

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 942**

21 Número de solicitud: 201631503

51 Int. Cl.:

A61K 31/7034 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

23.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.06.2018

Fecha de concesión:

02.04.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.04.2019

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070760

73 Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)

C/ Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y
SALUD (50.0%)

72 Inventor/es:

MORALES SÁNCHEZ, Juan Carlos;

PEÑALVER PUENTE, Pablo;

DÍAZ CORRALES, Francisco Javier;

VALDÉS SÁNCHEZ, María Lourdes;

GARCÍA DELGADO, Ana Belén y

MONTERO SÁNCHEZ, Adoración

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPUESTOS ACILADOS PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS OCULARES**

57 Resumen:

Compuestos acilados para el tratamiento de patologías oculares.

La presente invención se refiere al uso terapéutico de compuestos derivados piceido acilados en patologías oculares, en particular retinitis pigmentosa y en degeneración macular asociada a la edad, entre otras.

ES 2 673 942 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

Compuestos acilados para el tratamiento de patologías oculares

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere al uso terapéutico de derivados piceido acilados en patologías oculares, en particular en degeneración de la retina. Por tanto, la presente invención se puede englobar dentro del campo farmacéutico.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La retinosis pigmentaria (RP) y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) son una causa de ceguera en la población adulta debida a la degeneración de fotorreceptores y del epitelio pigmentario de la retina (EPR). La RP es una enfermedad rara, pero la prevalencia de la DMAE es bastante alta estimándose en un 8-16% de la población entre 50 y 64 años. A pesar de su alta prevalencia la variedad seca de la DMAE no tiene tratamiento al igual que la RP.

15

En la solicitud de patente WO2007020673A1 se describen compuestos derivados de hidroxiestilbenos glucosilados que podrían ser útiles para el tratamiento de algunas enfermedades oculares. Derivados piceido (3-glucosilresveratrol) acilados se han propuesto para el tratamiento de enfermedades de inflamación intestinal (ES2362065A1) y como antibióticos (Selma MV et al., *J. Agric. Food. Chem.* 2012, 60(30), 7367-74).

20

Sin embargo, en la actualidad no existen tratamientos efectivos que puedan evitar o enlentecer el proceso degenerativo de los fotorreceptores o del EPR en la DMAE seca ni en la RP. Por lo tanto, sería conveniente la búsqueda de nuevas moléculas útiles para el tratamiento o la prevención de estas y otras enfermedades oculares que cursen con degeneración de la retina.

25

30

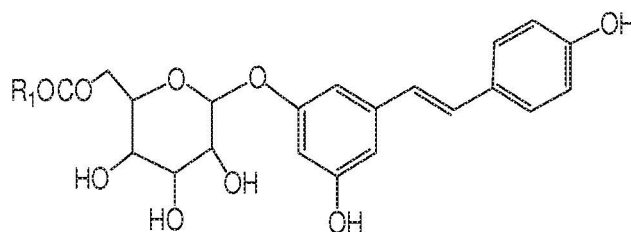
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos útiles para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de enfermedades oculares. Para ello, en los ejemplos se demuestra cómo algunos derivados acilados

35

de resveratrol inducen la protección de los fotorreceptores en dos modelos animales de degeneración retiniana.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula general (I)



(I)

o cualquiera de sus isómeros, o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones,

donde:

R₁ es un grupo alquilo (C₁-C₂₂) o un grupo alquenilo (C₂-C₂₂), preferiblemente R₁ es un grupo alquilo (C₁-C₂₂);

para la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de patologías oculares.

En una realización preferida, R₁ es un grupo alquilo (C₂-C₂₀), más preferiblemente es un grupo alquilo (C₃-C₁₇).

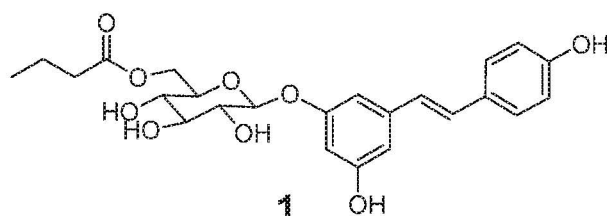
El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 2 y 20 átomos de carbono, y más preferiblemente tiene entre 3 y 17 átomos de carbono.

El término "alquenilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 22 átomos de carbono, y que poseen entre una y seis insaturaciones, dependiendo del número de carbonos, por

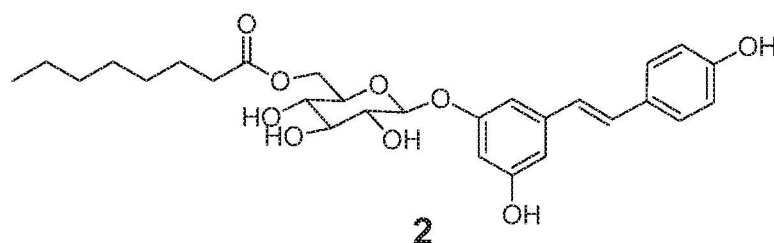
ejemplo, sin limitarse a vinilo, alilo, oleilo, linoleilo, linolenilo, eicosapentaenoilo, docosahexaenoilo, etc.

En una realización preferida, los compuestos de la invención se pueden seleccionar de entre:

5

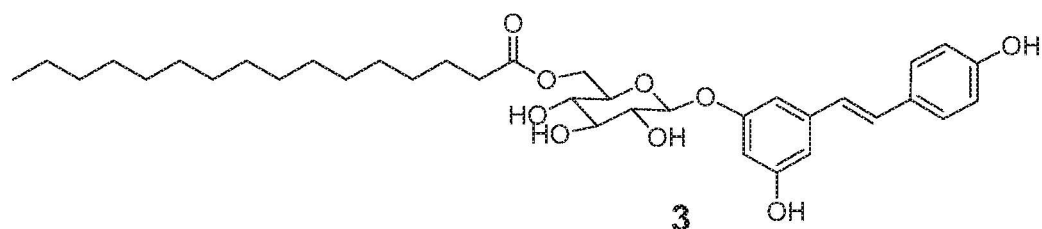


trans-resveratrol-3-O-(6'-O-butanoyl)-β-D-glucopiranosido (1),

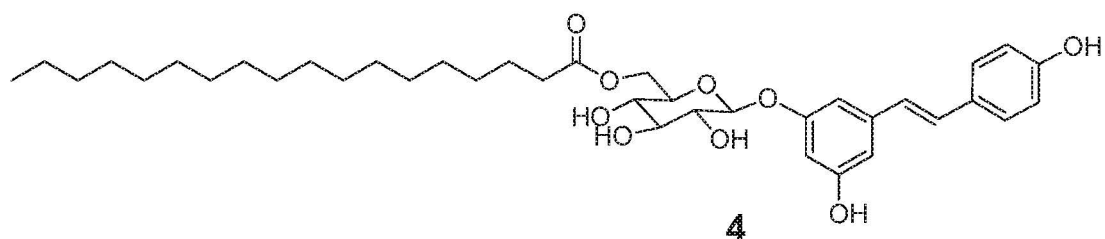


10

trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoyl)-β-D-glucopiranosido (2),



trans-resveratrol-3-O-(6'-O-hexadecanoyl)-β-D-glucopiranosido (3),



15

trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octadecanoyl)-β-D-glucopiranosido (4) y cualquiera de sus combinaciones.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanoesferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital (sub-retinal, intravítrea), intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión.

En una realización aún más preferida, la composición de la invención se encuentra formulada para su administración oftálmica. La expresión "formulada para su administración oftálmica" se refiere a una formulación que permita que la composición de la invención pueda ser administrada ocularmente, por ejemplo, aunque sin limitarnos, de manera tópica o de manera intraocular, sin que dicha administración afecte negativamente a las propiedades, por ejemplo ópticas y/o fisiológicas, del ojo.

Ejemplos de la composición de la invención formulada para su administración oftálmica son, aunque sin limitarnos, dicha composición asociada a agua, a sales, a un vehículo líquido polimérico o semi-sólido, a un tampón fosfato o a cualquier otro vehículo líquido oftálmicamente aceptable de los conocidos en el estado de la técnica.

En una realización preferida, la composición fármaceutica de la invención comprende un sistema de liberación controlada de los compuestos de la invención, más preferiblemente comprenden ciclodextrinas y aún más preferiblemente 2-hidroxipropil beta ciclodextrina.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición oftalmológica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se han descrito anteriormente junto con un sistema de liberación controlada, en particular una ciclodextrina, y más concretamente con 2-hidroxiopropil beta ciclodextrina.

5

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de patologías oculares en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de fórmula general (I) según descrita anteriormente.

10

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición (I), calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

15

20

Las patologías oculares de la presente invención se pueden seleccionar de:

25

1. Patologías hereditarias degenerativas de la retina englobadas la retinosis pigmentaria y todas aquellas patologías dentro del grupo de distrofias retinianas donde se incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse: retinosis pigmentaria autosómica dominante, retinosis pigmentaria autosómica recesiva, retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X, retinosis pigmentaria esporádica, retinosis pigmentaria asociada a otros síndromes, síndrome de Cokayne, distrofias de conos, degeneración de conos y bastones, amaurosis congénita de Leber, retinitis punctata albescens, coroideremia, atrofia girata de coroides y retina, distrofia coroidea generalizada, retinosquiasis juvenil, degeneración vitreo-retiniana de Wagner, vitreorretinocoroidopatía autosómica dominante, fundus albipunctatus, enfermedad de Stargardt, distrofia macular viletiforme de Best, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, distrofia macular fenestrada, distrofia macular pseudoinflamatoria de Sorsby, drusas dominantes, entre otras distrofias retinianas que cursen con degeneración de fotorreceptores y/o EPR.

