



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 255 869**

② Número de solicitud: 200403150

⑤ Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/537 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **30.12.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.2006

⑦ Solicitante/s: **SUMINISTROS SOPREMA S.L.**
Avda. Las Palmeras, 17 Bajo Dcha.
38360 El Sauzal, Tenerife, ES

⑦ Inventor/es: **Arango Rendon, José Manuel y**
Gutiérrez Luis, Javier

⑦ Agente: **Isern Jara, Nuria**

⑤ Título: **Composiciones de productos naturales para el tratamiento de la diabetes.**

⑤ Resumen:

Composiciones de productos naturales para el tratamiento de la diabetes.

La presente invención se refiere a una composición para reducir los niveles de glucosa en sangre que comprende productos naturales, en particular, una composición farmacéutica o alimenticia que comprende mezclas de dos o más compuestos triterpenoides y dos o más compuestos de diterpeno fenol, procesos para obtener los compuestos triterpenoides y los compuestos de diterpeno fenol, composiciones que comprenden los compuestos triterpenoides y de diterpeno fenol y métodos para usar una composición hipoglucemiante, por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes. En una realización preferida, los compuestos triterpenoides son obtenidos a partir de *Anredera cordifolia* (*Basellaceae*) y los compuestos de diterpeno fenol a partir de *Salvia canariensis* (*Lamiaceae*). Las composiciones de la presente invención que comprenden los productos naturales como ingredientes activos muestran un efecto en la reducción de los niveles de glucosa en sangre, por lo que son útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus.

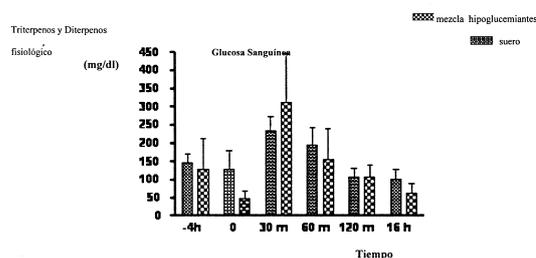


Fig.1

ES 2 255 869 A1

DESCRIPCIÓN

Composiciones de productos naturales para el tratamiento de la diabetes.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición para reducir los niveles de glucosa en sangre que comprende productos naturales, en particular, a una composición farmacéutica o alimenticia para reducir los niveles de glucosa en sangre que comprende mezclas de dos o más compuestos triterpenoides obtenidos a partir de *Anredera cordifolia* (10 (*Basellaceae*) y dos o más compuestos de diterpeno fenol obtenidos a partir de *Salvia canariensis* (*Lamiaceae*).

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica sistémica que se desarrolla debido a factores genéticos o ambientales y causada por la deficiencia total o absoluta de insulina en el cuerpo. El principal síntoma de la diabetes mellitus es el nivel anormalmente elevado de glucosa en sangre y orina con glucosa, inducido por el metabolismo alterado de azúcares, grasas y proteínas y un típico apetito excesivo, sed excesiva y orina excesiva que acompañan a una profunda fatiga.

Mientras, cuando se utilizan el agente sustitutivo de insulina y el agente oral reductor de glucosa en sangre (sulfonilurea y biguanida) predominantes como agentes para el tratamiento de la diabetes, los niveles de glucosa en sangre aumentan rápidamente después de la comida; sin embargo, la aparición de insulina en sangre inducida por la administración de los fármacos es relativamente lenta. Como resultado, tiene lugar una desregulación entre el aumento de glucosa en sangre y la aparición de insulina en sangre. En particular, la insulina inyectada subcutáneamente es absorbida tan lentamente que la desregulación empeora, y aparecen los síntomas de hiperglucemia postprandial, hiperinsulinemia e hipoglucemia.

La diabetes mellitus se clasifica en diabetes mellitus dependiente de insulina (Tipo I) y diabetes mellitus no dependiente de insulina (Tipo II).

