



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 627**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99937735 .1**

86 Fecha de presentación : **02.08.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1100507**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2001**

54

Título: **Uso de una combinación que comprende un precursor de ácido úrico y antioxidante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.**

30

Prioridad: **31.07.1998 US 127184**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73

Titular/es: **Meir S. Sacks**
5446 Guarino Road
Pittsburgh, Pennsylvania 15217, US

72

Inventor/es: **Van Dyke, Knox y**
Sacks, Meir S

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 279 627 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de una combinación que comprende un precursor de ácido úrico y antioxidante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Antecedentes de la invención

Área de la invención

La presente invención está dirigida a una composición antioxidante, más especialmente a una mezcla de un precursor del ácido úrico con antioxidantes que es eficaz para tratar enfermedades asociadas con daño oxidativo.

Antecedentes y descripción de las técnicas relacionadas

El daño oxidativo es la causa de numerosas enfermedades. Un estado redox apropiado parece ser una piedra angular para una buena salud. Los antioxidantes de la dieta están muy implicados en los procesos metabólicos del cuerpo humano. Estudios de envejecimiento recientes han mostrado una asociación fuerte entre las señales externas de envejecimiento y el daño oxidativo, lo que sugiere que los antioxidantes tienen funciones antienviejecimiento. El daño oxidativo se ha visto en enfermedades tales como cáncer, artritis reumatoide, inflamación, oclusión arterial, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, y degeneración macular relacionada con la edad. Los radicales libres son causas conocidas del daño oxidativo celular. Los radicales libres, una causa primaria del daño oxidativo, pueden generarse por radiación medioambiental, polución del aire, inflamación y esfuerzo físico y mental excesivo. Los radicales libres se generan a partir de especies que tienen un electrón libre y típicamente se propagan mediante los radicales libres oxígeno singlete e hidroxilo o mediante reacciones enzimáticas específicas. Cuando un radical libre adquiere un electrón de otra molécula, el radical libre se reduce mientras que la otra molécula se oxida y cambia su estructura y funciones. Se conoce bien la actividad biológica de ambas especies de radical libre de oxígeno y de los productos relacionados de peroxidación de los lípidos con ácidos grasos poliinsaturados. Por ejemplo, se ha visto que la generación de especies radicales reactivas está implicada en los efectos citotóxicos de la radiación ionizante, numerosos agentes quimioterapéuticos, y otros procesos biológicos, incluyendo envejecimiento, y las etapas de inicio y promoción de la carcinogénesis experimental. La generación y liberación de los radicales libres reactivos en el fenómeno del estallido respiratorio utilizado por diferentes células del sistema inmune también es un mecanismo muy conocido para la destrucción de dianas extrañas.

Los ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y moléculas lipídicas son susceptibles de oxidación por radicales libres. La oxidación de lípidos puede dañar los sistemas de membrana que incluyen membranas celulares, membranas de orgánulos celulares, y membranas entre éstas. La oxidación de proteínas puede dar lugar a daños en la estructura celular. La oxidación de enzimas puede resultar en cambios en las velocidades metabólicas. El daño en ácidos nucleicos, por ejemplo, daño en el ADN, puede dar lugar a mutaciones celulares y necrosis celular. Estos cambios celulares no deseados son la etiología de numerosas enfermedades graves tales como cáncer, ataque cardíaco, cataratas, enfermedades neurodegenerativas, degeneración macular, y enfermedades inflamatorias.

En los aerobios, se han desarrollado diferentes mecanismos secuestrantes de radicales tanto a nivel celular como de organismo que confieren protección frente a especies de oxígeno reactivas potencialmente letales, tales como el radical hidroxilo, anión superóxido, y peróxido de hidrógeno.

Es importante mencionar que los radicales de oxígeno pueden iniciar reacciones en cadena duraderas de peroxidación lipídica que pueden propagarse de una célula a otra. Como se ha discutido anteriormente, estos productos de peroxidación son capaces de dañar el ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos celulares. Los radicales libres pueden experimentar diferentes reacciones una vez generados: pueden reaccionar con otro radical no libre creando un radical libre nuevo; pueden reaccionar con el mismo radical libre creando un radical no libre nuevo; pueden reaccionar con un radical libre diferente para formar un no radical nuevo; un radical libre puede reaccionar con lípidos insaturados para formar un peróxido lipídico; y un radical libre puede reaccionar con otro radical libre para producir la destrucción. El resultado de estas reacciones diferentes puede dar lugar a la producción de moléculas más o menos tóxicas. Los mecanismos de protección celular frente a esta clase de daño incluyen antioxidantes y secuestrantes de radicales tanto en la fase lipídica (por ejemplo, α -tocoferol, β -caroteno) como acuosa (por ejemplo, glutatión y ácido ascórbico) de las células, así como enzimas tales como la superóxido dismutasa y catalasa. También se ha visto que el nivel alto de ácido úrico plasmático en los seres humanos es un factor protector frente a los radicales libres. Se ha postulado que la inhibición de los radicales libres es la manera en la que operan determinados radioprotectores, tales como los secuestrantes de radicales libres cisteína, glutatión, y compuestos sulfidrilos celulares relacionados. El glutatión se oxida para contener un grupo ditio así como disulfuros mixtos unidos a proteínas, cuando las células se exponen a compuestos que generan oxígeno o a otras situaciones de estrés oxidativo.

La vitamina E es el antioxidante más estudiado. Estudios recientes confirman que el suplemento con vitamina E reduce el riesgo de enfermedad cardíaca. Muchos estudios epidemiológicos muestran la asociación negativa entre casos de cáncer y el consumo de antioxidantes a partir de frutas y verduras.

La quercetina y el galato de epigallocatequina son antioxidantes extraídos de las plantas. La quercetina es un flavonoide antioxidante que se encuentra en diferentes frutas y verduras incluyendo cebolla, puerro, espárrago, repollo,

mostaza, ornamentales, pimiento, endivia, pomelo, lechuga, manzana, mango, ciruela, rábano, grosella negra, patata, espinaca, uva y té verde. El galato de epigallocatequina (EGCg) es un antioxidante extraído del té verde. Estos antioxidantes tienen un fuerte efecto quimiopreventivo.

La Patente de EEUU 4.758.553 describe suplementos nutricionales para administrarse a pacientes en situaciones en las que es difícil o imposible para el paciente tomar una dieta o nutrientes por vía oral. Los suplementos nutricionales propuestos comprenden componentes de los ácidos nucleicos, tales como inosina-monofosfato, guanosina-monofosfato, citidina-monofosfato, uridina-monofosfato, timidina, inosina, citidina, uridina, hipoxantina y vitaminas tales como vitamina A, B, B₂, B₆, ácido nicotínico, ácido pantoténico, vitamina C, D, E, biotina, ácidos fólicos, etc.

EP-A-0113162 describe una composición terapéutica útil para el tratamiento del cáncer, que comprende un ARNds en combinación con vitamina A o vitamina C.

WO 00/00212 describe una composición para utilizarse en el tratamiento de condiciones que afectan al sistema pulmonar, que comprende un inhibidor de NO y xantinas.

EP-A-0416248 describe la utilización del broncodilatador xantina para utilizarse junto a la vitamina B₆ en el tratamiento de enfermedades pulmonares obstructivas.

La Patente de EEUU 5.328.914 describe la utilización de composiciones que contienen bases de xantina y antioxidantes para tratar la pérdida de pelo mediante aplicación tópica.

WO 98/00101 describe composiciones cosméticas que contienen xantinas y derivados de xantina y un agente antioxidante, para mejorar el tono cutáneo.

Existe una necesidad de composiciones de antioxidantes o mezclas de éstos que administrados simultáneamente, de manera concomitante, o sucesivamente protejan, prevengan, traten, o mejoren enfermedades asociadas con daño oxidativo.

En la presente memoria se describen composiciones y mezclas que tienen efectos oxidativos frente al daño por radicales libres. La composición es útil en la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con daño oxidativo.

Compendio de la invención

Según la presente invención, se proporciona la utilización de una composición que comprende un precursor del ácido úrico seleccionado de hipoxantina, xantina, inosina, adenosina, guanosina, AMP, GMP, IMP, adenina, guanina o combinaciones de éstos, en la fabricación de un medicamento para administrarse con uno o más de los antioxidantes siguientes:

- (a) vitamina C o vitamina E,
- (b) un inhibidor de la formación de homocisteína seleccionado de vitamina B₆ o ácido fólico,
- (c) quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, o galato de catequina, o
- (d) un extracto de té verde,

para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de enfermedades neurodegenerativas.

Según este aspecto de la presente invención, también se proporciona la utilización de uno o más antioxidantes seleccionados de:

- (a) vitamina C o vitamina E,
- (b) un inhibidor de la formación de homocisteína seleccionado de vitamina B₆ o ácido fólico,
- (c) quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, o galato de catequina, o un extracto de té verde,

para la fabricación de un medicamento para administrarse con un precursor del ácido úrico seleccionado de hipoxantina, xantina, inosina, adenosina, guanosina, AMP, GMP, IMP, adenina, guanina o combinaciones de éstos,

para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de enfermedades neurodegenerativas.

En la presente memoria se describe una composición que comprende una concentración eficaz desde un punto de vista terapéutico de un precursor del ácido úrico, seleccionado del grupo que consiste en ADN, ARN, nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN, nucleósidos de ADN, bases libres de ADN, bases libres de ARN, hipoxantina, y xantina.

El precursor del ácido úrico es preferiblemente hipoxantina, y la concentración de hipoxantina está preferiblemente en el intervalo de 100 mg/día a 25 g/día, más preferiblemente 1 g/día a 20 g/día, aún más preferiblemente un intervalo de 2 g/día a 10 g/día. Las composiciones también pueden incluir una concentración eficaz desde un punto de vista terapéutico de un agente activo desde un punto de vista biológico seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante primario, un antioxidante secundario, un inhibidor de la formación de homocisteína, un inhibidor de la NO sintetasa, extracto de té verde y/o una combinación de uno cualquiera o más de los anteriores.

También se describe una composición que comprende un precursor del ácido úrico y un agente activo desde un punto de vista biológico. El precursor del ácido úrico se selecciona del grupo siendo preferiblemente el precursor del ácido úrico hipoxantina. Preferiblemente, el antioxidante secundario es Vitamina C, Vitamina E o una combinación de ambas. El inhibidor de la NO sintetasa es preferiblemente prednisona, mientras que el inhibidor de la formación de homocisteína es preferiblemente Vitamina B₆ o ácido fólico.

También se describe la utilización de una composición terapéutica en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades asociadas con daño oxidativo que comprende un precursor del ácido úrico, que también puede incluir un antioxidante, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en ADN, ARN, nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN, nucleósidos de ADN, bases libres de ADN, bases libres de ARN, hipoxantina, y xantina, siendo más preferiblemente hipoxantina. El agente antioxidante activo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un antioxidante primario, un antioxidante secundario, un inhibidor de la formación de homocisteína, un inhibidor de la NO sintetasa, y una combinación de dos o más de dicho antioxidante primario, antioxidante secundario, inhibidor de homocisteínas, e inhibidor de la NO sintetasa como se ha descrito más arriba. El antioxidante secundario se selecciona preferiblemente de Vitamina C o Vitamina E y el inhibidor de la NO sintetasa es prednisona y dicho inhibidor de la formación de homocisteína es Vitamina B₆, y dicho inhibidor de la formación de homocisteína es ácido fólico. Se describe dicha utilización dirigida a tratar una enfermedad que comprende administrar una concentración terapéutica de un precursor del ácido úrico solo o con un agente activo desde un punto de vista biológico conocido como se ha descrito más arriba, en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer y enfermedad neurodegenerativa.

Además se describe una composición que comprende un precursor del ácido úrico solo o con un agente activo desde un punto de vista biológico, siendo dicho agente activo desde un punto de vista biológico diferente de dicho precursor del ácido úrico. El precursor del ácido úrico se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN, nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN, nucleósidos de ADN, bases libres de ADN, bases libres de ARN, hipoxantina, y xantina. El precursor del ácido úrico es preferiblemente hipoxantina, y el agente activo desde un punto de vista biológico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un antioxidante primario, un antioxidante secundario, un inhibidor de la formación de homocisteína, un inhibidor de la NO sintetasa, y una combinación de dos o más de dicho antioxidante primario, antioxidante secundario, inhibidor de homocisteínas, e inhibidor de la NO sintetasa. Preferiblemente, el antioxidante secundario es Vitamina C o Vitamina E o una combinación de ambas.

El inhibidor de la NO sintetasa es preferiblemente prednisona, mientras que el inhibidor de la formación de homocisteína es preferiblemente Vitamina B₆ o ácido fólico. El agente activo desde un punto de vista biológico puede incluir un antioxidante secundario y el inhibidor de la formación de homocisteína, y el inhibidor de la NO sintetasa. El precursor del ácido úrico y dicho agente activo desde un punto de vista biológico pueden administrarse simultáneamente, y el ácido úrico y el agente activo desde un punto de vista biológico pueden administrarse sucesivamente. La vía de administración puede seleccionarse del grupo que consiste en oral, sublingual, transdérmica, intravenosa y/o tópica.

Actualmente, tanto en investigación como en clínica se utiliza la quimioterapia combinada utilizando dos o más medicamentos anticancerígenos para tratar tumores malignos en los seres humanos. Los medicamentos anticancerígenos pueden ser antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, venenos generales, etc. Las combinaciones de medicamentos se administran con el fin de obtener un efecto citotóxico sinérgico en la mayoría de los cánceres, por ejemplo, carcinomas, melanomas, linfomas y sarcomas, y para reducir o eliminar la aparición de células resistentes a los medicamentos y para reducir los efectos secundarios de cada medicamento.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el índice terapéutico de las composiciones de antioxidantes puede incrementarse en sistemas *in vitro* e *in vivo* tratando el anfitrión de manera concomitante o independiente con un precursor del ácido úrico. Más específicamente, se describe una utilización de la composición reivindicada dirigida al tratamiento terapéutico o profiláctico de daño en anfitriones mamíferos producido por la producción de radicales libres que comprende administrar al anfitrión cantidades eficaces desde un punto de vista farmacológico de al menos un precursor del ácido úrico (es decir, hipoxantina) y al menos un antioxidante seleccionado de un compuesto activo desde un punto de vista biológico, un secuestrante de radicales libres, o un inhibidor metabólico. El agente activo desde un punto de vista biológico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un antioxidante primario, un antioxidante secundario, un inhibidor de la homocisteína, un inhibidor de la NO sintetasa, y una combinación de uno o más de los anteriores. Los ejemplos de otros secuestrantes de radicales libres o antioxidantes incluyen butionina sulfoximina, vitamina C, indometacina, ibuprofeno, N-acetil cisteína o aspirina. En otro aspecto, se describe una composición adecuada para administrarse a anfitriones mamíferos que comprende una mezcla, en cantidades eficaces desde un punto de vista farmacológico, de un precursor del ácido úrico y un segundo compuesto activo desde un punto de vista biológico, preferiblemente un antioxidante.