30

35

2. Degeneración macular asociada a la edad exudativa (húmeda o neovascular) y/o no exudativa (seca o atrófica) temprana y/o tardía; así como también otras enfermedades maculares tales como: membrana epirretiniana, agujero macular y edema macular, etc.

3. Patologías inflamatorias degenerativas de la retina y del nervio óptico de origen infeccioso, inmune, vascular, traumático, post-quirúrgico o teratogénico como: toxoplasmosis ocular, criptococosis, lupus, enfermedad de Behcet, retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, neuritis óptica, desprendimiento de la retina, vitrectomía, pelado de membrana limitante interna, cirugía, retinoblastoma, etc.

4. Patologías oculares que incrementen la presión intra-ocular y que cursen con degeneración de las células ganglionares de la retina y atrofia del nervio óptico como: glaucoma de ángulo abierto o cerrado.

5. Patologías neurológicas que se acompañen de lesiones degenerativas de la retina o del nervio óptico tales como: esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Graefe, síndrome de Hallgren, síndrome de Hallen Vorden Spatz, ataxia cerebelosa autosómica dominante y degeneración pigmentaria de la retina.

6. Otras patologías oculares que cursen con inflamación de la córnea, coroides, cuerpo ciliar de cualquier etiología como: uveítis, esclerítis, queratoconjuntivitis, cirugía de trasplante de córnea, cirugía de cataratas.

7. Otras patologías oculares o neurodegenerativas que cursen con infiltración de microglías o acortamiento de los telómeros debidos al envejecimiento celular o estrés oxidativo.

En una realización preferida las patologías oculares se seleccionan entre retinitis pigmentosa y degeneración macular asociada a la edad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 . Viabilidad celular en neuroblastoma SH-SY5Y tras daño con H_2O_2 y tratamiento con los distintos compuestos 1-4. Los controles son $-H_2O_2$ = disolución 1% DMSO; $+H_2O_2$ = H_2O_2 en 1% DMSO; RES 10 μ M + H_2O_2 = resveratrol 10 μ M en H_2O_2 en 1% DMSO.

FIG. 2. Viabilidad celular en macrófagos RAW tras inflamación producida con LPS y tratamiento con los distintos compuestos **1-2**. Los controles son -LPS = disolución 1% DMSO; +LPS= disolución de 1% DMSO con LPS; RES 10 μ M+LPS = resveratrol 10 μ M en disolución 1% DMSO con LPS.

FIG. 3 Concentración de TNF-alfa en medio de cultivo tras inflamación por LPS en macrófagos RAW y tratamiento con compuesto **2** y el control **RES**. Los controles son LPS sólo= disolución 1% DMSO con LPS; DMSO sólo= disolución 1% DMSO.

FIG. 4 Concentración de NO en medio de cultivo tras inflamación por LPS en macrófagos RAW y tratamiento con compuesto **2** y el control **RES**. Los controles son LPS sólo= disolución 1% DMSO con LPS; DMSO sólo= disolución 1% DMSO.

FIG. 5 Concentración de IL6 en medio de cultivo tras inflamación por LPS en macrófagos RAW y tratamiento con compuesto **2** y el control **RES**. Los controles son LPS sólo= disolución 1% DMSO con LPS; DMSO sólo= disolución 1% DMSO.

FIG. 6 Actividad AChE respecto al control del compuesto **2** y el control **RES**.

FIG. 7 Fundus de ratón C57/bl6 normal (WT) (A), de ratón rd10 no tratado (B) e inyectado con 5 mM del compuesto **2** (C) a los 15 días después de realizar la administración de los compuestos vía sub-retiniana. Se observa la ausencia de pigmento en el fundus del ratón tratado con el compuesto **2**.

FIG. 8 Electrorretinograma de ratón c57/bl6 normal (WT), ratón rd10 no tratado, vehículo 5% DMSO, 5 mM resveratrol (RES) y 5 mM compuesto **2**, 15 días después de la inyección sub-retinal. La amplitud de las ondas a y b se preservó en el grupo tratado con el compuesto **2** en una mayor proporción que en los ratones rd10 sin tratar o tratados con RES o con vehículo 5% DMSO.

FIG. 9 Amplitud de la onda b en ratones rd10 no tratados, tratados con vehículo 5% DMSO, con 5 mM RES y con 5 mM del compuesto **2**, 15 días después de realizar las inyecciones sub-retinianas. Cada barra representa el promedio de la onda b en 6 ratones por cada grupo \pm el error estándar de la media. La amplitud de la onda b significativamente se incrementó en los ratones tratados con el compuesto **2** en el

ERG adaptado a la oscuridad con las intensidades de flash de 0,2, 1, 3 y 10 cd x s/m². El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía con post hoc DMS test **p*< 0,05; #*p*< 0,01.

5 **FIG. 10** Inmunofluorescencia de ratón c57/bl6 normal (WT) (A, G, M), ratón rd10 no tratado (B, H, N), o ratones rd10 tratados con vehículo (C, I, O), con RES 5 mM (D, J, P) y con 5 mM del compuesto **2** (F, L, R) 15 días después de realizadas las inyecciones sub-retinianas. Las secciones de la retina fueron inmuno-teñidas con anticuerpos anti-rodopsina (rojo) para marcar los bastones y anti-opsina (verde) para
10 marcar los conos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En todos los grupos tratados con activadores de SIRT1 se observó más marcaje de rodopsina y opsina que en grupo no tratado, pero la señal de este inmuno-marcaje fue más intensa en el grupo tratado con el compuesto **2**. Igualmente, el grosor de la capa nuclear externa (ONL) fue mayor que en el grupo tratado con RES.

15

FIG. 11 Fundus y autofluorescencia de la retina en ratones normales (WT control), ratones *Prpf31*^{A216P/+} sin tratar (KI control) y ratones *Prpf31*^{A216P/+} tratados con gotas oculares administradas diariamente por 2 meses y medio conteniendo 2 mM resveratrol (KI RES) ó 2 mM del compuesto **2** diluidos en un vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI **2**) ó solamente con el vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI CICLO). Como controles se utilizaron tanto ratones WT como KI los cuales no recibieron ningún tratamiento (WT control y KI control). Todos los grupos fueron sometidos a 5.000 lux por 3 h y las evaluaciones se
20 realizaron a los 15 días después de inducir el daño lumínico, durante este periodo de 2 semanas se siguieron administrando las gotas oculares. En los grupos KI control, KI CICLO y KI RES se observaron áreas con lesiones blanco-amarillentas puntiformes autofluorescentes (flechas) las cuales se ven claramente en la ampliación de la imagen en la fila inferior. Además, en estos ratones se observaron áreas de atrofia focal (puntas de flechas). Los fundus con este tipo de características fueron
25 considerados anormales. En la mayoría de los fundus de los grupos WT control y KI **2** no se observaron este tipo de lesiones y fueron catalogados como fundus normales.

30

FIG. 12 Grosor de la retina cuantificado a través de OCT en ratones normales (WT control), ratones *Prpf31*^{A216P/+} (KI control) y ratones *Prpf31*^{A216P/+} (KI) tratados con gotas oculares administradas diariamente por 2 meses y medio conteniendo 2 mM resveratrol (KI RES) ó 2 mM del compuesto **2** diluidos en un vehículo de 13%
35

hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI 2) ó solamente con el vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI CICLO). Como controles se utilizaron tanto ratones WT como KI los cuales no recibieron ningún tratamiento (WT control y KI control). Todos los grupos fueron sometidos a 5.000 lux por 3 h y las evaluaciones se realizaron a los 15 días después de inducir el daño lumínico, durante este periodo de 2 semanas se siguieron administrando las gotas oculares. Los mapas retinianos (A) muestran el grosor de la retina en 9 áreas concéntricas a 1, 2,22 y 3,45 mm y representado por una escala colorimétrica (B). Los datos se cuantificaron y se muestran en (C). Las barras representan promedios de grosor retiniano medido en μm +/- el error estándar (WT control n=5, resto de los grupos n=10). La normalidad de los datos fue confirmada por test de Kolmogorov-Smirnov ($P=0,98$), para determinar diferencias en las medias de los grupos se realizó ANOVA de una vía ($P<0,001$) y post hoc test de LSD. * $P<0,001$ KI control vs KI RES o KI control vs KI 2.

FIG. 13 Evaluación de la amplitud de la onda c en ratones normales (WT control), ratones *Prpf31*^{A216P/+}(KI control) y ratones *Prpf31*^{A216P/+}(KI) tratados con gotas oculares administradas diariamente por 2 meses y medio conteniendo 2 mM resveratrol (KI RES) ó 2 mM compuesto 2 diluidos en un vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI 2) ó solamente con el vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI CICLO). Como controles se utilizaron tanto ratones WT como KI los cuales no recibieron ningún tratamiento (WT control y KI control). Todos los grupos fueron sometidos a 5.000 lux por 3 h y las evaluaciones se realizaron a los 15 días después de inducir el daño lumínico, durante este periodo de 2 semanas se siguieron administrando las gotas oculares. La amplitud de la onda c fue medida por ERG (A) y luego se cuantifico tanto la amplitud de la onda b (B), así como también se estimó la ratio de onda c/b (C). Las barras representan promedios de la ratio onda c/b +/- el error estándar (WT control n=5, resto de los grupos n=10). La normalidad de los datos fue confirmada por test de Kolmogorov-Smirnov ($P=0,43$), para determinar diferencias en las medias de los grupos se realizó ANOVA de una vía ($P<0,05$) y post hoc test de LSD. * $P<0,01$ KI control vs KI 2.

