189605 A4	25.07.2002 16.05.2002 29.01.2004 28.11.2006 22.05.2003 22.07.2003 28.12.2000 12.07.2001 29.04.2005 21.01.2003 16.05.2006 13.03.2006 20.07.2006 28.12.2000 09.01.2001 11.08.2005 15.11.2005 27.03.2002 07.05.2003
----- EP0488928 A2	----- 03.06.1992	MX9102268 A JPH06192072 A JP2664111B B2 GR3031957T T3 ES2137927T T3 DK0488928T T3 DE488928T T1 DE69131553T T2 CU22225 A1 CA2056657 A1 BR9105185 A AT183648T T	30.10.1992 12.07.1994 15.10.1997 31.03.2000 01.01.2000 20.03.2000 25.11.1993 04.05.2000 31.01.1995 31.05.1992 23.06.1992 15.09.1999
----- US2002058705 A1	----- 16.05.2002	MY120318 A CU22723 A1	31.10.2005 28.02.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU2022/050005

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP2012067119 A	05.04.2012
		AR016054 A1	20.06.2001
		CO4940484 A1	24.07.2000
		ZA982744 B	08.10.1998
		US6486205 B2	26.11.2002
		RU2217130 C2	27.11.2003
		PT969827E E	31.07.2003
		JP2001518092 A	09.10.2001
		JP4907750B B2	04.04.2012
		WO9843631 A1	08.10.1998
		HK1029054 A1	23.03.2001
		ES2192769T T3	16.10.2003
		EP0969827 A1	12.01.2000
		EP0969827 B1	26.02.2003
		DK0969827T T3	16.06.2003
		DE69811643T T2	24.12.2003
		CN1258218 A	28.06.2000
		CN1230158C C	07.12.2005
		CA2285242 A1	08.10.1998
		CA2285242 C	16.12.2008
		BR9808470 A	23.05.2000
		AU7349498 A	22.10.1998
		AU732045B B2	12.04.2001
		AT233087T T	15.03.2003
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/CU2022/050005

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23D, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, PATENW

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2004076732 A1 (VALIX MARJORIE GAN) 22/04/2004; párrafos [0010]-[0021], [0023], [0028], [0029]; Tabla I; ejemplos.	1-5
A	US 2011124894 A1 (ALMAGRO RAFAEL) 26/05/2011; párrafos [0018], [0024], [0028], [0030]; Figuras 2 y 4.	1-5
A	US 2006013842 A1 (MATKIN JOHN R <i>et al.</i>) 19/01/2006; párrafos [0017], [0018]; ejemplos.	1-5
A	US 6225354 B1 (PEREZ PEDRO P) 01/05/2001; columna 1, líneas 5-27; columna 6, línea 29-columna 7, línea 30.	1-5
A	EP 0488928 A2 (CENT NAC INVESTIG SCIENT) 03/06/1992; ejemplos 1, 2; reivindicaciones.	1-5

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/10/2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18 de octubre de 2022 (18/10/2022)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Vera Gutierrez
Nº de teléfono 91 3495544

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/CU2022/050005

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	US 2002058705 A1 (GONZALES BRAVO LUIS <i>et al.</i>) 16/05/2002; párrafos [0001], [0016], [0020], Tabla I; ejemplos 1-5.	1-5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/CU2022/050005

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K36/899 (2006.01)

A23D9/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P39/06 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU2022/050005

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2004076732 A1	22.04.2004	CU22832 A3 JP2001521562 A HK1026710 A1 EP0975716 A1 EP0975716 A4 CN1252090 A CN1085244C C CA2286121 A1 BR9808103 A WO9845390 A1 AU6713998 A AU719777B B2	29.01.2003 06.11.2001 22.12.2000 02.02.2000 09.10.2002 03.05.2000 22.05.2002 15.10.1998 08.03.2000 15.10.1998 30.10.1998 18.05.2000
----- US2011124894 A1	----- 26.05.2011	----- NINGUNO	-----
----- US2006013842 A1	----- 19.01.2006	----- NINGUNO	-----
----- US6225354 B1	----- 01.05.2001	US2002099099 A1 US2002058713 A1 US2004019119 A1 US7141611 B2 US2003096876 A1 US6596776 B2 WO0078697 A2 WO0078697 A3 NZ516386 A JP2003502396 A ES2252034T T3 DK1189605T T3 DE6002388T T2 CA2375396 A1 AU6404600 A AU782595B B2 AT308980T T EP1189605 A2 EP1189605 A4	25.07.2002 16.05.2002 29.01.2004 28.11.2006 22.05.2003 22.07.2003 28.12.2000 12.07.2001 29.04.2005 21.01.2003 16.05.2006 13.03.2006 20.07.2006 28.12.2000 09.01.2001 11.08.2005 15.11.2005 27.03.2002 07.05.2003
----- EP0488928 A2	----- 03.06.1992	MX9102268 A JPH06192072 A JP2664111B B2 GR3031957T T3 ES2137927T T3 DK0488928T T3 DE488928T T1 DE69131553T T2 CU22225 A1 CA2056657 A1 BR9105185 A AT183648T T	30.10.1992 12.07.1994 15.10.1997 31.03.2000 01.01.2000 20.03.2000 25.11.1993 04.05.2000 31.01.1995 31.05.1992 23.06.1992 15.09.1999
----- US2002058705 A1	----- 16.05.2002	MY120318 A CU22723 A1	31.10.2005 28.02.2002

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU2022/050005

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		JP2012067119 A	05.04.2012
		AR016054 A1	20.06.2001
		CO4940484 A1	24.07.2000
		ZA982744 B	08.10.1998
		US6486205 B2	26.11.2002
		RU2217130 C2	27.11.2003
		PT969827E E	31.07.2003
		JP2001518092 A	09.10.2001
		JP4907750B B2	04.04.2012
		WO9843631 A1	08.10.1998
		HK1029054 A1	23.03.2001
		ES2192769T T3	16.10.2003
		EP0969827 A1	12.01.2000
		EP0969827 B1	26.02.2003
		DK0969827T T3	16.06.2003
		DE69811643T T2	24.12.2003
		CN1258218 A	28.06.2000
		CN1230158C C	07.12.2005
		CA2285242 A1	08.10.1998
		CA2285242 C	16.12.2008
		BR9808470 A	23.05.2000
		AU7349498 A	22.10.1998
		AU732045B B2	12.04.2001
		AT233087T T	15.03.2003
-----	-----	-----	-----