Cuando los radicales producen peróxidos tóxicos, por ejemplo, peroxinitrito, estas sustancias son miles de veces más tóxicas que los precursores a partir de los que se originaron. Estos compuestos pueden reaccionar durante un tiempo más prolongado ya que sus vidas medias pueden ser hasta millones de veces más largas que las de los radicales libres precursores. Es la reacción de estas sustancias tóxicas nuevas la que necesita ser contrarrestada mediante los antioxidantes. El ADN, ARN, proteínas, lípidos y carbohidratos son las dianas de estos peróxidos tóxicos. Habitualmente, los antioxidantes son fenoles, di-, tri- o poli-fenoles, compuestos sulfidrilos, por ejemplo, glutatión o n-acetilcisteína o ácido úrico. El ácido úrico es un antioxidante exclusivo de los seres humanos, simios y algunos perros. Dál-mata debido al hecho de que se acumula en la sangre al no estar presente la enzima que degrada el ácido úrico (uricasa). El ácido úrico es un pilar de la antioxidación en la sangre así como en las células. La gente que posee niveles bajos de ácido úrico está en una situación de riesgo en el caso de la aparición de enfermedades en las que se producen grandes cantidades de peróxidos tóxicos. Sin embargo, la toxicidad del exceso de peróxidos puede contrarrestarse mediante el incremento de los precursores del ácido úrico y de otros antioxidantes secundarios. Además, puede producirse un sinergismo en la antioxidación al ser el total de la antioxidación mayor que la suma de las partes que la componen.

15 Descripción breve de los dibujos

Las características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor en relación con la descripción siguiente, reivindicaciones adjuntas, y dibujos adjuntos, en los que:

20 La Figura 1 ilustra la degradación metabólica de purinas como bases libres a ácidos úricos.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra la reacción oxidativa de peroxinitrito y luminol y la inhibición de ésta con ácido úrico.

25 La Figura 3 es un espectro de masas del ácido úrico con la identificación en el espectro de fragmentos de diferente peso molecular.

La Figura 3A es un mapa de fragmentos del ácido úrico que corresponde al espectro de masas de la Figura 3.

30 La Figura 4 es el espectro de masas de la alantoína, el fragmento oxidado del ácido úrico cuando el ácido úrico se trata con peroxinitrito.

La Figura 5 ilustra los polifenoles principales aislados a partir de extracto de té verde.

35 La Figura 6 es un gráfico que ilustra la quimioluminiscencia de varios congéneres de sidnonimina.

La Figura 7 ilustra la quimioluminiscencia dependiente de luminol de múltiples inyecciones de peroxinitrito.

La Figura 8 ilustra el efecto inhibitorio del extracto de té verde sobre SIN-1.

40 La Figura 9 ilustra el efecto inhibitorio del extracto de té verde sobre peroxinitrito.

La Figura 10 ilustra el efecto inhibitorio de (-) epicatequina sobre SIN-1.

45 La Figura 11 ilustra el efecto inhibitorio de epicatequina sobre peroxinitrito.

La Figura 12 ilustra el efecto inhibitorio de (±) catequina sobre SIN-1.

La Figura 13 ilustra el efecto inhibitorio de (±) catequina sobre peroxinitrito.

50 La Figura 14 ilustra el efecto inhibitorio de (-) epigallocatequina sobre SIN-1.

La Figura 15 ilustra el efecto inhibitorio de (-) epigallocatequina sobre peroxinitrito.

55 La Figura 16 ilustra el efecto inhibitorio de galato de (-) epicatequina sobre SIN-1.

La Figura 17 ilustra el efecto inhibitorio de galato de (-) epicatequina sobre peroxinitrito.

Descripción detallada de la presente invención

60 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “aceptable desde un punto de vista farmacéutico” se refiere a un medio vehicular que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para los anfitriones a los que se administra.

65 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” significa más o menos el 10% del número al que se hace referencia. Por ejemplo, aproximadamente 10 gramos significa en el intervalo de 9 a 11 gramos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término tratamiento “profiláctico o terapéutico” se refiere a la administración al anfitrión del antioxidante o antioxidantes y/o agente(s) activo(s) desde un punto de vista biológico bien antes o después de la aparición del daño biológico en el anfitrión. Si el antioxidante o antioxidantes o el agente o agentes activo(s) desde un punto de vista biológico se administran antes de la exposición al agente que produce el daño biológico, el tratamiento es profiláctico (es decir, protege al anfitrión frente al daño), mientras que si se administran después de la exposición al agente que produce el daño, el tratamiento es terapéutico (es decir, palia el daño existente).

El esquema y dosificación dependerán, por ejemplo, del tipo de anfitrión, enfermedad, y antioxidante(s). Si el daño biológico se produce por una infección, las dosis se administran preferiblemente a partir de las 18 horas antes de la infección para el tratamiento profiláctico y en la fase temprana de la infección para el tratamiento terapéutico, hasta 18 horas después de la infección en la fase tardía de la infección para el tratamiento terapéutico. Si el daño biológico es cáncer, el tratamiento no se considera terapéutico si después del tratamiento aparece un tumor o si una carga tumoral existente no se elimina o disminuye. El efecto de las dosis puede disminuir con el tiempo, aunque en el caso de los seres humanos la dosis puede repetirse durante meses o incluso años. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “daño biológico en el anfitrión producido por la generación de radicales libres” se refiere a cualquier daño celular, tisular u otro daño en partes del cuerpo o funciones sufrido por el anfitrión como resultado de la producción de radicales libres en el cuerpo del anfitrión. Los ejemplos mediante los que puede producirse dicho daño incluyen hipotermia, que puede producirse durante el tratamiento de cáncer como cuando la temperatura del tumor se incrementa mediante la irradiación local o general con microondas, daño producido por agentes quimioterapéuticos (quimioterapia), terapia con radiación, o tensión alta de oxígeno que produce radicales para matar células, e infección. Además, las células tumorales tratadas pueden ayudar a la propagación del daño por radicales.

Un ejemplo de tensión alta de oxígeno es la condición que se produce cuando los bebés prematuros se exponen a una presión alta de oxígeno, que resulta en enfermedad retinal y pulmonar. Pueden preverse otras condiciones que representan daño producido por la generación de radicales libres y también se encuentran dentro de esta definición.

El término “cáncer” tal y como se utiliza en la definición anterior se refiere a cualquier trastorno neoplásico, incluyendo trastornos celulares tales como, por ejemplo, cáncer de células renales, sarcoma de Kaposi, leucemia crónica, cáncer de mama, sarcoma, carcinoma de ovario, cáncer rectal, cáncer de garganta, melanoma, cáncer de colon, cáncer de vejiga, mastocitoma, cáncer de pulmón y cáncer gastrointestinal o de estómago. Preferiblemente, el cáncer es cáncer de colon, melanoma, cáncer de células renales, sarcoma, cáncer de pulmón, adenocarcinoma, o cáncer de mama.

El término “infección” tal y como se utiliza en la definición anterior se refiere a cualquier clase de enfermedad patógena, incluyendo las producidas por bacterias, hongos, virus, protozoos o parásitos. Los ejemplos de infecciones bacterianas incluyen *P. aeruginosa*, *E. coli*, tétanos, especies de *Mycobacterium*, cepas de *Streptococcus*, difteria y *Salmonella*. Los ejemplos de infecciones fúngicas incluyen criptococosis, histoplasmosis, y otras infecciones debidas a especies de *Candida*. Los ejemplos de infecciones virales incluyen Hepatitis A, Herpes Simplex recurrente, SIDA, Herpes Zoster, influenza, y rinovirus. Preferiblemente, la infección es bacteriana, más preferiblemente infección por bacterias Gram-negativas, y más preferiblemente infección por *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término antioxidante, a no ser que se especifique otra cosa se refiere a: un secuestrante de radicales libres o un inhibidor metabólico. El término “secuestrante de radicales libres” se refiere a cualquier compuesto o sustancia que protege a un anfitrión mamífero frente al daño biológico producido por la generación de radicales libres. Esta definición incluye a aquellos agentes que actúan a través del secuestro directo de radicales así como a aquellos que actúan alterando la capacidad secuestrante de radicales del anfitrión y/o tumor. Dichos secuestrantes de radicales libres pueden ser protectores frente a la radiación, e incluyen compuestos tales como, por ejemplo, hipoxantina, butionina sulfoximina, maleato de dietilo, vitamina E, vitamina C, cisteína como N-acetil cisteína, o glutathione, metronidazol, y un retinoide, tal como, por ejemplo, vitamina A. Puede utilizarse cualquier combinación de estos modificadores. Más preferiblemente, el secuestrante de radicales libres utilizado en la presente memoria en el caso de los seres humanos es el modificador butionina sulfoximina, vitamina C, vitamina E, o N-acetil cisteína.

“Inhibidor metabólico”, se refiere a un compuesto o sustancia que bloquea o inhibe las rutas metabólicas de la ciclooxigenasa y/o lipooxigenasa, de la cascada del ácido araquidónico, en la que los fosfolípidos se convierten en ácido araquidónico mediante la fosfolipasa A2 o C, y el ácido araquidónico puede continuar por cualquiera de las rutas metabólicas. Dicho bloqueo o inhibición puede ser de una enzima que cataliza una o ambas rutas, de un tipo celular que contiene la enzima, o de uno o más de los productos naturales de las rutas. Los ejemplos de inhibidores metabólicos incluyen aspirina, indometacina, ibuprofeno, ácido nordihidroguayarático (4,4’-[2,3-dimetil-1,4-butanediil]-bis [1,2-bencenodiol]) (NDGA), ácido cis-8,11,14-eicosatrien-5-inóico (ETYA), y prostaglandinas y/o leucotrienos sintéticos (en contraposición a naturales) que bloquean los efectos de los productos metabólicos naturales a nivel de la producción en lugar de a nivel de la enzima. La aspirina, indometacina, ibuprofeno, y ETYA bloquean la ruta de la ciclooxigenasa, inhibiendo de esta manera la producción de prostaglandinas, tromboxanos y protacilinas naturales. A concentraciones más altas, la indometacina también bloquea la fosfolipasa.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “cantidades eficaces desde un punto de vista farmacológico” aplicado a hipoxantina, antioxidantes o modificadores biológicos, se refiere a la cantidad de cada componente en la mezcla o administrada al anfitrión que resulta en un incremento del índice terapéutico del anfitrión.

El “índice terapéutico” puede definirse para los propósitos de la presente memoria en términos de eficacia (magnitud de la reducción del tumor o infección u otra cura) y en términos de toxicidad para el anfitrión. En el caso de anfitriones no humanos, el índice terapéutico se incrementa si la eficacia se incrementa al menos un 50% por encima de la eficacia utilizando un control de excipiente (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato) y la proporción de peso corporal medio al final del periodo de evaluación para la respuesta de eficacia respecto al peso corporal medio al inicio del tratamiento es al menos 0,90 (es decir, inferior a una pérdida del 10% de peso corporal). La proporción de pesos corporales medios indica la magnitud de la toxicidad, indicando un valor de 1 ausencia de toxicidad. En el caso de anfitriones no humanos que se están tratando de cáncer, la magnitud de la eficacia conseguida puede determinarse mediante la proporción del volumen tumoral medio al final del periodo de evaluación para la respuesta de eficacia respecto al volumen tumoral medio al inicio del tratamiento. Una reducción en la proporción de al menos un 50% de tratado respecto al control de excipiente indica una eficacia incrementada. Las dosis, esquemas, y tipos de modificadores biológicos más preferidos son aquellos que consiguen una proporción de volumen tumoral medio de entre 0 y 5, siendo un valor de 0 óptimo y que indica una cura. En el caso de anfitriones humanos, el índice terapéutico se incrementa si la eficacia se incrementa al menos un 50% después del tratamiento con los modificadores linfoquina/citotoxina y biológicos y si la toxicidad es aceptable, es decir, no más allá de fiebre, escalofríos, y/o malestar general. En el caso de anfitriones humanos que se están tratando de cáncer, la magnitud de la eficacia se establece generalmente en la clínica determinando los diámetros perpendiculares de los productos de cualquier enfermedad determinada.

Se produce una respuesta parcial cuando el tumor disminuye su tamaño al menos un 50% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de cualquier enfermedad determinada.

La presente invención implica administrar a un anfitrión mamífero, preferiblemente un anfitrión humano, cantidades eficaces desde un punto de vista farmacológico de uno o más precursores del ácido úrico y uno o más antioxidantes o agentes activos desde un punto de vista biológico. Los precursores del ácido úrico (es decir, hipoxantina), antioxidantes y agentes activos desde un punto de vista biológico pueden combinarse *in vitro* antes de la administración o administrarse por separado al anfitrión, en cualquier orden o simultáneamente, teniendo lugar generalmente cualquier administración del precursor del ácido úrico hasta 24 horas después de la administración de los demás antioxidantes o agente(s) activo(s) desde un punto de vista biológico.