FIG. 14 Test optomotor mostrando la curva de agudeza visual en ratones normales (WT control), ratones *Prpf31*^{A216P/+}(KI control) y ratones *Prpf31*^{A216P/+}(KI) tratados con gotas oculares administradas diariamente por 2 meses y medio conteniendo 2 mM resveratrol (KI RES) ó 2 mM compuesto 2 diluidos en un vehículo de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI 2) ó solamente con el vehículo de 13%

hidroxipropil-beta-ciclodextrina en PBS (KI CICLO). Como controles se utilizaron tanto ratones WT como KI los cuales no recibieron ningún tratamiento (WT control y KI control). Todos los grupos fueron sometidos a 5.000 lux por 3 h y las evaluaciones se realizaron a los 15 días después de inducir el daño lumínico, durante este periodo de 2 semanas se siguieron administrando las gotas oculares. Los datos del test optomotor se cuantificaron y se muestran en la gráfica. Cada punto representa promedios del número de respuestas positivas +/- el error estándar (WT control n=5, resto de los grupos n=10). La normalidad de los datos fue confirmada por test de Kolmogorov-Smirnov en todas las frecuencias espaciales a excepción de 0,031 y 0,061. Para determinar diferencias en las medias de los grupos se realizó ANOVA de dos vías relacionado tanto las diferentes frecuencias y los grupos ($P < 0,001$) y post hoc test de LSD. * $P < 0,05$ KI control vs KI RES o ** $P < 0,001$ KI control vs KI 2.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1. Ensayos *in vitro* de neuroprotección

Se cultivó la línea de neuroblastoma SH-SY5Y en placas petri pre-tratadas con colágeno (100 $\mu\text{g/ml}$) con medio F12 suplementado con penicilina/estreptomicina y un 10 % de suero bovino fetal inactivado.

Los ensayos de viabilidad celular con neuronas se hicieron en placas de 96 pocillos pre-tratadas con colágeno sembrando 20.000 células/pocillo en un volumen de 100 μL e incubando las células 24h antes de la adición de los compuestos. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO y se añadieron a tres concentraciones distintas (1, 10 y 100 μM) para determinar la toxicidad de los mismos. El porcentaje final de DMSO en cada pocillo se ajustó al 1%. La viabilidad celular se evaluó 24h después de la adición de los compuestos mediante el ensayo de MTT, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Los valores medios y las desviaciones estándares se calcularon a partir de al menos 8 medidas distintas de varios experimentos independientes.

Ensayos de neuroprotección. Las neuronas se cultivaron y sembraron de igual manera que para el ensayo de viabilidad celular. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO y se añadieron a tres concentraciones distintas (1, 10 y 100 μM) y tras una incubación de 10 minutos se añadió peróxido de hidrógeno (100 μM) al medio. El porcentaje final de DMSO en cada pocillo se ajustó al 1%. La viabilidad celular se evaluó 24h después de la adición de los compuestos mediante el ensayo de MTT, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Los valores medios y las desviaciones estándares se calcularon a partir de al menos 8 medidas distintas de varios experimentos independientes. La recuperación neuronal se calculó normalizando los resultados de los experimentos de viabilidad neuronal tras la adición de nuestros compuestos y de H_2O_2 a la del control positivo de cada experimento (neuronas + H_2O_2).

Se observa que el control de RES 10 μM recupera hasta un 50% de viabilidad celular (indicado por la flecha en la Fig. 1). En cambio, los derivados piceido acilados (1, 2, 3 y 4) recuperan entre un 70 y 200% de viabilidad a concentraciones entre 1 y 10 μM . Todos ellos a 100 μM parecen mostrar toxicidad.

Ejemplo 2. Ensayos *in vitro* de inflamación

Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados en P75 con DME α high glucose suplementado con Penicilina/Estreptomicina y un 10 % de suero bovino fetal inactivado.

Los ensayos de viabilidad celular con macrófagos RAW se hicieron en placas de 96 pocillos sembrando 25.000 células/pocillo en un volumen de 100 μL e incubando las células durante 4h antes de añadir los compuestos. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO y se añadieron a tres concentraciones distintas (1, 10 y 100 μM) para determinar la toxicidad de los mismos. El porcentaje final de DMSO en cada pocillo se ajustó al 1%. La viabilidad celular se evaluó 24h después de la adición de los compuestos mediante el ensayo de MTT, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Los valores medios y las desviaciones estándares se calcularon a partir de al menos 8 medidas distintas de varios experimentos independientes.

Ensayo de mitigación del daño ocasionado por adición de LPS. Los macrófagos RAW 264,7 se cultivaron de acuerdo al procedimiento arriba descrito. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO y se añadieron a tres concentraciones distintas (1, 10 y 100 μM) y tras una incubación de 10 minutos se añadió LPS (100 ng/mL) al medio. El porcentaje final de DMSO en cada pocillo se ajustó al 1%. La viabilidad celular se evaluó 24h después de la adición de los compuestos mediante el ensayo de MTT, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Los valores medios y las desviaciones estándares se calcularon a partir de al menos 8 medidas distintas de varios experimentos independientes.

10

Se observa que el control de RES 10 μM recupera hasta un 82% de viabilidad celular (indicado por la flecha en la Fig. 2). El compuesto 2 recupera entre un 80 y 140% de viabilidad a concentraciones entre 1 y 100 μM .

15

Ejemplo 3. Medidas de parámetros de inflamación (citoquinas) en ensayo con LPS.

20

Para determinar la producción de citoquinas se sembraron 5×10^5 macrófagos RAW 264,7 en placas de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo). Se añadieron entonces los compuestos a ensayar (10 μM) y se estimuló o no a los macrófagos mediante adición de LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) al medio de cultivo. Pasadas 24 horas se midieron los niveles de IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes mediante ELISA usando los anticuerpos de captura y biotinilados de BD PharMingen y PreproTech (Gonzalez-Rey et al., Gut. 2009; 58:929–939; Sánchez et al., Stem Cells. 2011; 29:251–262). Los niveles de NO en los sobrenadantes a 24 horas se midieron de manera indirecta mediante la determinación de la concentración de nitrito en el medio usando el reactivo de Griess (Anderson et al., Gut. 2013; 62:1131–1141). Se realizaron un mínimo de dos experimentos independientes y tres réplicas por experimento para cada valor medido. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar.

25

30

En el ensayo anterior se midieron los niveles de varios parámetros de inflamación (TNF- α , NO e IL-6) mediante ELISA después del tratamiento con RES o con el compuesto 2 (Fig. 3, 4 y 5).

Se observa que el control de RES 10 μ M disminuye considerablemente los parámetros inflamatorios (TNF- α , NO e IL-6) (indicado por la barra en negrita). El compuesto **2** disminuye TNF- α y NO aún más que RES y de manera similar IL-6.

5 Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de varios compuestos sililados en un modelo de neurodegeneración en larva de pez cebra inducido por pentilentetrazol (PTZ).

10 El objetivo de este ensayo fue analizar el efecto protector del compuesto **2** y del control resveratrol (RES) en un modelo de neurotoxicidad inducida por la neurotoxina pentilentetrazol (PTZ). Como modelo experimental se utilizó la larva de pez cebra (Danio rerio) estudiando el efecto de los compuestos sobre la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en larvas de 5 días post-fertilización (dpf).

15 Los estudios del sistema nervioso central (SNC) en el pez cebra (Kimmel et al., Dev Dyn. 1995 Jul;203(3):253-310.), muestran que a las 24 horas de desarrollo el embrión ya tiene el cerebro segmentado y algunas estructuras como el tubo neural, la notocorda y las somitas (músculo y precursores de los huesos). A los 5 días post-fertilización (5 dpf), el animal tiene los órganos sensoriales formados como los ojos y
20 los otolitos. Además, el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, así como los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son completamente funcionales. A este tiempo, el animal es capaz de responder a estímulos visuales, olfatorios y mecánicos y comienza la búsqueda de alimento.

25 La AChE es una enzima que degrada a través de su actividad hidrolítica el neurotransmisor acetilcolina en colina y un grupo acetato. Se encuentra principalmente en las uniones neuromusculares y en el sistema nervioso colinérgico, donde su actividad sirve para terminar la transmisión sináptica (Behra eta al, Nat Neurosci. 2002 Feb; 5(2): 111-8.). La acetilcolina es un neurotransmisor implicado en
30 el control del movimiento y un importante modulador de las funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la memoria (Hasselmo et al, Neuropsychopharmacology. 2011 Jan; 36(1): 52-73). Por lo tanto, los niveles adecuados de la acetilcolinesterasa reflejan un estado neuronal saludable.

Los embriones de pez cebra fueron sembrados en 50 mL de agua de dilución (AD) en una placa Petri y crecidos hasta 5 dpf (estado larvario). Para la realización del ensayo, fueron utilizadas únicamente aquellas larvas que no presentaron ningún tipo de anomalía externa. Seguidamente, mediante el uso de una pipeta Pasteur, se transfirieron las larvas a una microplaca de 24 pocillos, de modo que cada pocillo contuviera cinco larvas realizándose diez réplicas por condición. En primer lugar, se realizó el pretratamiento de las larvas de 5 dpf. Para ello, las larvas fueron incubadas en un volumen de 2 mL de AD para los dos grupos Control (Control y Control + PTZ), de fisostigmina 20 μM (Phys, del término en inglés Physostigmine) que es un inhibidor comercial de la enzima AChE para el grupo Phys, y de los compuestos de ensayo a concentración 10 μM a 26 ± 1 °C durante 1 hora. Posteriormente, se realizó un recambio del medio y se incubaron las larvas con los compuestos en combinación con con PTZ 5 mM durante 6 horas a 26 ± 1 °C. Transcurrido este tiempo de incubación, se examinaron todas las larvas y se determinó que el estado general de las larvas era totalmente normal, sin ningún tipo de anomalía visible o comportamiento anómalo. Finalmente, las larvas fueron procesadas para el análisis de la actividad AChE.