La diabetes mellitus dependiente de insulina, Tipo I, se desarrolla de repente debido a la deficiencia severa de insulina, en algunos casos con síntomas serios tales como cetoacidosis diabética. En Europa y en América, se estima que el 5-10% de los pacientes diabéticos pertenecen al Tipo I. Dado que se desarrolla en edades comprendidas entre 10-20 años, la Tipo I también es conocida como diabetes mellitus de aparición juvenil. En cuanto a la patogénesis, se ha sugerido un factor genético, el antígeno HLA (HLA, DR, DQ) como causa asociada con la diabetes, y factores ambientales, tales como virus y toxinas que convierten el antígeno de superficie de las células beta del páncreas secretoras de insulina en inmunogénicas, resultando en la producción de autoanticuerpos contra los islotes y la insulina. Se ha revelado que el autoinmune está involucrado en el desarrollo de la diabetes mellitus. En los últimos años, se ha intentado retrasar o prevenir el desarrollo de la diabetes mediante la detección precoz de dichos autoanticuerpos antes del desarrollo de la diabetes Tipo I.

La diabetes mellitus Tipo II se desarrolla prácticamente a partir de los cuarenta y la mayoría de pacientes diabéticos en Europa y América pertenecen a diabetes mellitus Tipo II. La diabetes mellitus Tipo II es conocida como diabetes mellitus de aparición adulta en comparación con el Tipo I y se sabe que se desarrolla por causas asociadas con factores tanto genéticos como ambientales. En cuanto a los factores genéticos, se ha observado agregación familiar. Con respecto a los factores ambientales, están asociados con la diabetes mellitus la ingesta de alimentos altamente calóricos, el ejercicio físico insuficiente, la obesidad, el estrés y el abuso de drogas. De acuerdo con la patogénesis de la diabetes mellitus Tipo II, se observan tanto el desorden en la secreción de insulina en las células beta del páncreas como el defecto de la actividad de la insulina en las células diana (resistencia a insulina). Sin embargo, no está claro cual es el factor crítico primario.

La tasa de prevalencia de la diabetes mellitus aumenta asombrosamente en estos días y se observa que la terapia más efectiva es la prevención de complicaciones dosificando los excelentes agentes reductores de glucosa en sangre en los estados iniciales.

Los agentes orales reductores de glucosa en sangre para el tratamiento de la diabetes mellitus incluyen las sulfonilureas, las biguanidas y acarbose y similares. En el caso de las sulfonilureas, se utilizan generalmente los productos de segunda generación debido al tiempo de acción más corto y un excelente efecto en la reducción de glucosa en sangre. Las sulfonilureas se utilizan en pacientes con diabetes de adquisición adulta que no estén obesos, mientras que las biguanidas y acarbose con pacientes que están obesos por encima del peso normal. Una de las diferencias remarcables entre las biguanidas y acarbose respecto a las sulfonilureas es la baja frecuencia de hipoglucemia inducida.

El agente reductor de glucosa en sangre ideal es un fármaco seguro y que se pueda administrar oralmente que tenga no sólo la acción rápida que permita la prevención del incremento de glucosa en sangre después de la ingesta y pierda la actividad en un tiempo corto para evitar la inducción de hipoglucemia, sino que también sea capaz de tratar los desórdenes del metabolismo que acompañan particularmente a la diabetes. Actualmente, la importancia de desarrollar dicho agente reductor de glucosa en sangre ha sido cada vez más reconocida y se ha puesto la atención en el tratamiento de la diabetes mellitus con productos farmacéuticos tradicionales y productos naturales.

Además, la insulina administrada mediante inyección tiene un efecto notable en la reducción de glucosa en sangre, pero sin embargo, es incómodo de utilizar y debe tenerse en cuenta la posibilidad de complicaciones tales como la hipoglucemia. En particular, deben tenerse precauciones adecuadas con las personas mayores ya que son susceptibles de sufrir hipoglucemia.

Además de estas terapias con fármacos, existen alrededor de 160 terapias populares que se llevan a cabo en Europa y América. Se ha descrito que más del 70% de los pacientes adultos con diabetes mellitus han probado una o más de estas terapias populares.