La administración o administraciones pueden llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo administración oral, subcutánea y parenteral, preferiblemente parenteral u oral. Los ejemplos de administración parenteral incluyen intravenosa, intraarterial, intramuscular, e intraperitoneal, prefiriéndose intraperitoneal e intravenosa. La dosis y el régimen de dosificación dependerán principalmente de si el o los precursores, antioxidante(s), y agente(s) activo(s) desde un punto de vista biológico se administran con fines terapéuticos o profilácticos, de manera independiente o como una mezcla, del tipo de daño biológico y anfitrión, de la historia del anfitrión, del tipo de antioxidante o agentes activos desde un punto de vista biológico o citotoxina, y del tipo de modificador biológico utilizado. La cantidad debe ser eficaz para conseguir un índice terapéutico incrementado como se ha definido más arriba. Es de destacar que los seres humanos se tratan durante un periodo de tiempo más largo que los ratones y ratas con una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la eficacia del medicamento. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples durante un periodo de varios días, aunque se prefieren las dosis únicas. Para los propósitos de la presente memoria, un nivel de protección de al menos el 50% significa que al menos el 50% de los anfitriones tratados presentan una mejoría de la enfermedad o infección, incluyendo pero sin limitarse a, proporción de supervivencia mejorada, recuperación más rápida, o mejora o eliminación de los síntomas. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples. Si se utilizan dosis múltiples, como se prefiera, la frecuencia de la administración dependerá, por ejemplo, del tipo de anfitrión y tipo de cáncer, cantidades de dosificación, etc. Para algunos tipos de cánceres o líneas de cáncer, puede ser eficaz la administración diaria, mientras que para otros, puede ser eficaz la administración un día sí y otro no o cada tercer día, y no ser eficaz la administración diaria. El médico será capaz de establecer después de experimentación rutinaria qué vía de administración y frecuencia de administración son más eficaces en cualquier caso particular. Las cantidades de dosificación para el cáncer que parecen las más eficaces en la presente memoria son aquellas que resultan en la regresión del tamaño del tumor o en la desaparición completa o ausencia de reaparición del tumor, y que no son tóxicas o son aceptablemente tóxicas para el paciente anfitrión. Generalmente, las condiciones tales como fiebre, escalofríos y malestar general son consideradas aceptables. Los niveles de dosis óptimos dependerán de muchos factores, por ejemplo, del tipo de anfitrión, cáncer, vía, esquema y secuencia de la administración, carga tumoral existente, tipo de precursor y modificador antioxidante, y de la definición de toxicidad. La toxicidad puede definirse mediante la magnitud y tipo de efectos secundarios en anfitriones humanos, considerándose la fiebre, escalofríos y malestar general como toxicidad aceptable para el estudio de la presente memoria, o mediante la cantidad de pérdida de peso corporal o mediante la muerte en anfitriones no humanos después de un determinado periodo de tiempo, como se ha definido más arriba para el índice terapéutico.

Recientemente, el peroxinitrito (OONO-) se ha asociado claramente con diferentes enfermedades degenerativas incluyendo Alzheimer (1), esclerosis múltiple (2), Parkinson, sepsis, toxicidad renal, meningitis, infarto, y diferentes enfermedades asociadas con inflamación, por ejemplo, diabetes y artritis (3). Este oxidante fuerte, que produce la hidroxilación y/o nitración de muchas dianas orgánicas, especialmente fenoles y compuestos que contienen sulfidril, es producido por los macrófagos en diferentes localizaciones tisulares incluyendo el cerebro y la piel. Se forma a partir de los radicales libres superóxido (O-O-) y óxido nítrico (NO) cada uno de los cuales tiene un electrón desapareado. Los electrones sin aparear crean una afinidad fuerte que les induce a unirse y formar peroxinitrito. El peroxinitrito es una sustancia única porque es un oxidante muy potente que puede dañar todos los tipos principales de entidades

bioquímicas, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Es 1.000 veces más activo como oxidante que el peróxido de hidrógeno tomando como base de la comparación el peso molecular. Su vida media en líquidos fisiológicos es aproximadamente un segundo.

5 El óxido nítrico endógeno puede formarse, por ejemplo, a partir de la degradación oxidativa de l-arginina o en presencia de peróxido de hidrógeno u otros oxidantes o enzimáticamente a partir de la NO sintetasa. Se conocen tres tipos de NO sintetasa de los que el tipo dos es inducible, por ejemplo, la estimulación de los macrófagos con interferón gamma, virus, bacterias o partículas extrañas incrementan la formación de la enzima. La óxido nítrico sintetasa reacciona con l-arginina y forma citrulina y óxido nítrico. Esto permite al macrófago jugar un papel fundamental en
10 los mecanismos inmunes mediante la producción de grandes cantidades de NO que dan lugar a la creación de peroxinitrito y finalmente a la inactivación del invasor. Sin embargo, si este mecanismo se activa de manera inapropiada, el peroxinitrito ataca cualquier entidad bioquímica con la que contacta - incluyendo ADN, ARN, proteínas y lípidos - produciendo de esta manera un daño patológico. Por lo tanto, el control de la producción de NO es crítico.

15 Se ha publicado que una dosis farmacológica de esteroides antiinflamatorios puede bloquear la inducción de la óxido nítrico sintetasa. Sin embargo, este tratamiento no está dirigido al peroxinitrito formado previamente en grandes cantidades. En este caso, el peroxinitrito debe ser secuestrado. Por lo tanto, un inhibidor o su precursor debe estar disponible tanto dentro como fuera de las células en cantidades suficientes y poseer una reactividad fuerte frente a OONO- con el fin de inhibir la toxicidad del peroxinitrito actuando como un antioxidante frente al peroxinitrito destruyéndolo de esta manera como oxidante y metabolizando el antioxidante. El ácido úrico, mostrado en la Figura 1, está presente en la sangre y tejidos en cantidades lo suficientemente altas y representa una estructura química que es muy vulnerable al ataque de oxidantes fuertes como el peroxinitrito.

25 El producto final del metabolismo de las purinas en los seres humanos es el ácido úrico. Esta sustancia es un antioxidante excelente que puede interaccionar directamente con el peroxinitrito cercano. La Figura 2 es un gráfico que muestra la interacción del peroxinitrito y el ácido úrico y la inhibición de la quimioluminiscencia producida por el peroxinitrito. La Figura 2 ilustra la reacción oxidativa del peroxinitrito y el luminol para producir luz (quimioluminiscencia) y la interferencia con la luz que produce el ácido úrico a una concentración de 10 μ M. La concentración de peroxinitrito es también 10 μ M y una inhibición de la reacción oxidativa de hasta aproximadamente el 99% demuestra la potencia antioxidante del ácido úrico. Durante esta reacción química directa, el ácido úrico se convierte en alantoína - una reacción que no se produce en los seres humanos mediante catálisis enzimática debido a que la enzima clave, uricasa, no está presente. La reacción del ácido úrico con OONO-, el peroxinitrito, produce un cambio químico en el ácido úrico que se convierte en alantoína (5-ureidohidantoína) como muestran los datos de espectroscopía de masas de la Figura 4. La alantoína es el producto final del metabolismo de las purinas en animales excepto en los seres humanos, simios grandes y algunos perros dálmatas. Los seres humanos, simios y dálmatas carecen de la enzima uricasa por lo que la presencia de alantoína en éstos indica que un oxidante fuerte ha atacado al ácido úrico. Dicho oxidante se produce muy posiblemente a partir de peroxinitrito o posiblemente hipoclorito.

35 Recientemente, se ha tratado una enfermedad muy similar a la esclerosis múltiple, denominada encefalomiелitis alérgica (EAE), con ácido úrico. El ácido úrico es un secuestrante natural del peroxinitrito y es crucial para prevenir el daño producido en EAE. Los científicos trataron los ratones con 500 mg/kg de ácido úrico cuatro veces al día y se produjo una supervivencia duradera independientemente de que el tratamiento se iniciara antes o después de la aparición de los síntomas clínicos de EAE. Además, la evaluación de los informes de 20 millones de pacientes respecto a la incidencia de esclerosis múltiple y niveles altos de ácido úrico en la sangre revelaron que las dos enfermedades
45 son casi mutuamente exclusivas. Esto plantea la posibilidad clara de que la hiperuricemia puede proteger frente a la esclerosis múltiple. La degradación del ácido úrico se ha implicado en la enfermedad pulmonar crónica de la infancia y en la enfermedad de Wilson, una enfermedad hereditaria del metabolismo del cobre. Se ha visto que los niveles de ácido úrico están disminuidos en la diabetes mellitus dependiente de insulina. El ácido úrico parece ser tan importante como antioxidante en el cuerpo de los seres humanos que representa casi la capacidad antioxidante total del suero humano de la sangre, según los datos recientes de Ryan, Grayson y Clarke en Ann. Clin Biochem. 34, 688-689, 1997.

50 El ácido úrico también juega un papel importante en los tejidos, aunque probablemente no es un oxidante tan dominante en los tejidos debido a la presencia de glutatión. Se pensaba que el mantenimiento del nivel de ácido úrico en el cuerpo está principalmente bajo control genético y que no podría modificarse de manera sustancial por la dieta, muerte tisular o renovación. Nuestros estudios indican que aunque el ácido úrico puede estar bajo control genético, la dieta puede influir en el nivel de ácido úrico en la sangre.

55 Sin embargo, el ácido úrico tiene algunas desventajas obvias como "medicamento". Es muy insoluble en agua y, por lo tanto, se espera que presente poca biodisponibilidad. Uno de los factores principales frente a su utilización como medicamento es que los niveles elevados en la sangre pueden precipitar un ataque de artritis gotosa. Además, unos niveles altos también pueden producir toxicidad renal y posiblemente fallo renal.

60 De acuerdo con esto, se sugiere en la presente memoria que el mejor método para elevar el nivel de ácido úrico con el fin de proteger a los seres humanos frente al daño oxidativo es ingerir precursores cercanos del ácido úrico que son relativamente solubles que producirán la menor toxicidad posible. Sin embargo, algunos precursores presentan riesgos significativos. Cuando se administra en grandes cantidades (95 mg/kg), la adenina puede oxidarse a 2,8 dihidroxiadenina que puede cristalizar para formar piedras renales.

El ADN o ARN en la dieta es otra posibilidad con dosis de 2 a 4 gramos de extracto por día. Este régimen puede elevar los niveles de ácido úrico desde normal (4,9 mg en 100 ml de sangre) hasta hiperuricémico (7,5 mg en 100 ml de sangre) y producir de esta manera gota. Además, tanto el ARN como el ADN contienen ribosa y desoxirribosa y fosfatos que no son necesarios para proporcionar purinas, lo que resulta en la necesidad de administrar una cantidad mayor del precursor nutricional. Los nucleótidos AMP, GMP, e IMP se compararon con los nucleósidos (bases no fosforiladas con ribosa unida) adenosina, guanosina e inosina. Fueron equivalentes en términos de su capacidad para incrementar los niveles de ácido úrico. Los nucleótidos AMP y GMP son más eficaces que el ADN y ARN para incrementar los niveles de ácido úrico en la sangre. Esto sugiere que el factor limitante para la absorción a partir de la dieta es la velocidad de hidrólisis (degradación) de los ácidos nucleicos. Se comparó el efecto uricosúrico de la adenina, guanina, hipoxantina, xantina, AMP, y GMP en seres humanos normales, hiperuricémicos y gotosos. AMP, GMP, hipoxantina y adenina elevaron los niveles de ácido úrico en la sangre mientras que guanina y xantina fueron ineficaces en los tres grupos.

Entre AMP, GMP e hipoxantina, en conjunto, la hipoxantina (véase la Fig. 1) parece ser el precursor más eficaz del ácido úrico.

La administración oral de hipoxantina se muestra como el método más eficaz para elevar el nivel de ácido úrico en la sangre. También son posibles otras vías de administración con la posible excepción de la inhalación. Cualquier forma de inyección de estas sustancias será eficaz como lo será un supositorio a través del recto. Además, puede ser eficaz una vía intranasal o una diálisis de intercambio.

En la realización preferida, el nivel inicial de ácido úrico en la sangre y orina se determinará antes del tratamiento con los precursores del ácido úrico. Después, se administrará la hipoxantina u otro precursor del ácido úrico mencionado anteriormente diariamente por la boca u otras vías y a dosis que probablemente estarán en el intervalo de 2 a 10 gramos por día. Posteriormente, se evaluará el nivel de ácido úrico en la sangre para verificar que permanece igual o menor de 7 mg/100 ml. Esto evita niveles excesivos hiperúricos con el fin de evitar la gota. Debido a las diferencias biológicas entre individuos, deben titularse los pacientes individualmente. En algunos, pueden requerirse dosis diarias por encima o por debajo de 2 a 10 gramos con el fin de conseguir el nivel terapéutico de ácido úrico. En algunas situaciones clínicas, niveles excesivos de peroxinitrito pueden consumir el ácido úrico adicional por lo que se necesitará una dosificación incrementada.

Además del ácido úrico, diferentes antioxidantes son importantes desde un punto de vista biológico como complementos terapéuticos que ayudan al ácido úrico en la protección del cuerpo frente a los oxidantes fuertes. El incremento de los niveles de estos otros antioxidantes apoya las acciones descritas más arriba. Estos antioxidantes incluyen: ácido ascórbico (vitamina C y derivados no tóxicos, por ejemplo, éster C, Ca++ ascorbato), vitamina E (α -tocoferol o equivalente) y precursores que incrementen las cantidades de glutatión de una manera no tóxica, por ejemplo, n-acetil-l-cisteína. Estos tres forman un ciclo en el que las vitaminas C y E protegen al glutatión de manera que éste permanece en estado reducido. La dosis de cada uno variará según la patología, pero el propósito en cada caso es ayudar a los niveles incrementados de ácido úrico en la protección frente al daño por peroxinitrito y otros oxidantes fuertes.

También pueden añadirse a este régimen pequeñas dosis de un esteroide antiinflamatorio de acción corta (por ejemplo, prednisona) administradas en días alternos o cada tres días. Las funciones esteroideas inhiben la NO sintetasa inducible y, por lo tanto, disminuyen en último término la formación de peroxinitrito. La dosis debe mantenerse baja para evitar la supresión de los glucocorticoides naturales producidos por la glándula adrenal. Pueden utilizarse otros medicamentos esteroideos antiinflamatorios (por ejemplo, los de Godman y Gilman 9ª ed. pp. 1473-74-tabla 59-4).

Pueden añadirse dosis en el intervalo de 2 a 3 veces el requerimiento diario normal (NDA) de Vitamina B₆ y ácido Fólico para inhibir la formación de homocisteína. Esta sustancia es un metabolito posible de la n-acetil-l-cisteína y es potencialmente peligroso si se utiliza en periodos de tiempo largos sin la adición de B₆ y ácido fólico.

El extracto de hojas de té verde también parece adecuado como un antioxidante o agente activo desde un punto de vista biológico, que producirá solo o combinado con un precursor del ácido úrico, un efecto antioxidante beneficioso. El galato de epigallocatequina y la quercetina son antioxidantes polifenólicos que se encuentran en el extracto de hojas de té verde. La quercetina se extrae de la corteza y tronco de diferentes plantas y también de flores de trébol y polen de ambrosía. El consumo de té verde se ha asociado con riesgos bajos de cáncer y larga vida en estudios epidemiológicos. Los estudios *in vitro* muestran que EGCg tiene propiedades quimiopreventivas. La quercetina protege al ADN frente al daño oxidativo e inhibe las actividades de las proteínas quinasas. Estos resultados implican que EGCg y quercetina tienen un valor terapéutico potencial para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades.