Determinación de los niveles de AChE. Una vez finalizado el periodo experimental, se llevó a cabo el procesamiento de las larvas para la determinación de AChE según el protocolo técnico de estudio (*Medida de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en cultivos celulares y larvas de pez cebra*). Las larvas fueron homogenizadas mecánicamente y las muestras se centrifugaron para la obtención del sobrenadante, los cuales fueron utilizados para la determinación de los niveles de la enzima AChE en función de los tratamientos administrados. Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de proteína total de cada grupo experimental según el protocolo técnico de estudio (*Cuantificación de proteína por BCA, como proceso de normalización*). Finalmente, se tomaron como medida de referencia los niveles de AChE determinados en el grupo control, considerándolos como el 100%.

El compuesto **2** previene de manera significativa la disminución de la actividad AChE inducida por el PTZ en las larvas 5dpf, mostrando un claro efecto neuroprotector y que es superior al observado para RES (ver Fig. 6).

Ejemplo 5.- Ensayo de toxicidad en pez cebra.

Se realizó la incubación de 20 embriones de pez cebra para cada concentración de compuesto a ensayar (1 a 4). Las concentraciones usadas de cada compuesto son de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 1 mM. El tiempo de incubación va desde las 0 a las 96 horas post fertilización (hpf). Se incluyen un control negativo de 1% DMSO y un control positivo de N,N-dietilaminobenzaldehído (DEAB). Pasado el tiempo de incubación se calcula la LC50 (dosis letal para el 50% de los animales).

El ensayo de toxicidad en embrión de pez cebra se llevó a cabo para el compuesto 2 y el control resveratrol (RES) y ambos mostraron una toxicidad aceptable (LC50 <140 μ M) y (LC50 <1000 μ M), respectivamente.

Ejemplo 6. Ensayos en ratones rd10 modelo de degeneración de retina.

El ratón rd10 es un modelo de retinosis pigmentaria debido a una mutación en el gen *Pde6b* que conlleva a la degeneración de los fotorreceptores que se inicia al día post-natal 15-16 (P15-16) y se completa en el lapso de un mes (P30). En este modelo la degeneración comienza en los bastones y luego continúa con conos y finalmente el epitelio pigmentario de la retina (RPE). La degeneración en este modelo ocurre como consecuencia de la pérdida de la función de *Pde6b*, lo que finalmente conduce a una entrada continua de Ca^{++} en los bastones con una importante producción de radicales libres de oxígeno (ROS), infiltración de macrófagos y activación de proteínas pro-apoptóticas. A nivel histológico se evidencia una pérdida de núcleos en la capa nuclear externa de la retina (capa donde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores) y además por la pérdida de los marcadores específicos de bastones (rodopsina) y conos (opsina). El electroretinograma (ERG) que mide la respuesta eléctrica de la retina ante estímulos visuales, se ve marcadamente afectada en los ratones rd10 con pérdida progresiva de la amplitud de las ondas a y b del ERG. Finalmente, el fundus que evalúa la morfología macroscópica del fondo del ojo muestra cambios al mes de edad en los ratones rd10 con acumulación de pigmentos oscuros en la periferia debido a la degeneración del RPE. Para evaluar el efecto protector en la retina de nuestros compuestos utilizamos primero el modelo rd10. Ratones homocigotos rd10 fueron inyectados en el espacio sub-retiniano a P13 (dos a tres días antes de que se inicie la degeneración) con 1 μ L de vehículo (5% DMSO en PBS) o los compuestos resveratrol RES (5 mM), y el compuesto 2 (5 mM). Luego a los

15 días de haber sido inyectados se evaluó el fundus, ERG y cambios histológicos en los ratones no tratados, tratados con el vehículo o con los compuestos RES y **2**. La evaluación del fundus mostró una menor cantidad de acumulación de pigmento en las retinas de ratones tratados con el compuesto **2** en comparación con los ratones no tratados (Fig. 7). El ERG en los ratones tratados fue igualmente evaluado 15 días después de realizar las inyecciones. La amplitud de las ondas a y b se cuantificaron en los ERGs, y el análisis estadístico se realizó mediante Two-way ANOVA y post hoc DMS. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. La amplitud de onda b en el ERG de ratones adaptados a la oscuridad (intensidades de flash de 0,2, 1, 3 y 10 x cd s / m²) sufrió un aumento significativo en el grupo de ratones tratados con el compuesto **2** en comparación con los controles (Fig. 8 y 9). Finalmente se realizó el estudio de inmunofluorescencia para observar la presencia de marcadores de bastones (rodopsina) y de conos (opsina) (Fig. 10). El número de núcleos de fotorreceptores presentes en la capa nuclear externa (ONL), al igual que la inmunotinción de rodopsina fue mucho mayor en los ratones rd10 tratados con el compuesto **2** que en los tratados con RES y que en los controles.

Ejemplo 7.- Ensayos en ratones *Prpf31* (modelo de degeneración del RPE).

Los ratones *Prpf31*^{A216P/+} son un modelo útil para valorar la degeneración del RPE. Este modelo se caracteriza por un incremento en el grosor de la membrana de Bruch y acumulación de colesterol esterificado entre dicha membrana y el RPE producido por defecto en el empalme del ARNm de genes relevantes del ciclo visual como *RPE65* y *RDH12*. La acumulación de productos tóxicos derivados del retinol conlleva a un aumento de ROS, infiltración de macrófagos y degeneración primaria del RPE. La degeneración del RPE se presenta en forma tardía aproximadamente a los 8 meses de edad. Las características fenotípicas de este modelo pueden ser exacerbadas por la exposición a una funeste de luz intensa y se caracterizan principalmente por acumulo de lesiones pseudo-drusenoides y áreas de atrofia que se observan en el fundus, además presentan pérdida de la agudeza visual y de la percepción de contraste, existe disminución en la amplitud de la onda c del ERG y disminución del grosor de la retina.

Para evaluar el efecto protector de la administración en gotas oculares de nuestros compuestos utilizamos ratones heterocigotos *Prpf31*^{A216P/+} (KI) de 6 meses de edad, los cuales fueron tratados tópicamente con 20 µL de los compuestos estudiados

aplicados directamente sobre la superficie corneal diariamente (L-V) durante 2 meses y medio. Los compuestos utilizados fueron RES y el compuesto 2, los cuales se diluyeron en una solución de 13% hidroxipropil-beta-ciclodextrina (CICLO) para obtener una concentración final de 2 mM de cada compuesto. Después de los 2 meses y medio de aplicación de las gotas oculares con CICLO, RES o el compuesto 2 los ratones mutantes KI fueron expuestos a una fuente de luz de 5.000 lux durante 3 horas. Ratones normales (WT) y KI sin recibir ningún tratamiento también fueron expuestos a la luz intensa como control de la prueba. Posteriormente el fundus de los animales fue evaluado, además de la agudeza visual a través del test optomotor, grosor de la retina por tomografía de coherencia óptica (OCT) y amplitud de la onda c por ERG.

Evaluación del fundus:

Para la cuantificación de las características macroscópicas del fundus se utilizaron dos categorías: fundus anormal y normal. Los fundus catalogados como anormales fueron aquellos donde se observó la presencia de lesiones pseudo-drusenoides autofluorescentes (Fig. 11; flechas) o con áreas de atrofia focal (Fig. 11; puntas de flecha). El porcentaje de fundus anormales en los ratones WT expuestos a la luz (WT control) fue 20% y en los KI no tratados (KI control) fue 90%. Mientras que este porcentaje se redujo a un 30% en los ratones tratados con el compuesto 2 (KI 2) y tan solo en un 60% tanto en los ratones tratados con CICLO (KI CICLO) como RES (KI RES) (Tabla 1). Al realizar el análisis estadístico para cada variable dicotómica pudimos observar que existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de fundus normales y los ratones tratados con el compuesto 2 al compararlos con el grupo KI control (Chi-cuadrado = 7,5; $P < 0,01$; Test exacto de Fisher $P < 0,05$) y con una probabilidad 7 veces mayor de obtener un fundus normal en el grupo tratado con el compuesto 2 que en el KI control (RR normal= 7; IC95%= 1,044-46,949). Estos valores fueron similares a los observados al comparar el WT control y KI control (Chi-cuadrado = 7,35; $P < 0,01$; Test exacto de Fisher $P < 0,05$) y con una probabilidad 8 veces mayor de obtener un fundus normal en el grupo WT control que en el KI control (RR normal= 8; IC95%= 1,184-54,043). Tanto en el grupo tratado con CICLO como RES no se observaron ninguna asociación estadísticamente significativa al comparar cada uno con el grupo KI control. La conclusión de este experimento es que el tratamiento con el compuesto 2 evitó la formación de lesiones pseudo-drusenoides autofluorescentes y áreas de atrofia focal en el ratón *Prpf31^{A216P/+}*.

Tabla 1. Cuantificación del número de fundus anormales y normales en ratones WT y *Prpf31^{A216P/+}* (KI) sin tratamiento o tratados con 13% CICLO, RES y el compuesto **2**.

Fundus/Grupos	Anormal (%)	Normal (%)	Total
WT control	1 (20)	4 (80) [#]	5
KI control	9 (90)	1 (10)	10
KI CICLO	6 (60)	4 (40)	10
KI RES	6 (60)	4 (40)	10
KI 2	3 (30)	7 (70) [*]	10
Total (%)	25 (55,6)	20 (44,4)	45

*KI **2** vs KI control (Chi-cuadrado = 7,5; $P < 0,01$; Test exacto de Fisher $P < 0,05$; RR normal= 7; IC95%= 1,044-46,949). [#]WT control vs KI control (Chi-cuadrado = 7,35; $P < 0,01$; Test exacto de Fisher $P < 0,05$; RR normal= 8; IC95%= 1,184-54,043).

Grosor de la retina:

Para evaluar el grosor de la retina in vivo se utilizó un OCT Stratus (Zeiss) con un escáner ajustado a 6 líneas de 3,45 mm cada una dispuestas en forma radial. Se realizaron 6 medidas en cada ojo y luego se procedió a realizar el mapa retiniano (Fig. 12) con el grosor de la retina cuantificado desde la capa de células ganglionares hasta el RPE. El grosor de la retina fue significativamente mayor en los grupos tratados con RES y el compuesto **2** cuando se comparan con el grupo KI control (Fig. 12; C), estos resultados muestran que el tratamiento con los activadores de SIRT1 evitaron la producción de atrofia de la retina en los ratones KI después de la exposición a una fuente de luz intensa.

Evaluación de la función del RPE:

Para evaluar la integridad funcional del RPE se midió la amplitud de la onda c en el ERG. La onda c se define como una onda lenta positiva que aparece después de la onda b y sirve para medir la integridad funcional del RPE. Como la amplitud de esta onda se puede ver afectada por la integridad de los fotorreceptores, para su mejor valoración es conveniente normalizar los resultados con la amplitud de la onda b, por ello se realizó la cuantificación de la proporción de la amplitud onda c entre la amplitud

de la onda b (ratio onda c/b) (Fig. 13). La ratio onda c/b fue significativamente mayor en el grupo tratado con el compuesto **2** lo que sugiere que se mantuvo la integridad funcional del RPE en este grupo.

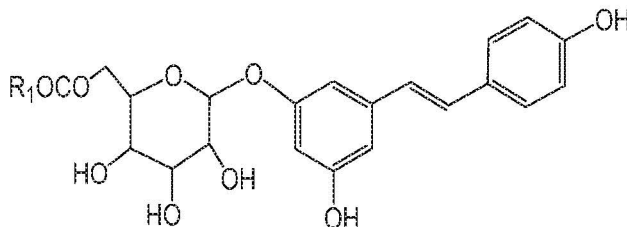
5 Agudeza visual:

Finalmente, para valorar la agudeza visual se realizó el test optomotor el cual consiste en la evaluación del reflejo optocinético de seguimiento visual que se estimula por el movimiento rotatorio de diferentes barras horizontales seriadas negras y blancas. La respuesta a dicho estímulo visual se manifiesta por un movimiento de seguimiento cervical en el mismo sentido de la rotación de las barras. El movimiento cervical se registra con una cámara y la frecuencia espacial de las barras varía aleatoriamente al igual que la dirección del giro de las barras. El test optomotor fue evaluado a 6 diferentes frecuencias espaciales (0,031, 0,061, 0,092, 0,103, 0,194 y 0,272 ciclos/grado) y la visión espacial fue medida por el número de respuestas positivas. En el grupo tratado con el compuesto **2** el número de respuestas positivas fue significativamente mayor que en los grupos KI control en la mayoría de las frecuencias estudiadas (0,092, 0,103, 0,194 y 0,272 ciclos/grado) y KI RES solo fue significativo a 0,194 ciclos/grado (Fig. 14).

20 En conclusión, en los experimentos descritos en los ejemplos 6 y 7 hemos demostrado que el activador de SIRT1 (compuesto **2**) tiene un efecto protector en la retina de los ratones rd10 y *Prpf31*^{A216P/+}. Este efecto retino-protector sugiere que esta molécula pudiera ser potencialmente útil para el tratamiento de RP y otras patologías degenerativas de la retina y el EPR donde se produzcan ROS, inflamación y apoptosis como en la DMAE.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I)



5

(I)

o cualquiera de sus isómeros, de sus sales, ésteres, tautómeros, polimorfos, o hidratos farmacéuticamente aceptables, donde:

R₁ es un grupo alquilo (C₁-C₂₂) o un grupo alquenoilo (C₂-C₂₂),

10

para la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de patologías oculares.

2. Uso según la reivindicación 1, donde R₁ es un grupo alquilo (C₂-C₂₀).

15

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde los compuestos se seleccionan de entre: trans-resveratrol-3-O-(6'-O-butaniloil)-β-D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoil)-β-D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3-O-(6'-O-hexadecanoil)-β-D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octadecanoil)-β-D-glucopiranosido y cualquiera de sus combinaciones.

20

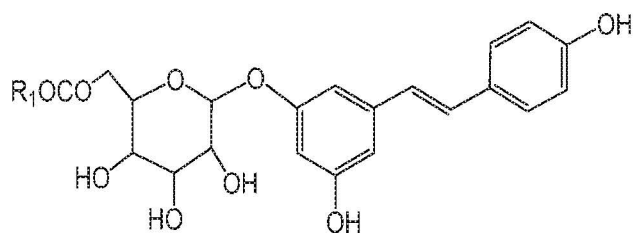
4. Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto es trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoil)-β-D-glucopiranosido.

25

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las patologías oculares son patologías hereditarias degenerativas de la retina seleccionada entre la retinosis pigmentaria y las patologías englobadas dentro del grupo de distrofias retinianas seleccionada de entre retinosis pigmentaria autosómica dominante, retinosis pigmentaria autosómica recesiva, retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X, retinosis pigmentaria esporádica, retinosis pigmentaria asociada a otros síndromes, síndrome de Cokayne, distrofias de conos, degeneración de conos y bastones, amaurosis congénita de Leber, retinitis punctata albescens,

30

- 5 coroideremia, atrofia girata de coroides y retina, distrofia coroidea generalizada, retinosquiasis juvenil, degeneración vítreo-retiniana de Wagner, vitreorretinocoroidopatía autosómica dominante, fundus albipunctatus, enfermedad de Stargardt, distrofia macular vilitiforme de Best, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, distrofia macular fenestrada, distrofia macular pseudoinflamatoria de Sorsby y drusas dominantes.
- 10 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las patologías oculares son degeneración macular asociada a la edad.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las patologías oculares son patologías inflamatorias degenerativas de la retina y del nervio óptico.
- 15 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las patologías oculares son patologías oculares que incrementen la presión intra-ocular y que cursen con degeneración de las células ganglionares de la retina y atrofia del nervio óptico seleccionadas entre glaucoma de ángulo abierto y cerrado.
- 20 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las patologías oculares son patologías neurológicas que se acompañen de lesiones degenerativas de la retina o del nervio óptico seleccionadas entre esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Graefe, síndrome de Hallgren, síndrome de Hallen Vorden Spatz y ataxia cerebelosa autosómica dominante y degeneración pigmentaria de la retina.
- 25 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición farmacéutica además comprende un sistema de liberación controlada.
- 30 11. Uso según la reivindicación 10, donde sistema de liberación controlada es una ciclodextrina.
12. Uso según la reivindicación 11, donde la ciclodextrina es 2-hidroxipropil β -ciclodextrina.
- 35 13. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus isómeros, de sus sales, ésteres, tautómeros, polimorfos o hidratos farmacéuticamente aceptables,

5 donde: R_1 es un grupo alquilo (C_1 - C_{22}) o un grupo alquenilo (C_2 - C_{22});
y una ciclodextrina.

14. Composición según la reivindicación 13, donde el compuesto de fórmula (I) se
selecciona de entre trans-resveratrol-3-O-(6'-O-butanoil)- β -D-glucopiranosido,
10 trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoil)- β -D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3-O-(6'-
O-hexadecanoil)- β -D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octadecanoil)- β -
D-glucopiranosido y cualquiera de sus combinaciones.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde la
15 ciclodextrina es 2-hidroxiopropil β -ciclodextrina.