Hemos estudiado el efecto del extracto de hojas de Té verde sobre el peroxinitrito. Este estudio se basa en una interacción química sencilla entre el peroxinitrito (OONO-) y el luminol que produce luz azul después de la oxidación. Como el peroxinitrito tiene una vida media de menos de un segundo, se utiliza un producto denominado SIN-1 como un generador de peroxinitrito. Además se utilizó el peroxinitrito directamente con un sistema de inyección-mezclado rápido para determinar si existen diferencias entre éste y el sistema generador de peroxinitrito (SIN-1) que mimetiza la producción natural de (OONO-). El peroxinitrito es un compuesto oxidante potente (1.000 veces más activo que una dosis equivalente de peróxido de hidrógeno) y puede oxidar carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Después de la estimulación de la inflamación y/o infección, los macrófagos y neutrófilos pueden ser estimulados para producir grandes cantidades de peroxinitrito.

Los beneficios del té en la salud han sido observados y utilizados por los Chinos e Indios durante miles de años. El té verde y el té negro se obtienen de la misma planta (*Camellia sinensis*). La diferencia entre los dos té reside principalmente en el procesamiento. El té verde se hierve ligeramente, lo que inactiva las fenol oxidasas responsables de la oxidación de los polifenoles, permaneciendo la mayoría de los compuestos en estado no oxidado. Por lo tanto, al permanecer los polifenoles en el estado reducido o no oxidado pueden actuar agresivamente como antioxidantes frente a sustancias oxidantes fuertes como el peroxinitrito (P) o incluso el hipoclorito (H) que se produce en presencia de peróxido de hidrógeno, ion cloruro, mediante la enzima mieloperoxidasa. Cuando estas sustancias oxidantes se vierten de manera inapropiada fuera de la vacuola fagocítica pueden dañar el tejido circundante produciendo enfermedades inflamatorias basadas en oxidación, por ejemplo, Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral, infarto, artritis, anoxia, fibrosis pulmonar, obstrucción pulmonar crónica, aterosclerosis, y muchas otras enfermedades. Por lo tanto, parece apropiado disponer de sustratos oxidables como los polifenoles para actuar como moléculas que sirvan para eliminar el efecto del oxidante fuerte. Existe evidencia de que los polifenoles del té pueden actuar de esta manera y proteger frente a la actividad antibacteriana y/o antiviral y oponerse al cáncer y a la mutación.

Los polifenoles principales del té verde aparecen en la Figura 5. Se piensa que el antioxidante más activo es el galato de Epigallocatequina que es el éster galato de la epigallocatequina. El efecto antioxidante del té verde y de algunos de sus constituyentes frente a la quimioluminiscencia dependiente de luminol activada por peroxinitrito. Debido a que el peroxinitrito oxida el luminol para dar un intermedio que produce luz, los antioxidantes inhibirán esta luz azul interfiriendo con la oxidación del luminol. Además, se utilizó SIN-1 que produce superóxido y óxido nítrico que se combinan para producir peroxinitrito. Los antioxidantes del té verde producirán una actividad inhibitoria frente a la producción de luz de manera similar independientemente de si el peroxinitrito proviene directamente o indirectamente de SIN-1. Sin embargo, los componentes del peroxinitrito, es decir, superóxido y óxido nítrico, se producen por SIN-1 y su procesamiento/producción o unión pueden inhibirse o ser interferidos de una manera que no se produce en el caso del peroxinitrito solo. El propósito de este estudio fue determinar la actividad antioxidante del extracto de té verde y de algunos de sus polifenoles principales. Esto se consiguió utilizando los antioxidantes para oponerse a la oxidación del luminol por el peroxinitrito inhibiendo, de esta manera, la producción de luz azul.

Se sabe que tres congéneres de la sidonimina producen óxido nítrico y superóxido y después se combinan para producir peroxinitrito (ONOO). Se eligió SIN-1 (Linsidomina) antes que C89-4144 o C87-4095 porque fue más eficaz en la velocidad de la reacción aunque en cuanto a la producción total de luz C89-4144 fue algo mejor (Véase la Figura 6). SIN-1 fue la base de nuestros experimentos y todas las sidoniminas se obtuvieron del Dr. Karl Schonafinger, Casella-AG Hanauer Landstrasse 526-6000 Frankfurt am Main 61, Frankfurt, Alemania. SIN-1 produce peroxinitrito a una velocidad de aproximadamente 1% por minuto (basado en la cantidad total del compuesto). SIN-1 se disolvió en tampón PBS 0,1 M (pH 7,4) a una concentración de 15 mg/5 ml. Se mantuvo en hielo y retuvo su actividad durante varias horas de experimento. El peroxinitrito (aproximadamente 50 mM) se diluyó 1/1.000 con agua. La disolución original se proporciona en NaOH 0,3 M y ésta estabiliza el compuesto. Una vez diluido debe mantenerse en hielo y utilizarse rápidamente, especialmente después de la dilución. El OONO- diluido se inyecta en tampón PBS a pH=7,4. La inyección y mezclado rápido son cruciales en esta situación ya que bajo condiciones neutralizantes la vida media de OONO- es menos de un segundo, a diferencia de la reacción más lenta con SIN-1. Sin embargo, la reacción más lenta con SIN-1 proporciona la oportunidad de diseccionar la reacción en sus partes componentes, al no ser tan cruciales la reacción e inyección/mezclado rápidos.

El luminol se obtuvo de Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. Primero se disolvió en un ml de DMSO y después se diluyó para dar lugar a una disolución madre (10-4M) en disolución salina tamponada con fosfato 0,1 M a un pH de 7,4.

El extracto en polvo de té verde se obtuvo de Pharmanex, Simi Valley, California. Se disolvieron 250 mg en 10 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4 y se utilizó como una disolución madre. Las diluciones se hicieron utilizando PBS y las muestras de esta disolución madre original se diluyeron de diez en diez veces de uno a un millón (seis muestras).

Se pipetearon 100 μ l de la disolución de luminol (concentración final 0,6 mMolar), 100 μ l de las diluciones de té verde en tampón PBS 0,1 M (pH=7,4) y 200 μ l de tampón solo y 100 μ l de la disolución de SIN-1 (concentración final 5,8 mMolar) o del derivado en un tubo de luminómetro de 3 ml de fondo redondo lo que resultó en un volumen total de 500 μ l. También se utilizó una disolución control para proporcionar una referencia a la estimulación de luz producida por la combinación de SIN-1 y luminol. La concentración final de esta disolución consistió en 100 μ l de luminol, 300 μ l de tampón, y 100 μ l de SIN-1. SIN-1 o los derivados se mantuvieron en hielo antes de pipetearlos y fueron el último reactivo que se añadió debido a su inestabilidad a temperatura ambiente.

El tubo del luminómetro se puso en un luminómetro Berthold modelo LB9505C tubo de 6 canales con el control de temperatura ajustado a 37°C y la reacción de luz se determinó durante 20 minutos. El peroxinitrito reacciona con el luminol directamente y se inyectó utilizando un dispositivo de inyección independiente de la presión, que inyecta 1/50 de su volumen total (2.500 μ m) de una jeringa de gases, fabricada por Hamilton Co. (pat. # 3161323) en Whittier, CA, para producir una luz azul a 425 nm, que corresponde al intervalo de detección más sensible de los fotomultiplicadores para este luminómetro. El dispositivo de inyección se unió a una jeringa de gases de 2.500 microlitros con una aguja de 5,2 cm. Esta longitud de la aguja fue necesaria para penetrar el septo de las entradas del Luminómetro Berthold de 6 canales y para que entrara en el tubo lo suficiente como para producir un mezclado reproducible necesario debido a la corta vida media del peroxinitrito. En la Fig. 7 se muestran inyecciones repetitivas de peroxinitrito mostrando la luz

generada durante un periodo de tiempo de un minuto que se obtuvo, representó e integró con un ordenador IBM con un programa KINB. En el caso de SIN-1, los ingredientes se mezclaron antes del ensayo, añadiéndose SIN-1 el último. El ensayo se muestra como cuentas por minuto integradas durante un periodo de tiempo de 20 minutos. Se determinó el área bajo la curva de luz ya que se reproducía mejor y generalmente es más representativa que la altura del pico.

5 Las determinaciones del área bajo la curva (AUC) se consiguieron utilizando un programa KINB proporcionado con el instrumento (Berthold). Este programa utiliza una aproximación trapezoidal como método para determinar AUC.

La quimioluminiscencia se integró durante los 20 minutos iniciales de cada reacción con SIN-1 y un minuto para el peroxinitrito. Las reacciones se repitieron en experimentos independientes un mínimo de tres veces. Todos los gráficos de barras muestran medias y las barras de error asociadas representan la desviación estándar. El nivel de significancia se ajusta a $p=0,05$ y se calcula a partir del test T de Student cuando resulta apropiado. Los blancos se llevaron a cabo sin SIN-1 o peroxinitrito y produjeron una señal de luz relativamente insignificante que fue ignorada en los ensayos.

La Figura 5 muestra las estructuras de los distintos constituyentes encontrados en el extracto en polvo de té verde que se ensayaron. Los ensayos se llevaron a cabo para determinar los efectos inhibitorios de los constituyentes individuales sobre las propiedades productoras de luz encontradas en la combinación de SIN-1/peroxinitrito y luminol. Estos datos forman la base de los resultados siguientes:

El mecanismo probable mediante el que SIN-1 se hidroliza a $pH=7,4$ y produce el anión peroxinitrito es el resultado de la catálisis básica y de la apertura del anillo de la sidonimina de cinco miembros y su reacción con oxígeno disuelto que reduce de esta manera el oxígeno y produce el anión superóxido y un compuesto radical con anillo abierto que después de una reorganización libera óxido nítrico gas (un radical libre). Los dos radicales libres se combinan y producen el anión peroxinitrito y los productos resultantes. El peroxinitrito es el que reacciona con el luminol produciendo luz azul que se detecta fácilmente mediante los fotomultiplicadores del luminómetro.

La Figura 8 muestra los efectos inhibitorios de cada dilución de té verde cuando se añaden a la combinación productora SIN-1/luminol. El extracto de té verde que consiste mayoritariamente en polifenoles produce la inhibición total de luz producida por el luminol y hasta una dilución de 10.000 veces y a 0,005 mg la inhibición es aproximadamente un 50%. Una dilución mayor parece producir un incremento ligero de la inhibición.

La Figura 9 muestra una inhibición similar con peroxinitrito y luminol excepto en que el punto del 50% de inhibición se produce con una dosis de 1.000 veces de extracto de té verde y cuando la dilución de 10 veces continúa la inhibición se incrementa hasta el 75% o más como una especie de respuesta bifásica.

En la Figura 10 se ven los efectos inhibitorios de (-) epicatequina sobre la luminiscencia del luminol activada con SIN-1. Una dilución 1:10.000 a $0,45 \mu M$ produce una inhibición aproximada del 10%. Sin embargo, en la Fig. 11 puede verse la misma potencia inhibitoria con peroxinitrito pero a una dilución de 10.000 a 100.000 todavía puede verse una inhibición de la luz del 75-95%.

Los efectos inhibitorios de la catequina racémica pueden observarse sobre la luz del luminol activada por SIN-1. En la Fig. 12 a una dilución 1:1.000 de catequina se observa una inhibición de la luz del 50% aunque las diluciones de 10 veces después de ésta muestran una inhibición pequeña. Un patrón similar se observa con la luz producida por peroxinitrito en la Fig. 13, aunque el efecto inhibitorio del 50% no se observa hasta la dilución 1:10.000. A la dilución 1:100.000 todavía se observa una inhibición del 50%.

Los efectos inhibitorios del galato de (-) epigallocatequina sobre la luz del luminol activada con SIN-1 se observan en la Fig. 14 e inhibe al 100% a una dilución 1:10 aunque las diluciones mayores estimulan la producción de luz. Puede observarse el mismo patrón de comportamiento con este compuesto utilizando la luz producida por peroxinitrito en la Fig. 15.

Como puede observarse en la Figura 14 el galato de (-) epicatequina muestra una inhibición sólida (60%) a una dilución de 1:1.000 cuando se utiliza SIN-1 como activador de la luz del luminol pero cuando se utiliza peroxinitrito como activador de la luz del luminol, aunque se observa una inhibición del 100% a una dilución 1:10, se observa una inhibición de la producción de luz del 25% en diluciones sucesivas de 10 veces después de este punto (Figura 15).

Los efectos inhibitorios de galato de C-1 epicatequina sobre la luz del luminol activada por SIN-1 se muestran en la Figura 16. En la Figura 17 se observa un patrón similar con la luz producida por peroxinitrito.

Los antioxidantes que se añaden a la mezcla de reacción mencionada anteriormente interferirán generalmente con la oxidación del luminol al reaccionar directamente con el peroxinitrito. Además, elegimos SIN-1 como fuente de peroxinitrito debido a que produce bastante luz y presenta el pico más temprano. Además, como los componentes de SIN-1 son producidos por este compuesto, puede utilizarse para generar peroxinitrito a una velocidad más lenta. Esto nos permite la oportunidad de inhibir los componentes individuales del peroxinitrito, de manera similar a la forma en la que el cuerpo inhibe la generación fisiológica de peroxinitrito.

El extracto de té verde inhibe la producción de luz del luminol al reaccionar con el peroxinitrito proveniente de SIN-1 como se muestra en la Fig. 8. También inhibe la producción de luz del luminol por peroxinitrito (Fig. 9). Incluso cantidades μM del té producen una inhibición que se puede determinar. Comparativamente, los dos conjuntos

de figuras (Fig. 8 y Fig. 9) deberían ser relativamente indistinguibles. Las razones de estas discrepancias sólo pueden teorizarse. Una explicación posible que se puede considerar se refiere a la naturaleza de SIN-1 comparada con la forma pura de peroxinitrito. SIN-1 se degrada con el tiempo en peroxinitrito mediante la formación de superóxido y de óxido nítrico. La Fig. 9 indica que SIN-1 se vuelve menos eficaz al aumentar las diluciones de extracto de té, como se esperaba. Sin embargo, la Fig. 8 indica que el peroxinitrito se vuelve menos eficaz en la tercera dilución, y que las demás diluciones demostraron de nuevo un comportamiento inhibitorio. Este fenómeno es difícil de explicar. Una explicación posible tiene en cuenta las capacidades estimuladoras de algunos fenoles. Tal y como indican las estructuras de la Fig. 5, los constituyentes del té verde contienen varios polifenoles. Puede teorizarse que existe una estimulación, así como inhibición, que se produce en los tubos que contienen peroxinitrito en lugar de SIN-1.

Parece que los antioxidantes juegan un papel principal en la eliminación de sustancias no deseadas del cuerpo. Éstas incluyen bacterias, parásitos, y virus. Los oxidantes tales como peroxinitrito, hipoclorito/mieloperoxidasa, y superóxido/peróxido de hidrógeno/ion ferroso pueden producir una toxicidad alta. Cuando son confinados y compartimentalizados apropiadamente, estos oxidantes juegan su papel atacando a invasores y manteniendo la salud. Algunas veces estas reacciones pueden quedar fuera de control y producir una gran inflamación que puede convertirse en crónica, por ejemplo, artritis. Por lo tanto, las reacciones químicas implicadas en la colitis, meningitis, fallo de órganos múltiple se producen continuamente con unos niveles altos durante la enfermedad.

En todos estos ejemplos de inflamación crónica, se producen oxidantes tóxicos. Los oxidantes juegan un papel principal en la producción de las señales de la inflamación. Por lo tanto, es lógico que los compuestos químicos que puedan mantener a los oxidantes bajo control serán antioxidantes. Existen dos tipos muy conocidos de antioxidantes, solubles en agua, por ejemplo, vitamina C, y solubles en grasa, vitamina E. Además, los constituyentes polifenólicos del té verde podrían ser importantes para prescindir de los antioxidantes que están presentes en el cuerpo. Que una sustancia actúe como antioxidante u oxidante depende del lugar en el que se encuentre la sustancia en cuestión dentro de una escala oxidante-reductor. El ácido ascórbico puede ser un antioxidante o un oxidante dependiendo de donde se encuentre en la escala respecto a otras sustancias.

En las Figuras 10 y 11 se estudió el efecto de (-) epicatequina sobre la luz activada por SIN-1 y peroxinitrito respectivamente. Respecto a las otras catequinas, el constituyente (-) epicatequina del extracto de té verde demostró la mayor inhibición global de la luz producida por peroxinitrito o SIN-1. Aunque no se desea una limitación por la teoría, podría considerarse una explicación después de la revisión de las estructuras de la Figura 5. Contiene dos anillos difenólicos y un OH alfa en el carbono quiral clave en el éster cíclico de 6 miembros. Esto podría permitir un acceso más sencillo para el peroxinitrito atacante. El segundo antioxidante más activo fue galato de (-) epicatequina que es un éster gálico de la epicatequina. Su reacción [galato de (-) epicatequina] frente a SIN-1 o peroxinitrito se muestra en las Fig. 15 y 16, respectivamente. En ambos casos el compuesto es activo a diluciones 1:1.000 con una inhibición de aproximadamente el 50%. Sería de esperar un acceso similar para el ataque por peroxinitrito que el del compuesto parental anterior. Además, al ser un éster galato puede ser hidrolizado por esterasas en el cuerpo, liberando de esta manera (-) epicatequina y ácido gálico.

La catequina racémica es muy activa frente a SIN-1 o peroxinitrito, como se muestra en las Fig. 10 y 11. Una dilución de mil veces de la disolución madre original a 0,45 mMolar produce una inhibición de aproximadamente el 50% de los dos oxidantes utilizados previamente. Esta inhibición en el caso del peroxinitrito se produjo en la dilución 1:10.000.

Finalmente, el galato de epigalocatequina mostró estimulación de la luz, en lugar de inhibición, de SIN-1 o peroxinitrito (Fig. 13 y 14) a la dilución 1:100 a partir de la disolución madre a 0,45 mMolar. Claramente fue el antioxidante más débil de los ensayados. Uno de sus fenoles tiene tres grupos hidroxilo y, por supuesto, el ácido gálico tiene tres hidroxilos fenólicos. Esta combinación podría permitir un acceso más difícil de los oxidantes. Ciertamente, dosis más altas del compuesto pueden ser eficaces. La estimulación de luz por los fenoles o metabolitos es un fenómeno bien estudiado y en un estudio reciente se ha mostrado una explicación química.

Debe apuntarse que a dosis altas (-) epicatequina y galato de (-) epigalocatequina cambian de color cuando se añade SIN-1 a la disolución. Al final de los veinte minutos de incubación en el luminómetro, las disoluciones de los dos compuestos se vuelven amarillas. Este cambio de color puede ocurrir por el metabolismo oxidativo de los constituyentes. Una explicación posible de este fenómeno puede ser que los constituyentes sufren nitración y/o hidroxilación.

A partir de la información discutida anteriormente, parece que una formulación que contiene un precursor del ácido úrico y/o un compuesto aislado a partir de extracto de té verde sería muy útil para tratar o prevenir el daño oxidativo.

La tabla siguiente resume el régimen de tratamiento propuesto. En todos los casos se prevén las dosis. La dosis real requerida variará según la fisiología y patología del individuo.

ES 2 279 627 T3

TABLA 1

Sustancia	Dosis	Objetivo
Hipoxantina†	2-10 g/día	Antioxidante primario
Vitamina C	1-5 g/día	Antioxidante secundario
Vitamina E	1.000-3.000 UI/día	Antioxidante secundario (soluble en grasa)
n-acetil-l-cisteína	500-2.000 mg/día	Antioxidante secundario
Prednisona	2-3 veces/semana	Inhibe la NO sintetasa inducible
Vitamina B ₆	2-3 X NDA*/día	Inhibe la formación de homocisteína
Ácido fólico	2-3 X NDA*/día	Inhibe la formación de homocisteína

† u otros precursores del ácido úrico incluyendo ADN, ARN, sus nucleótidos, sus nucleósidos, o sus bases libres apropiadas (ADN, ARN) a partir de cualquier fuente biológica.

* requerimiento diario normal

Si se ingieren en las cantidades correctas, cualquiera o todas las sustancias que contienen purinas podrían utilizarse para incrementar la concentración de ácido úrico aunque la hipoxantina es probablemente el precursor más eficaz con el menor número de efectos secundarios. Ésta podría utilizarse como una sustancia de liberación en el tiempo que produciría un suministro prácticamente continuo de precursor inmediato del ácido úrico. Estos intervalos preferidos pueden combinarse fácilmente con extracto de té verde.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una composición que comprende un precursor del ácido úrico seleccionado de hipoxantina, xantina, inosina, adenosina, guanosina, AMP, GMP, IMP, adenina, guanina o combinaciones de éstos, en la fabricación de un medicamento para administrarse con uno o más de los antioxidantes siguientes:
- a) vitamina C o vitamina E,
 - 10 b) un inhibidor de la formación de homocisteína seleccionado de vitamina B6 o ácido fólico,
 - c) quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, o galato de catequina, o
 - 15 d) un extracto de té verde,
- para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o enfermedades neurodegenerativas.
2. Utilización de uno o más antioxidantes seleccionados de:
- 20 a) vitamina C o vitamina E,
 - b) un inhibidor de la formación de homocisteína seleccionado de vitamina B6 o ácido fólico,
 - 25 c) quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, o galato de catequina, o
 - d) un extracto de té verde,
- 30 en la fabricación de un medicamento para administrarse con un precursor del ácido úrico seleccionado de hipoxantina, xantina, inosina, adenosina, guanosina, AMP, GMP, IMP, adenina, guanina o combinaciones de éstos,
- para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o enfermedades neurodegenerativas.
- 35 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el medicamento también puede administrarse con un inhibidor de la NO sintetasa seleccionado de un esteroide antiinflamatorio o prednisona.
4. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho precursor del ácido úrico es hipoxantina y tiene una dosificación de 100 mg/día a 25 g/día.
- 40 5. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho precursor del ácido úrico es hipoxantina y tiene una dosificación de 1 g/día a 20 g/día.
6. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho precursor del ácido úrico es hipoxantina y tiene una dosificación de 2 g/día a 10 g/día.
- 45 7. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho precursor del ácido úrico es hipoxantina y tiene una dosificación de 100 mg/día a 10 g/día.
8. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el precursor del ácido úrico y el o los oxidantes se administran sucesivamente en cualquier orden.
- 50 9. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el precursor del ácido úrico y el o los oxidantes se administran simultáneamente.
- 55 10. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el precursor del ácido úrico y el o los oxidantes se mezclan antes de la administración.
- 60 11. Una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el precursor del ácido úrico y el o los oxidantes se administran por vía oral, sublingual, transdérmica, intravenosa o tópica.