FIG. 1

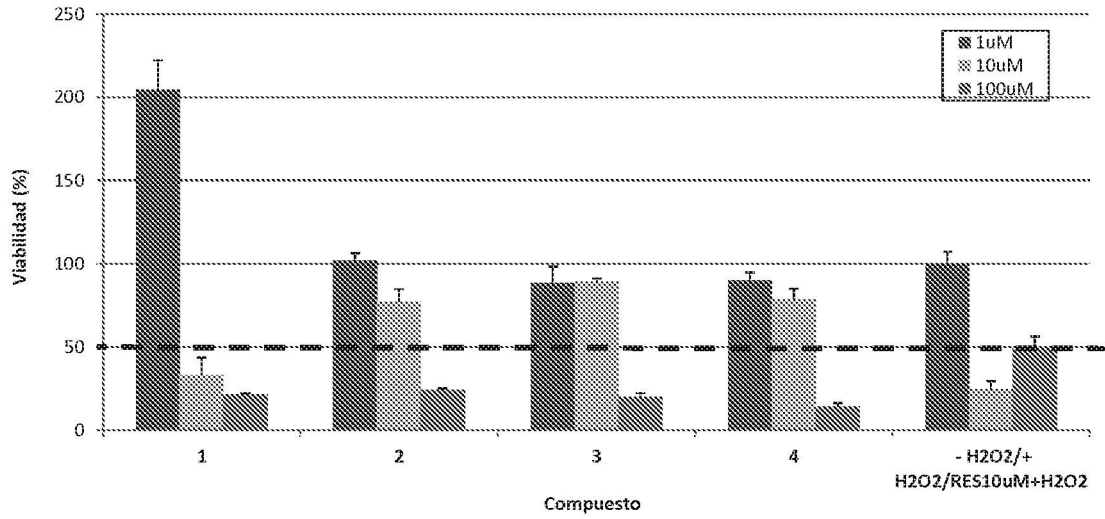


FIG. 2

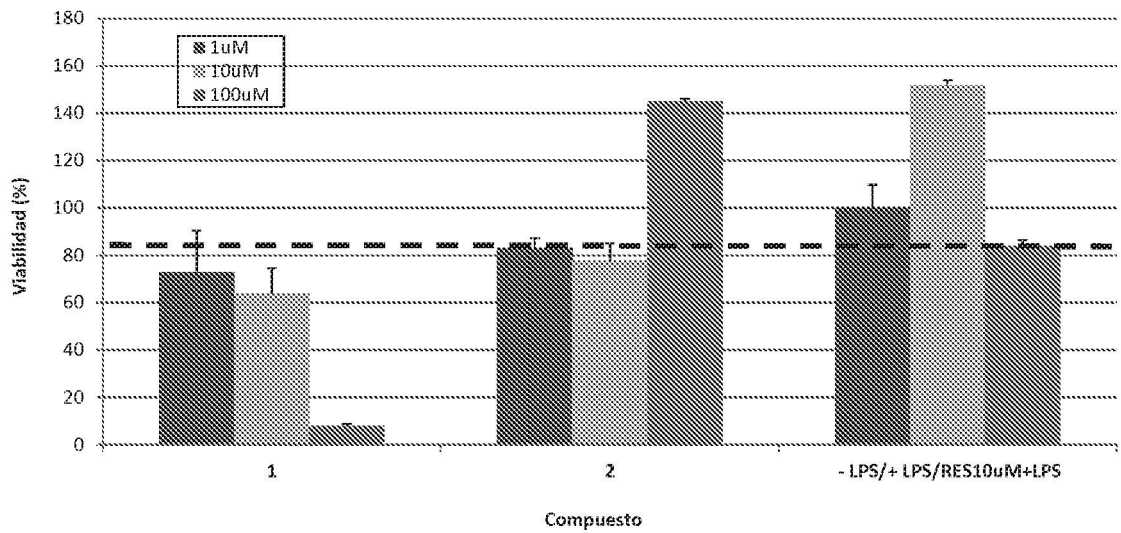


FIG. 3

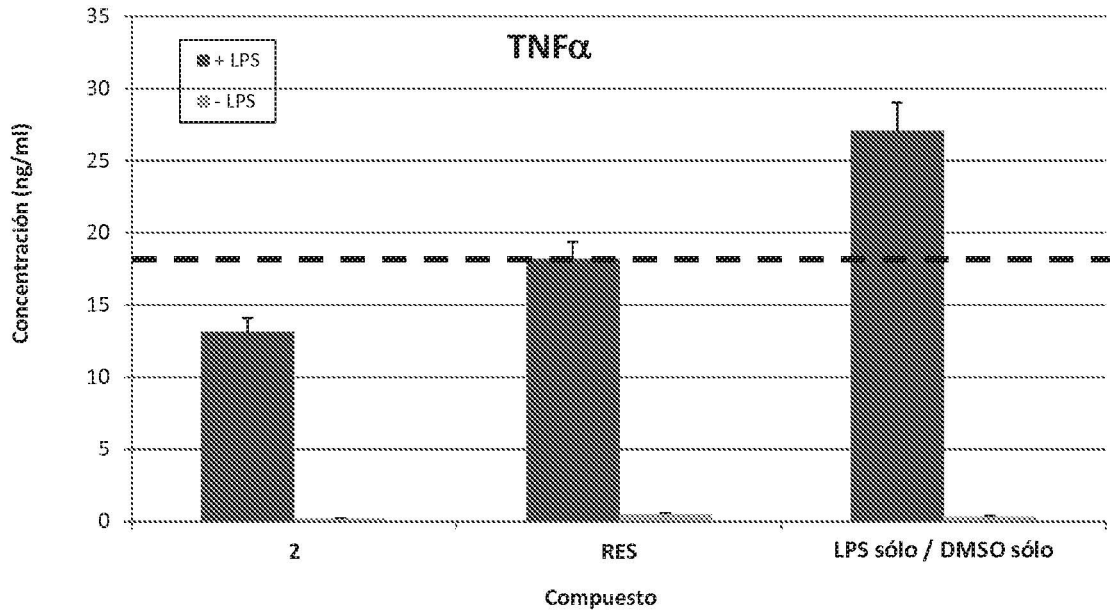


FIG. 4

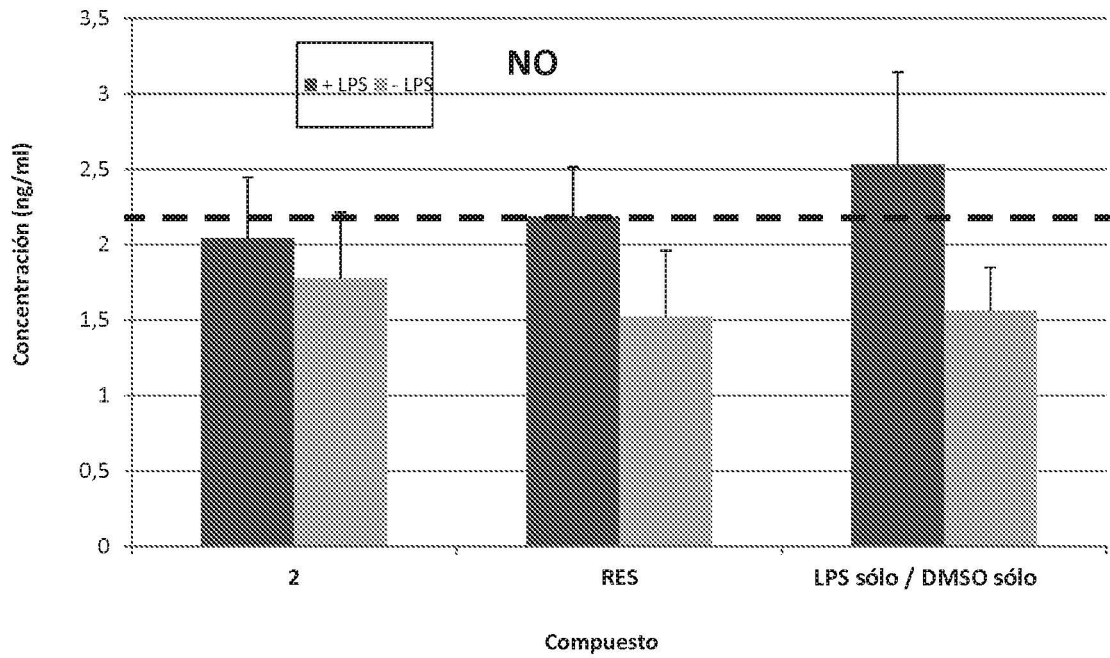


FIG. 5