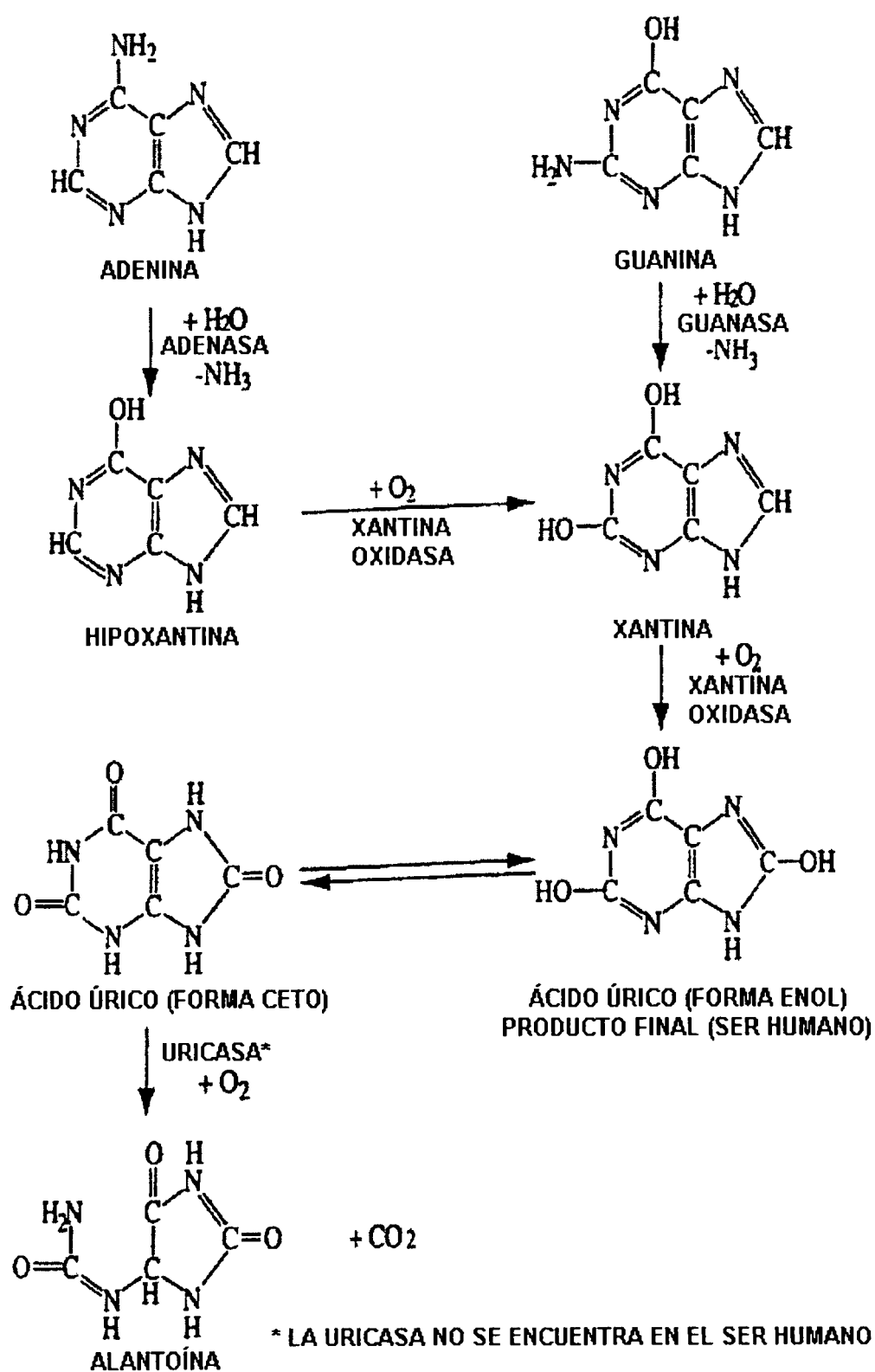


FIG. 1

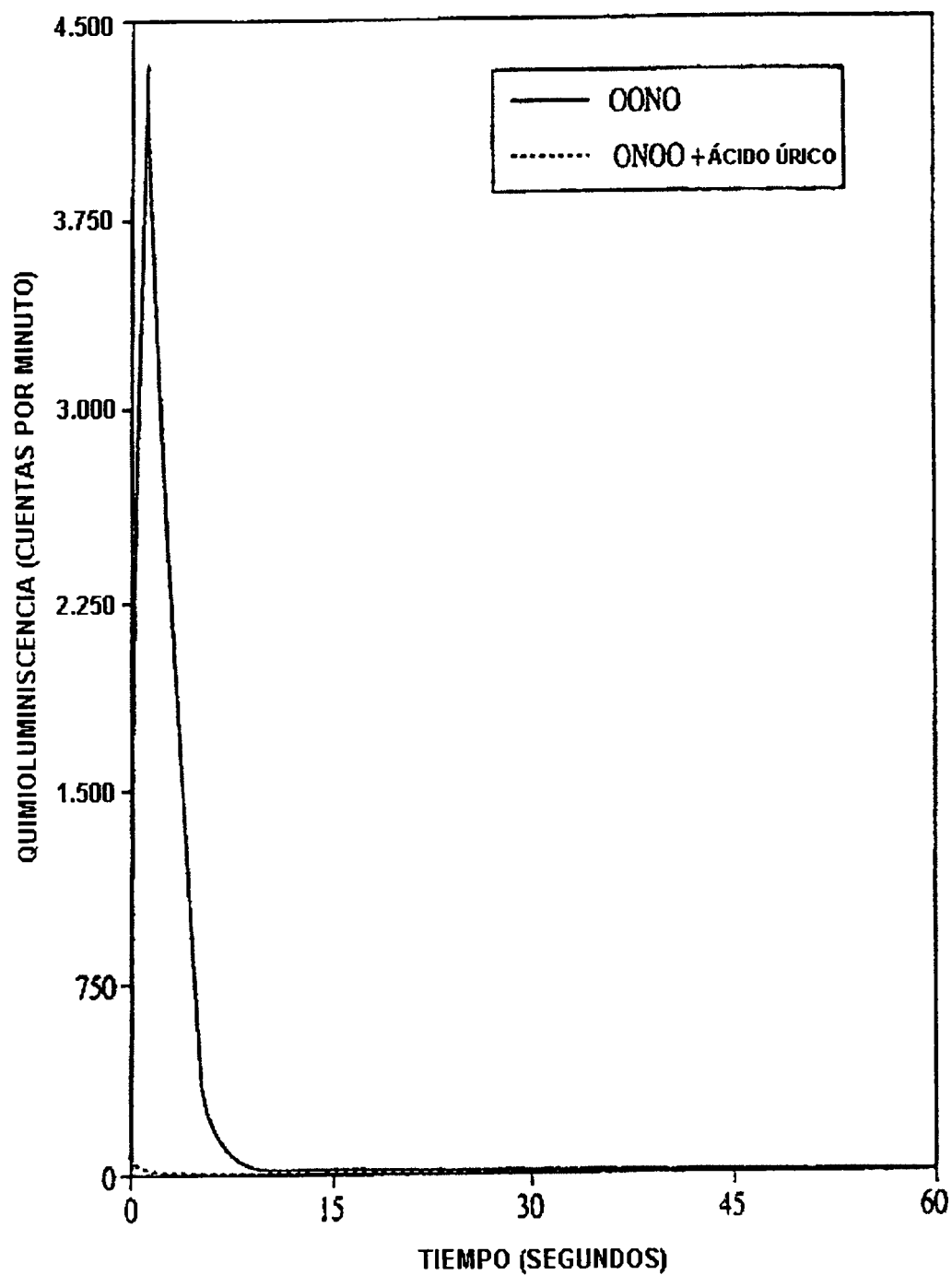


FIG. 2

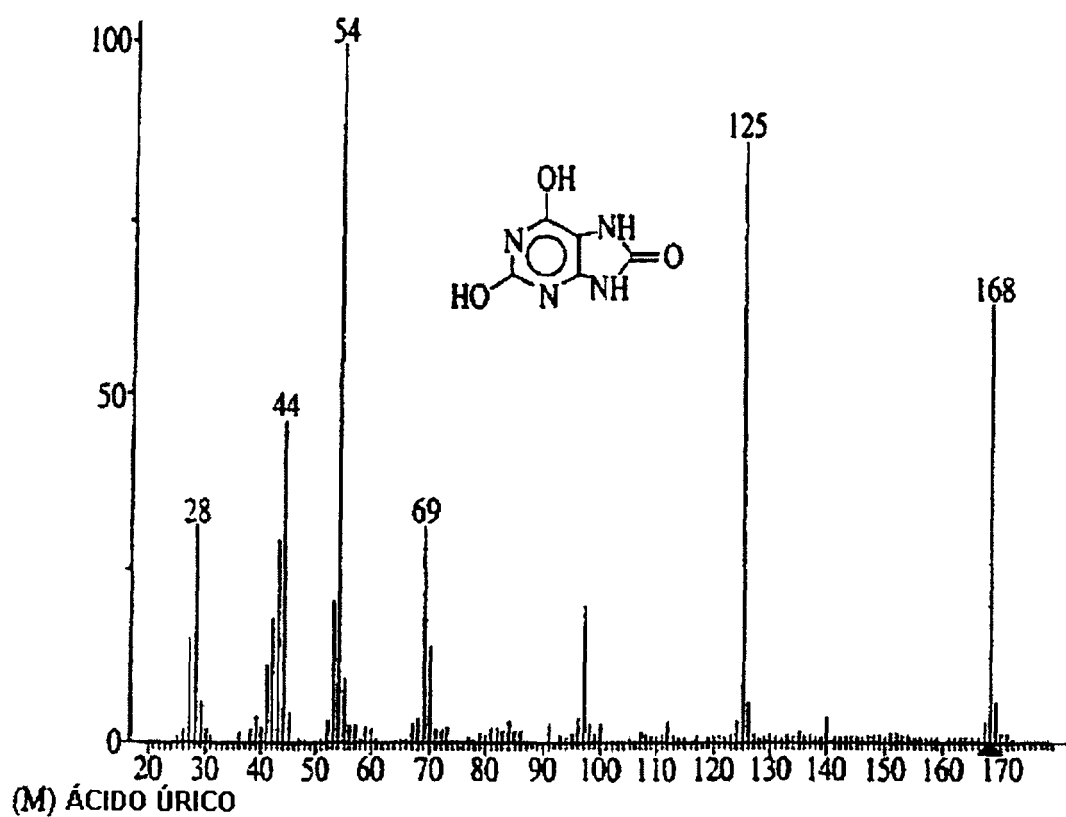


FIG. 3A

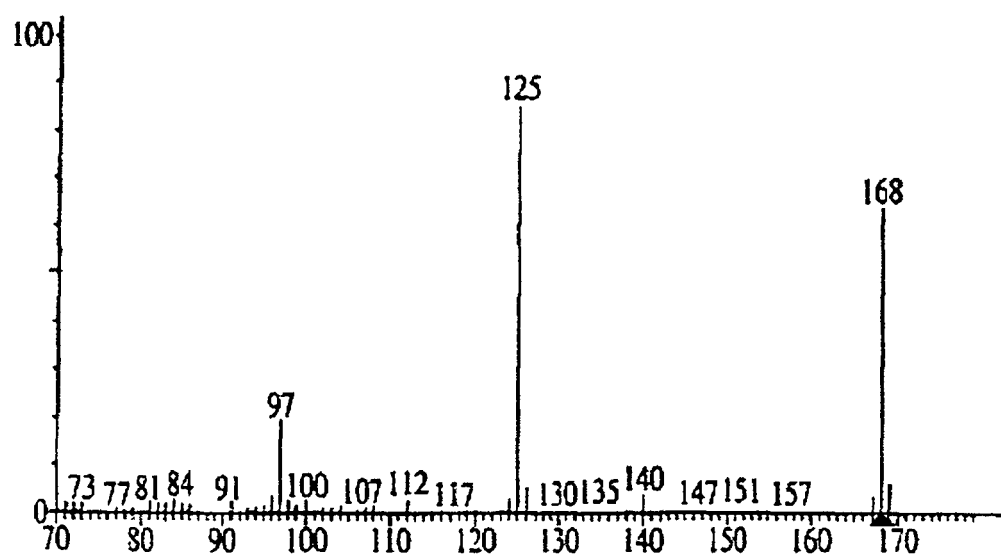


FIG. 3B

ÁCIDO ÚRICO
 FÓRMULA: $C_5H_4N_4O_3$
 PM: 168 CAS #69-93-2 NIST #: 150460 ID # 12795 BD: MAINLIB
 OTRAS BD: FINE, TSCA, RTECS, HODOC, NIH, EINECS

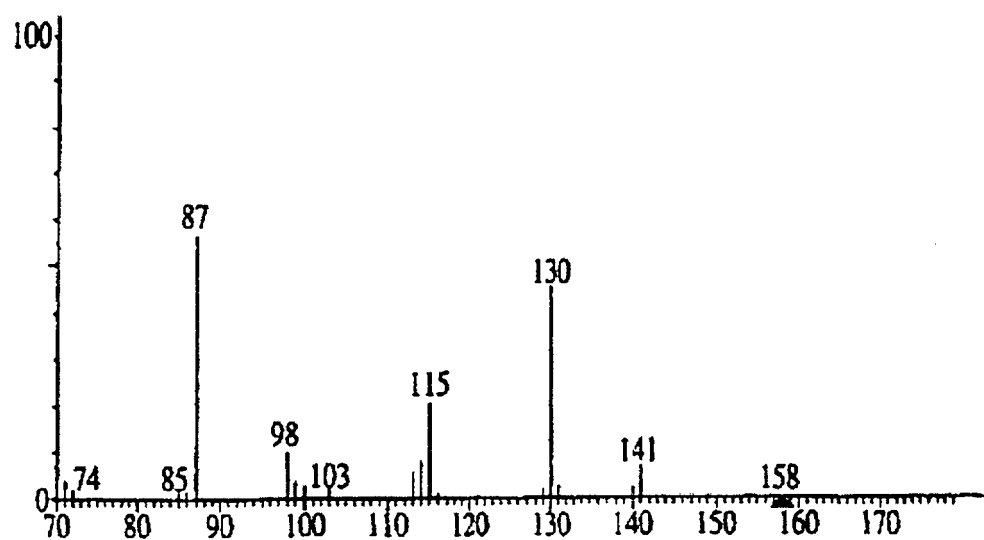
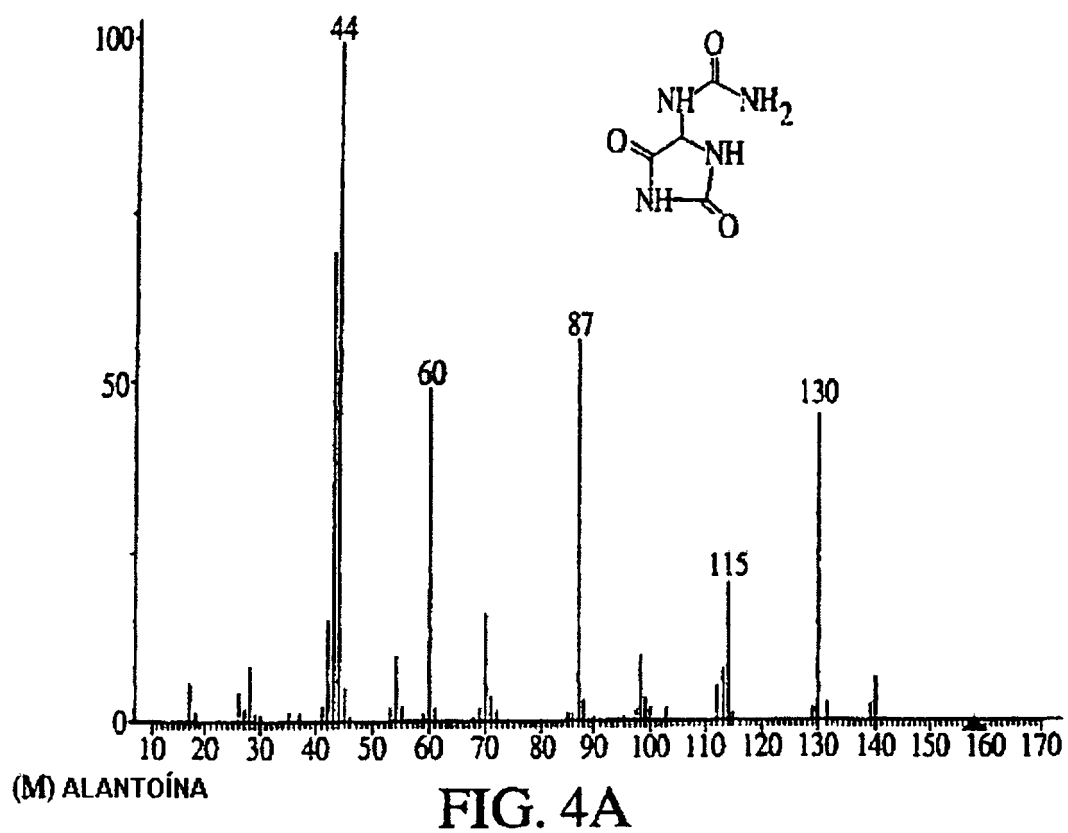
141 MASAS Y ABUNDANCIAS

25	6	44	463	61	6	78	7	95	15	111	11	127	9	143	4	159	3
26	21	45	46	63	4	79	14	96	37	112	30	128	6	144	2	160	2
27	155	46	3	64	4	80	12	97	200	113	11	129	8	145	7	161	3
28	315	47	6	65	9	81	23	98	28	114	8	130	10	146	5	162	3
29	60	48	5	66	9	82	22	99	16	115	7	131	6	147	8	163	5
30	21	50	4	67	29	83	20	100	26	116	4	132	4	148	5	164	4
31	8	51	9	68	36	84	32	101	4	117	8	133	8	149	7	165	5
32	3	52	21	69	314	85	21	102	3	118	3	134	5	150	6	166	6
36	18	53	208	70	140	86	18	103	3	119	6	135	14	151	11	167	25
37	2	54	999	71	20	87	4	104	4	120	8	136	7	152	11	168	627
38	22	55	95	72	19	89	3	105	7	121	7	137	7	153	6	169	53
39	40	56	26	73	22	90	3	106	5	122	5	138	6	154	6	170	10
40	24	57	27	74	4	91	27	107	16	123	11	139	6	155	5	171	7
41	116	58	8	75	5	92	5	108	11	124	30	140	33	156	4		
42	184	59	24	76	2	93	12	109	13	125	856	141	5	157	4		
43	294	60	21	77	10	94	9	110	10	126	56	142	6	158	3		

SINÓNIMOS:

- 1H-PURINA-2,6,8(3H)-TRIONA,7,9-DIHIDRO-
- ÁCIDO LÍTICO
- PURINA-2,6,8(1H,3H,9H)-TRIONA
- 1H-PURINA-2,6,8-TRIOL
- 2,6,8-TRIOXOPURINA
- 2,6,8-TRIOXIPURINA
- 7,9-DIHIDRO-1H-PURINA-2,6,8(3H)-TRIONA
- 2,6,8-TRIHIDROXIPURINA
- ÚRICO

FIG. 3C



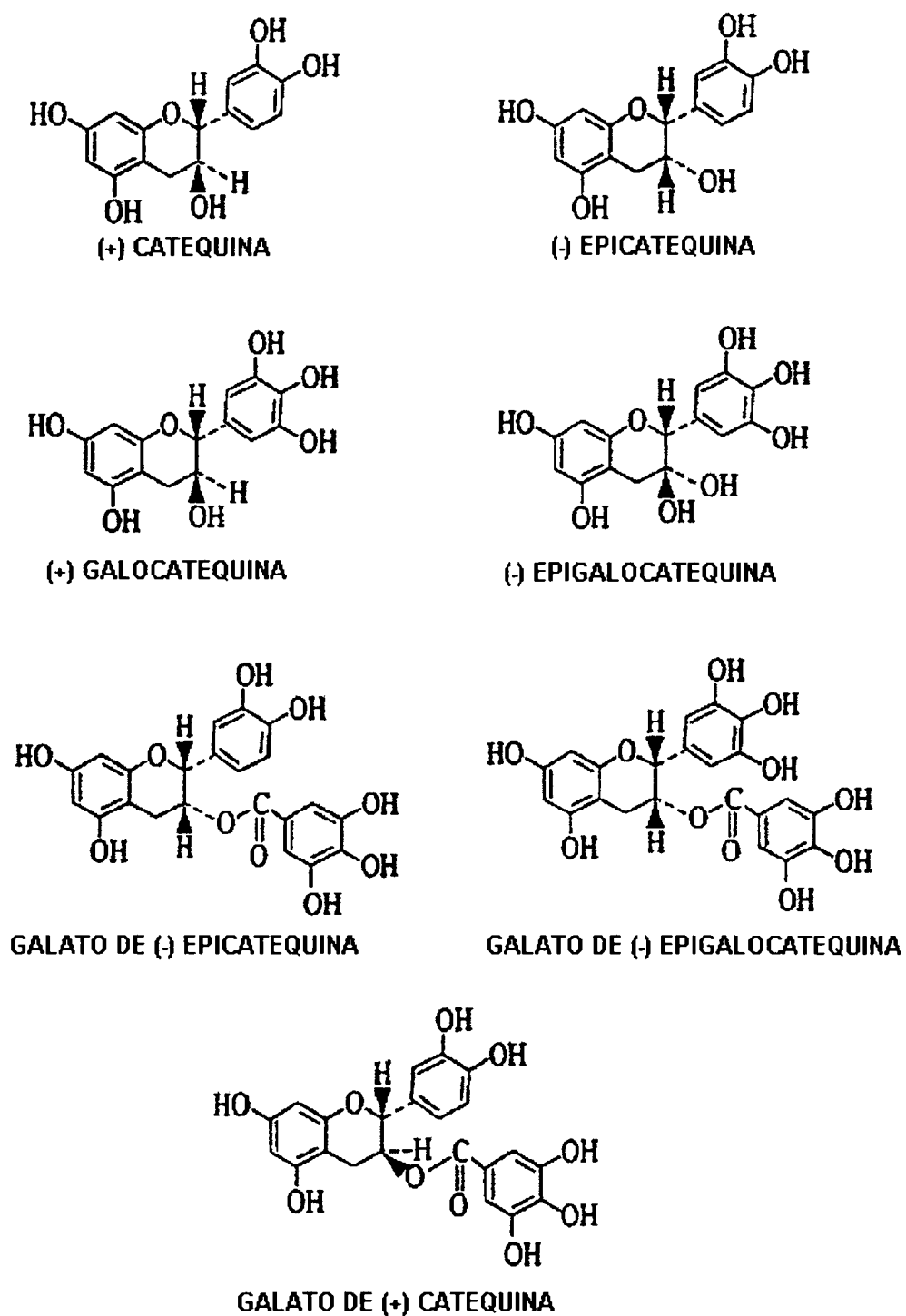


FIG. 5

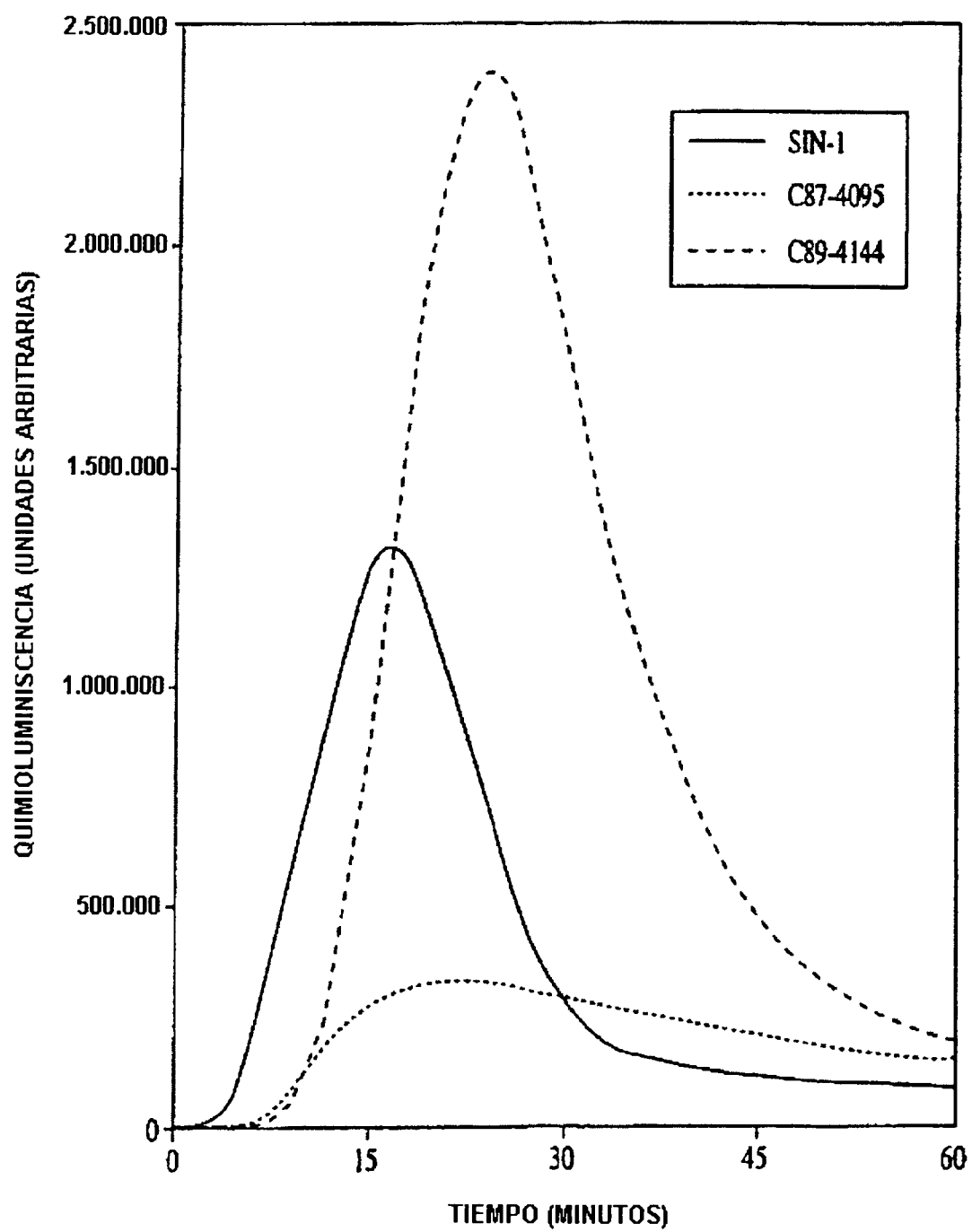


FIG. 6

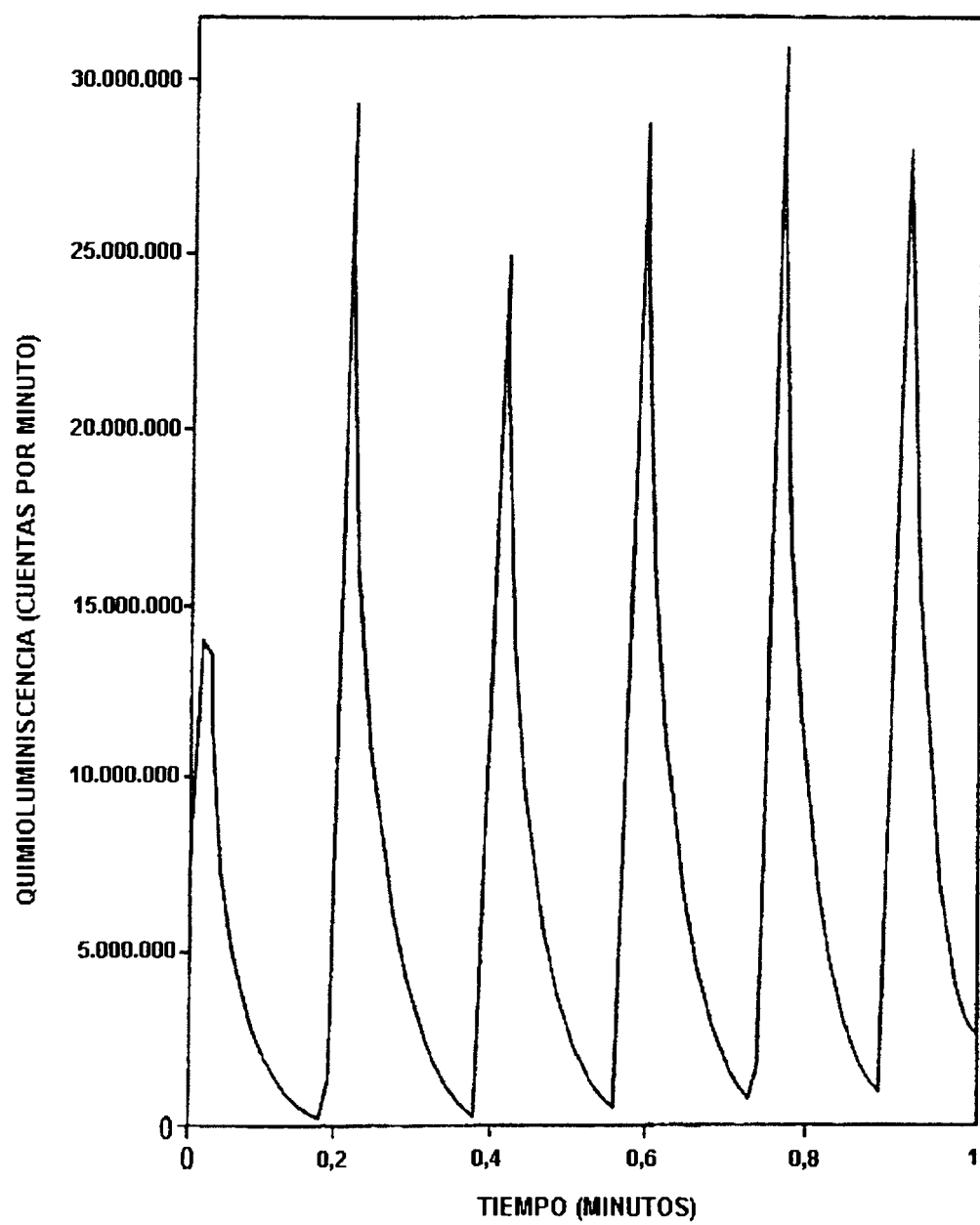


FIG. 7

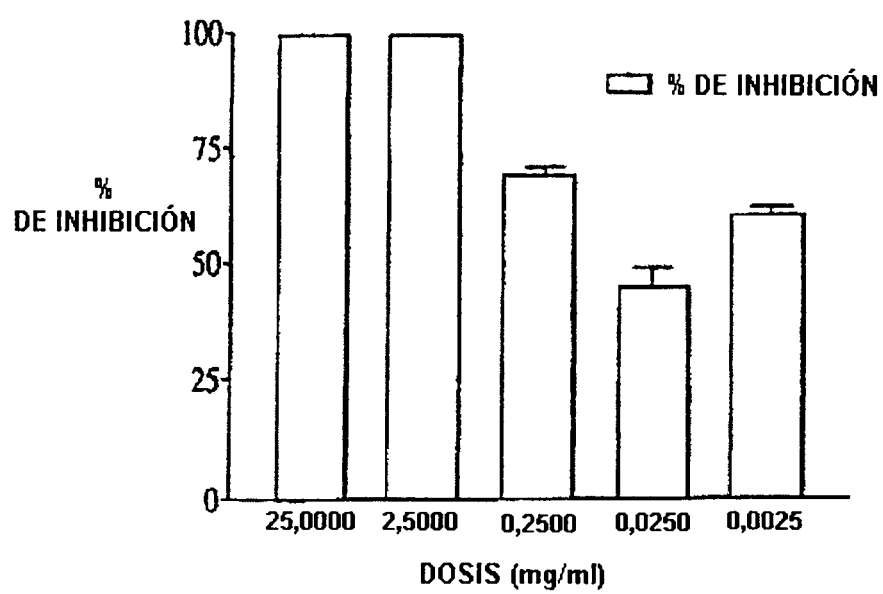


FIG. 8

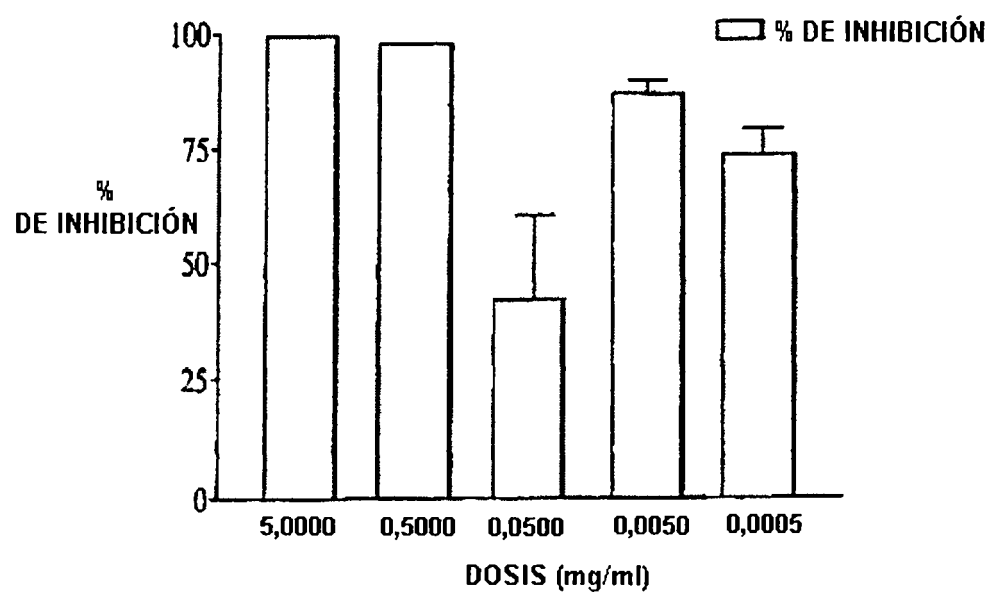


FIG. 9

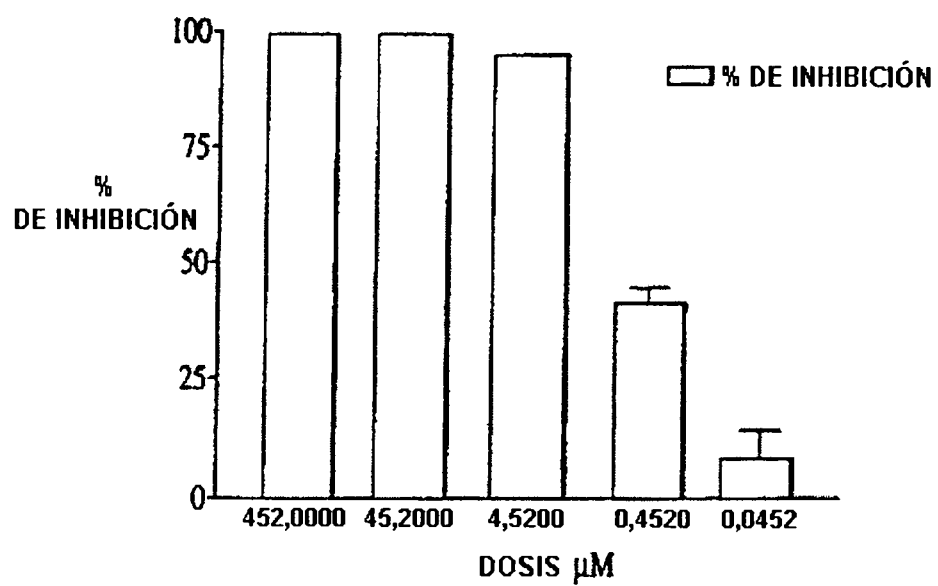


FIG. 10

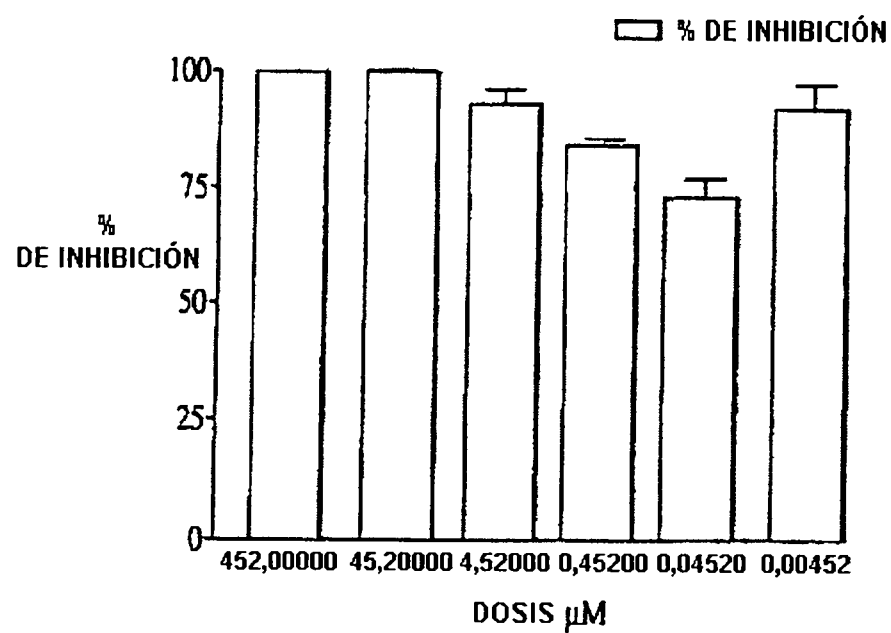