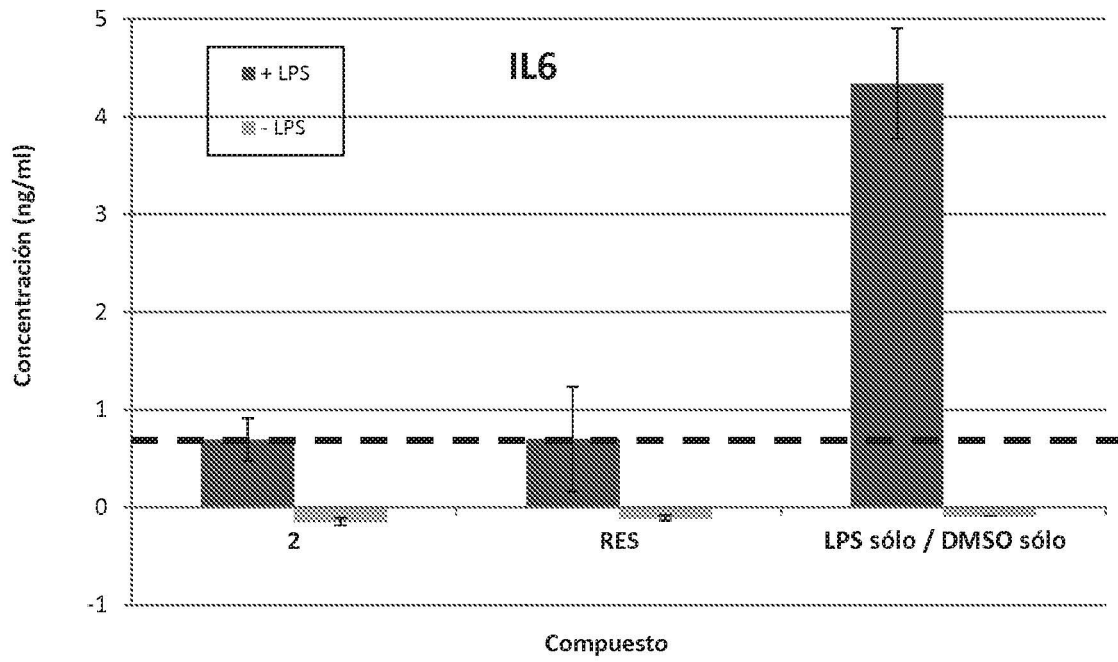


FIG. 6

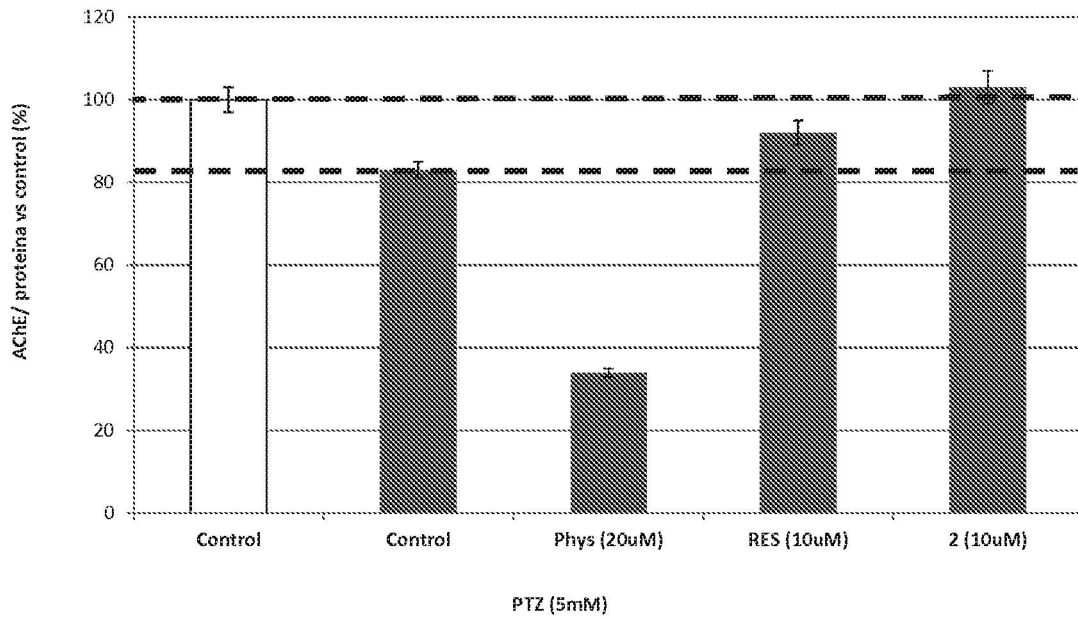


FIG. 7

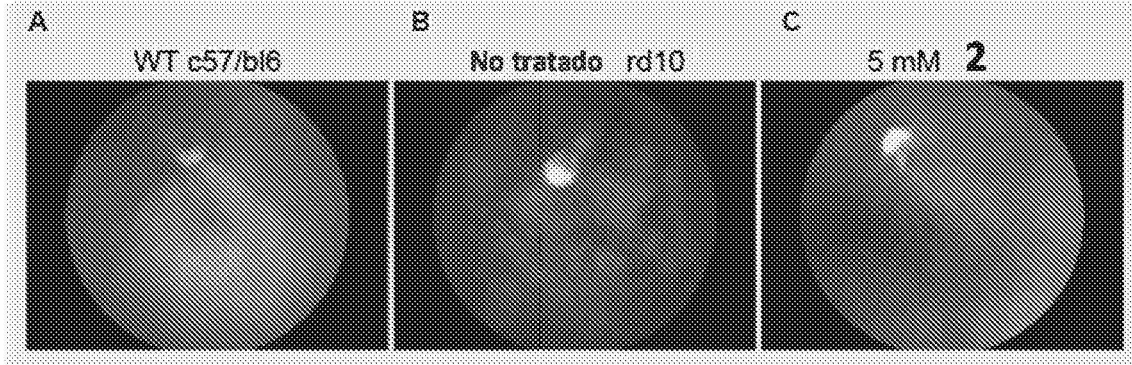


FIG. 8

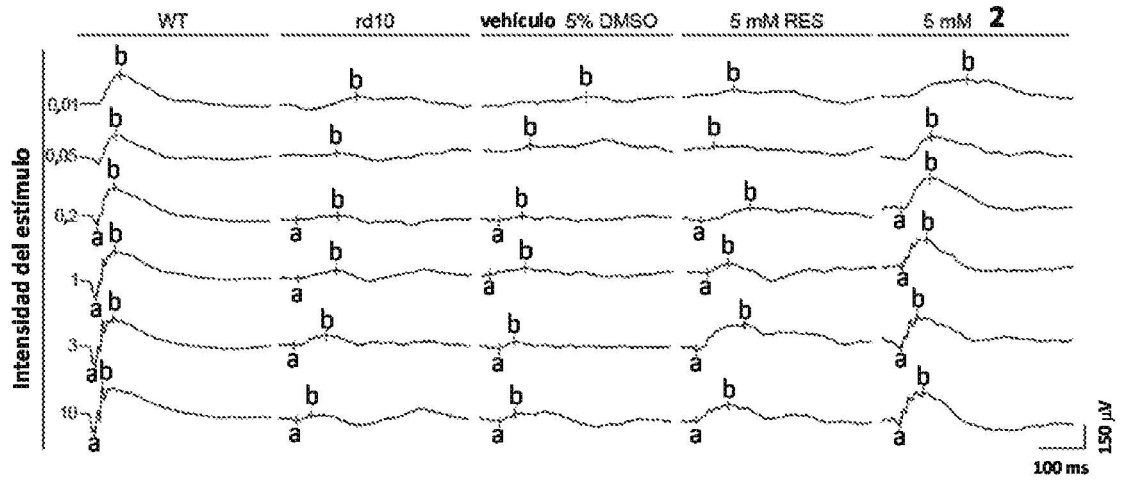


FIG. 9

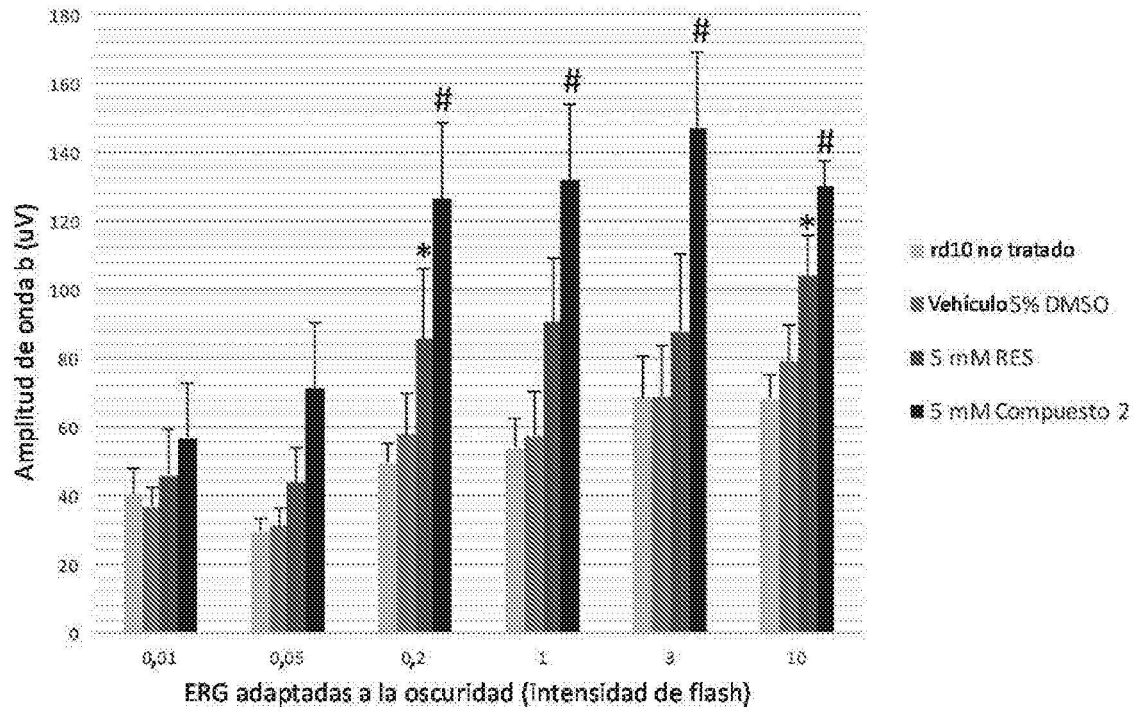