FIG. 11

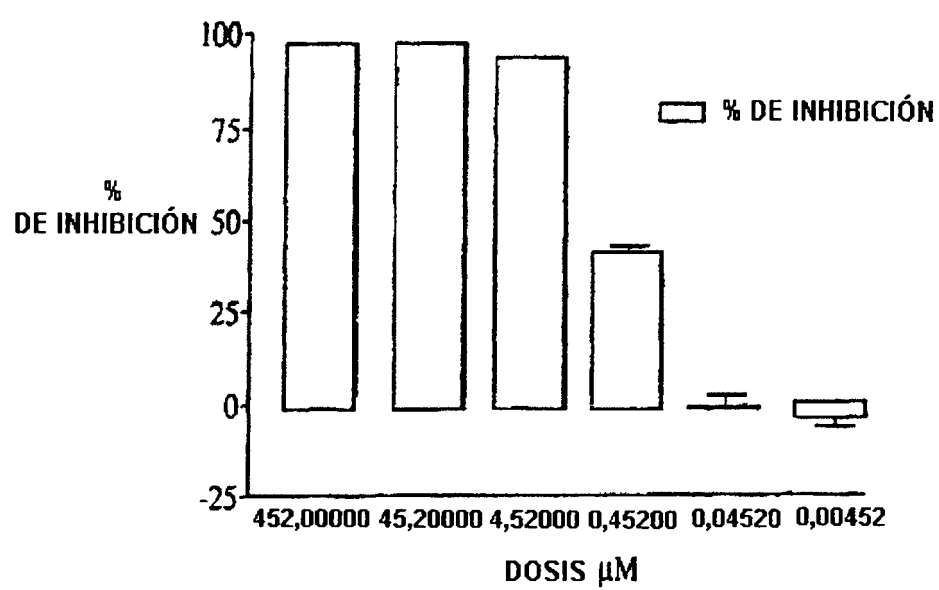


FIG. 12

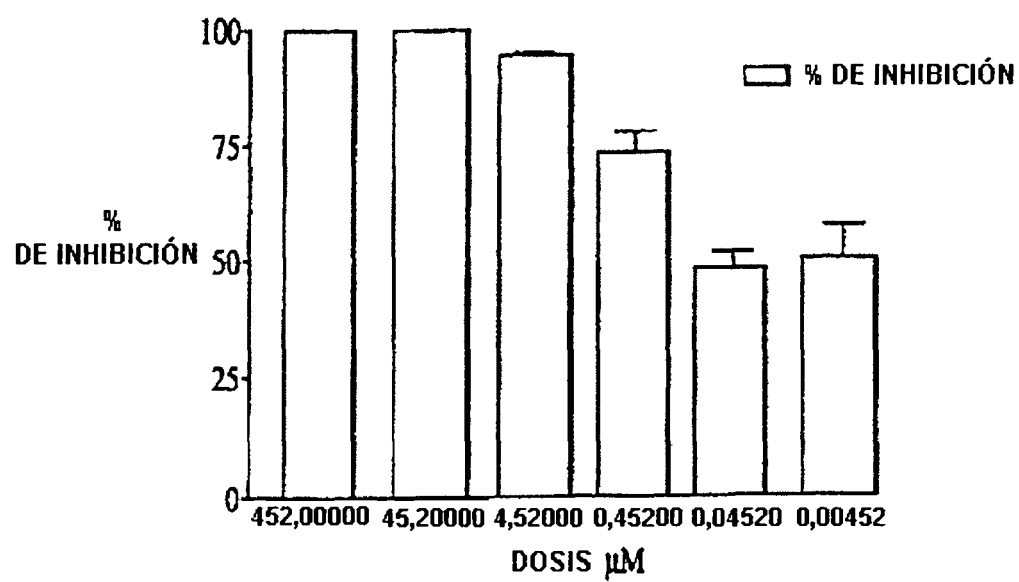


FIG. 13

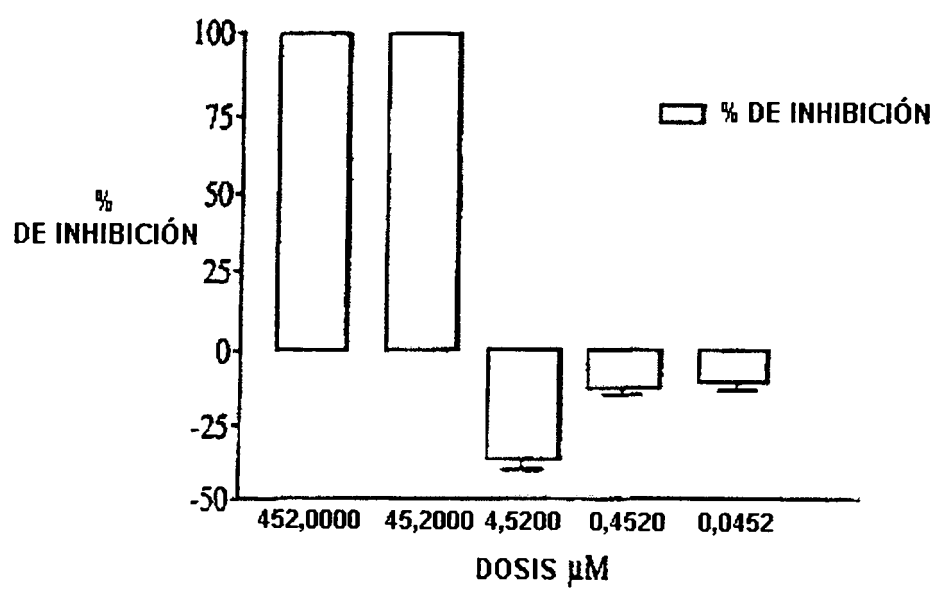


FIG. 14

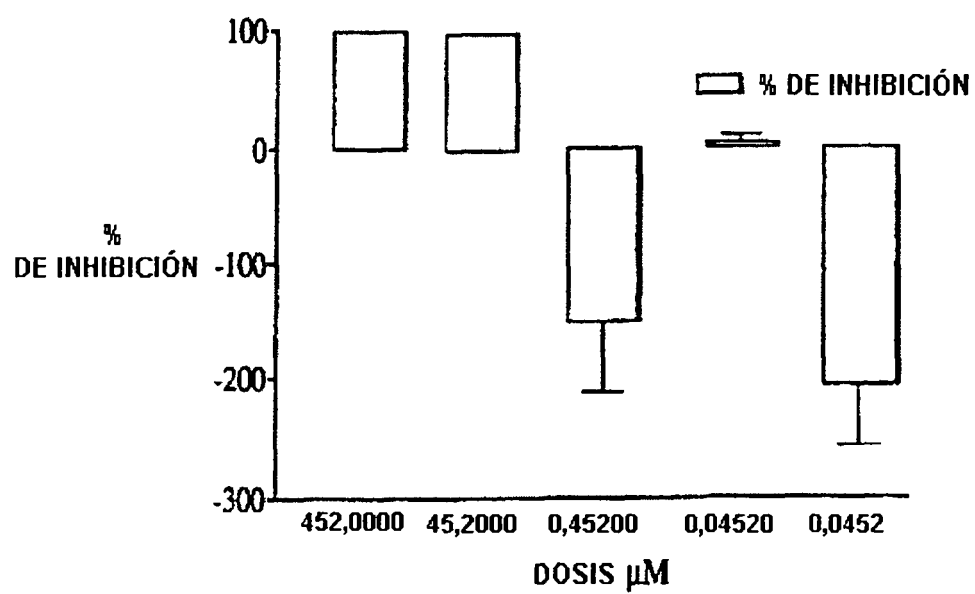


FIG. 15

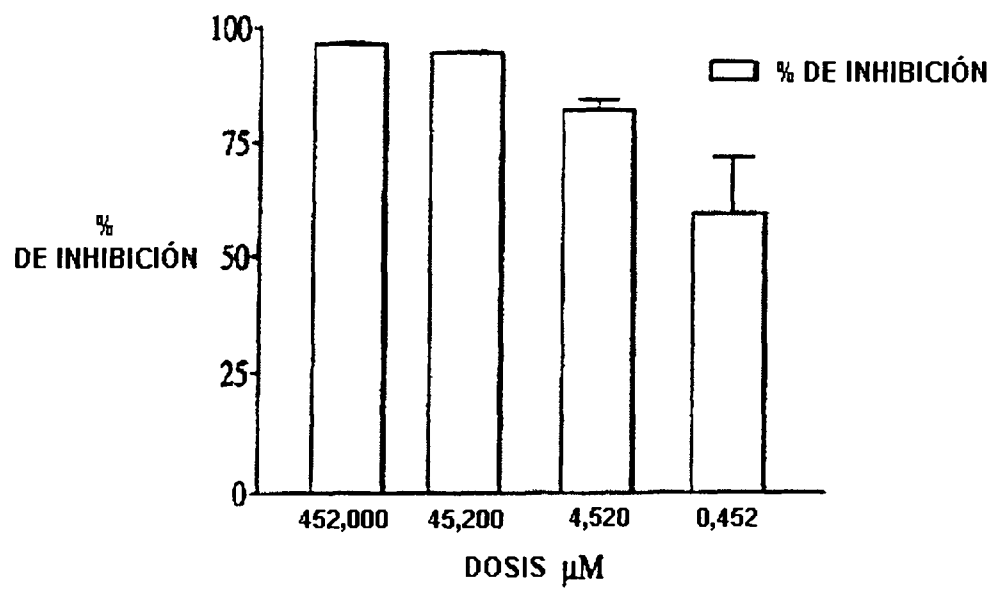


FIG. 16

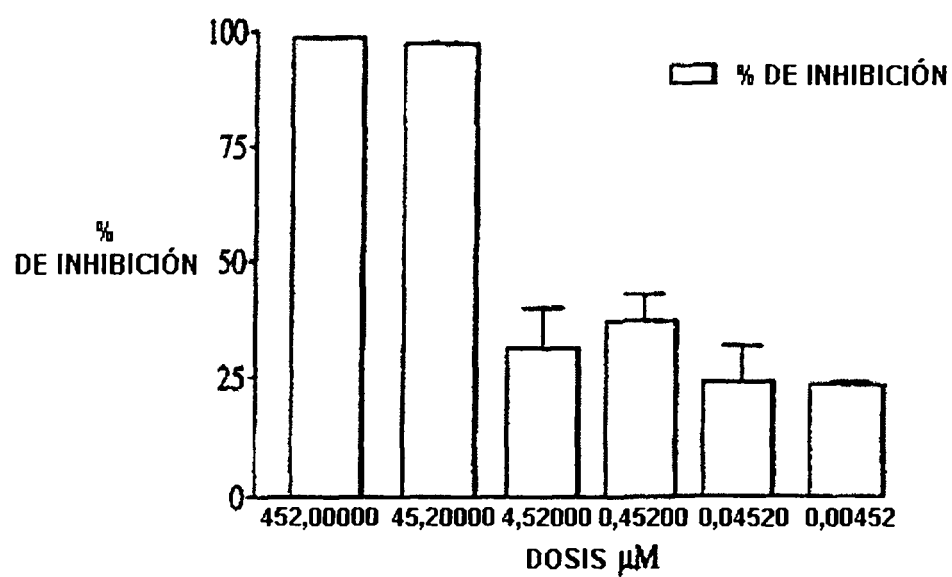


FIG. 17