FIG. 10

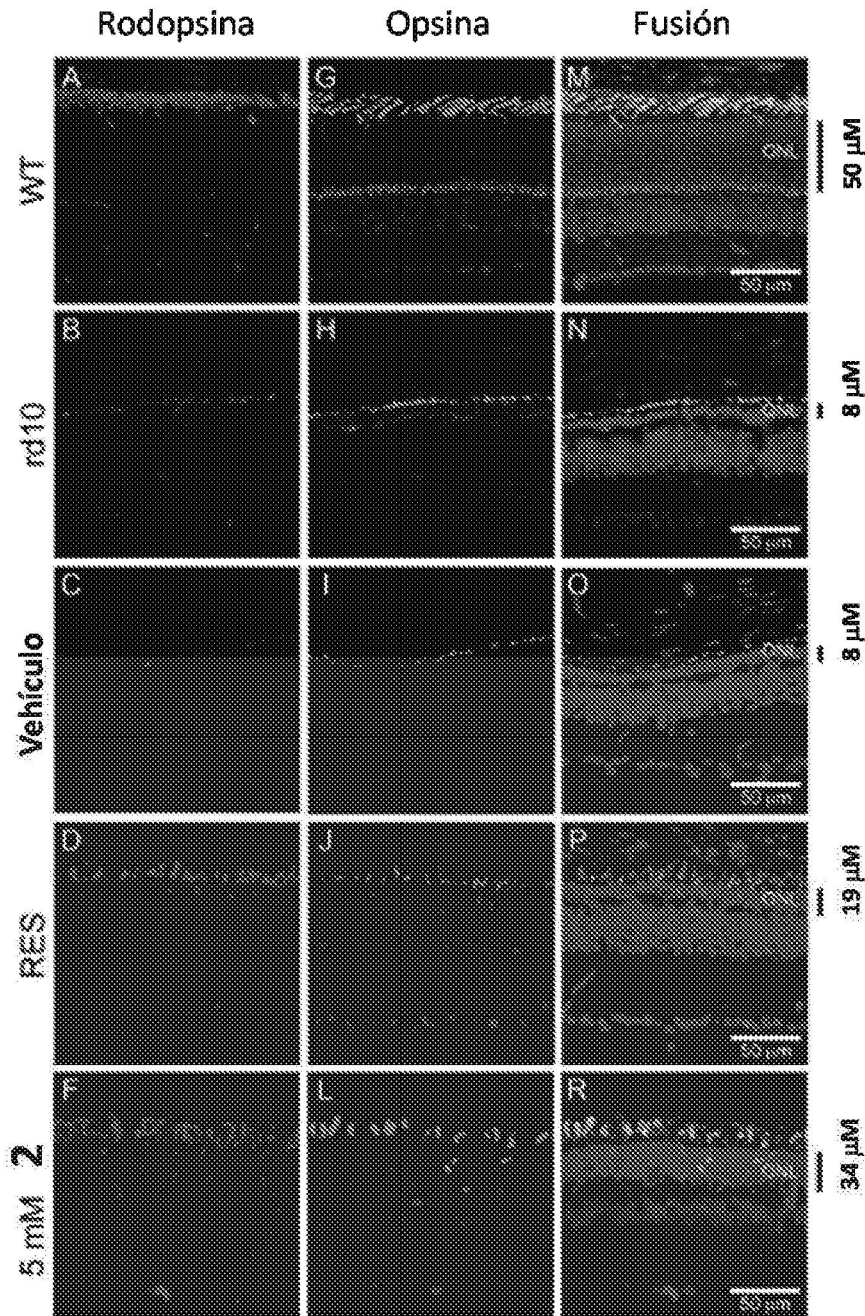


FIG. 11

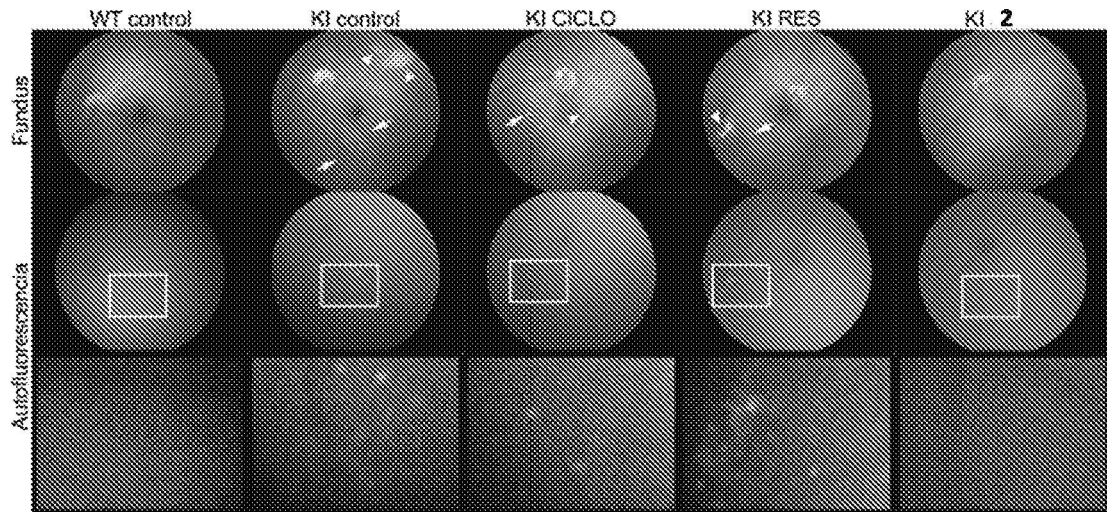


FIG. 12

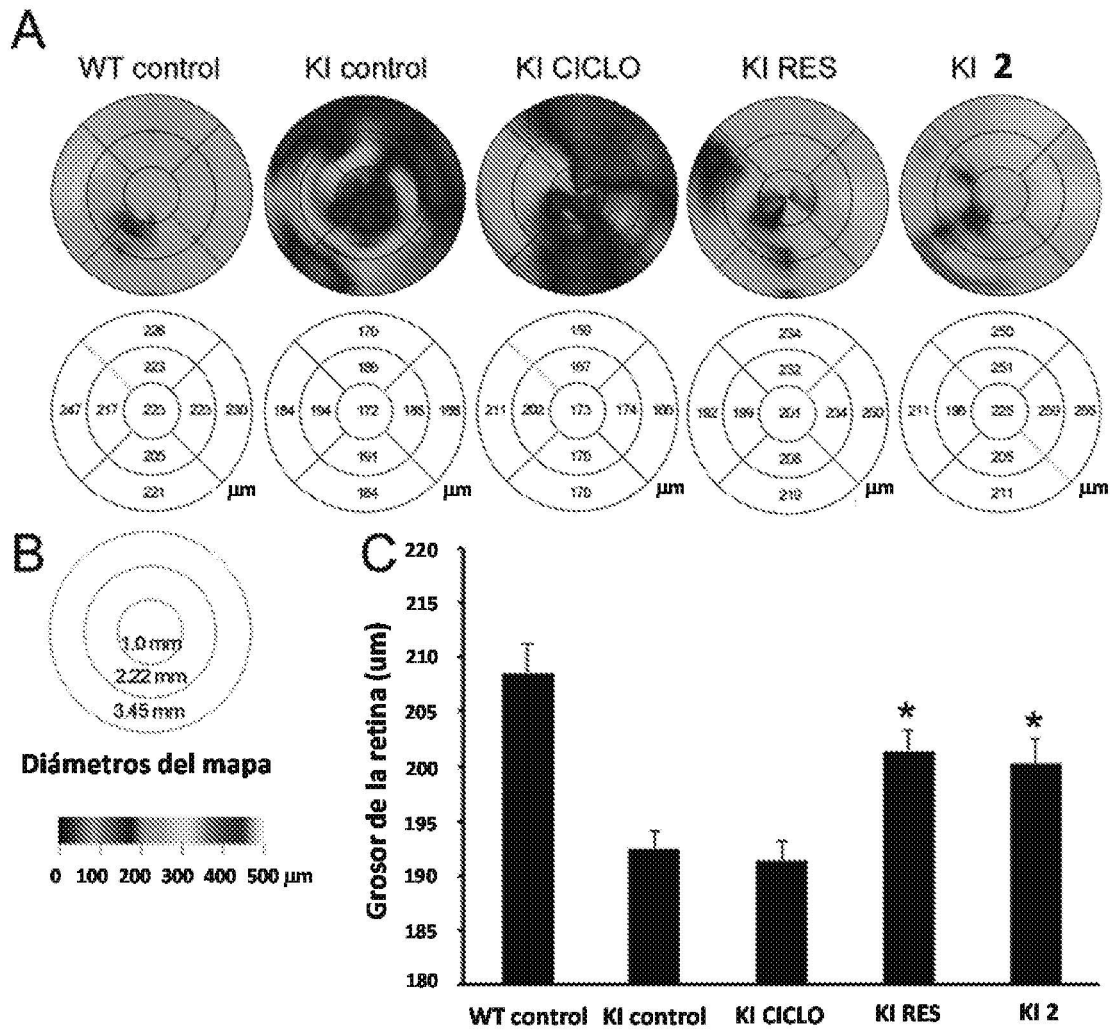


FIG. 13

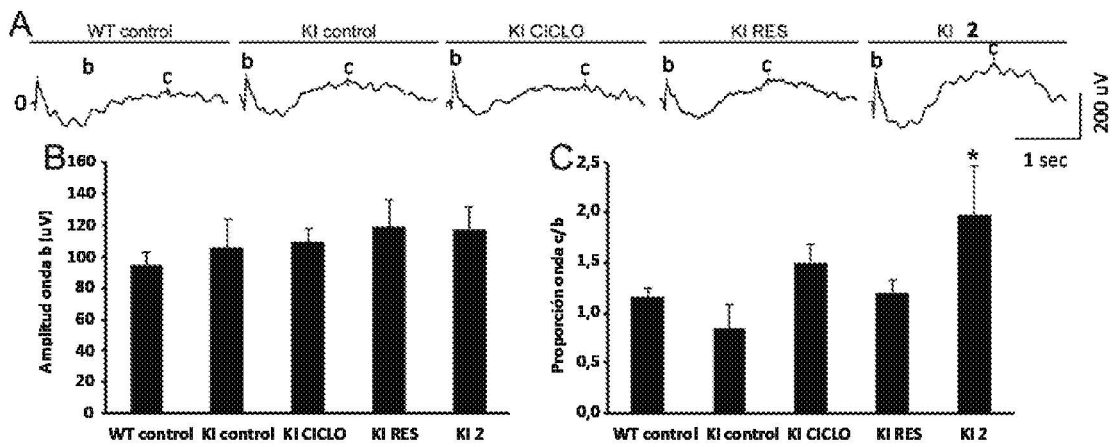


FIG. 14