El estudio de los fármacos para el tratamiento de la diabetes se está focalizando en la prevención y tratamiento de la diabetes, y en el caso de la diabetes dependiente de insulina, el estudio para prevenir el cáncer debido a insulinitis y el tratamiento de la diabetes se lleva a cabo con modelos animales de la enfermedad; la mayoría de las estrategias para el tratamiento de la diabetes se concentran en la inhibición y regulación de la respuesta inmune para prevenir la destrucción de las células beta. Una enfermedad autoinmune, la diabetes dependiente de insulina es debida al aumento anormal de la función inmune, y se aplican varias terapias inmunes para prevenir la destrucción de las células beta. Se ha encontrado que la eliminación de las células T mediante el tratamiento con anticuerpos contra las células T y la eliminación de los macrófagos resulta en la inhibición del desarrollo de la diabetes. Se ha descrito que la diabetes mellitus puede ser inhibida mediante la inhibición de la generación y actividad de radicales libres tales como el NO secretado en inmunocitos con antioxidantes tales como nicotina, vitamina E, probucol, MDL29311 y U78518F.

Mientras, la terapia con inhibidores inmunes ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, el tratamiento con glucocorticoides no muestra una eficiencia significativa y aunque la ciclosporina A, la rapamicina y el FK506 se han sugerido como agentes curativos de la diabetes, se requiere una mayor verificación. La terapia con inhibidores inmunes puede causar una excesiva inhibición inmune que lleve a una infección secundaria, toxicidad hepática y renal, de forma que existen muchos problemas que deben resolverse para utilizarlos como agentes curativos de la diabetes. Además, la terapia con dosis a largo plazo puede inducir cáncer. Recientemente, el estudio sobre la prevención y tratamiento de la diabetes con reguladores inmunes, no inhibidores inmunes, está en proceso y se ha descrito que el tratamiento de citoquinas tales como IL-4 y IL-10 inhibe la diabetes mellitus en ratones enfermos. Los reguladores inmunes tales como OK-432, LZ-8, BCG y CFA han sido descritos como capaces de tratar la diabetes mellitus. Sin embargo, el mecanismo es todavía desconocido.

Como agentes curativos de la diabetes mellitus no dependiente de insulina, se está intentando desarrollar agentes que no tengan efectos adversos y sean capaces de tratar tanto la diabetes mellitus dependiente de insulina como la no dependiente de insulina simultáneamente.

Es conocido que los productos farmacéuticos latinoamericanos usados tradicionalmente presentan baja toxicidad y una variedad de eficacias curativas. Existen informes que indican que la prescripción de uno o más productos farmacéuticos orientales permite el tratamiento de la diabetes mellitus y, en algunos casos, de la diabetes mellitus dependiente y o dependiente de insulina simultáneamente.

La *Anredera cordifolia* y otras plantas de la familia botánica *Basellaceae* ha sido utilizada como medicina tradicional, en Colombia y Taiwán, usada como analgésico, para curar heridas y para el tratamiento sintomático de la diabetes mellitus.

La *Salvia canariensis*, una *Lamiaceae* endémica de las Islas Canarias, ha sido utilizada en la medicina popular para las dolencias estomacales y el tratamiento de la tos, y se ha descrito que presenta un contenido muy alto de compuestos de diterpeno fenol los cuales se ha demostrado que son capturadores muy eficientes de los radicales libres y de las especies de oxígeno en estado singulete que causan procesos degenerativos en mamíferos.

50 Descripción de la invención

La presente invención proporciona composiciones hipoglucemiantes que comprenden dos o más de los compuestos triterpenoides elegidos entre el grupo formado por: ácido 3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil]-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, 3β-hidroxi-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, 3β-hidroxi-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, Momordin Ib, Momordin Ib-28-β-glucopiranosil éster, ácido 3-O-[β-D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-oico, Larreagenina A, 3β,20ξ-dihidroxi-30-norolean-12-en-28-oico, ácido 3β-hidroxi-30-norolean-12,19-dien-28-oico, 3β-hidroxi-30-norolean-12,19-dien-28-oato, 3-O-[β-D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-O-[β-D-glucopiranosil] éster, 3-O-[β-D-glucopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-O-[β-D-glucopiranosil] éster, 3-O-[β-D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-23-hidroxi-28-oico, ácido 3-β-[O-β-D-xilopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil]oxi)-olean-12-ene-28-oico, 3-O-[β-D-glucuronopiranosil]-20(29)-eno-30 norhederagenin 28-O-[β-D-glucopiranosil] éster, Quinoasaponina-9, ácido ursólico y ácido oleonólico, obtenidos en una realización preferente a partir de *Anredera cordifolia*, o sus sales farmacéuticamente aceptables para utilizarlos como agentes hipoglucemiantes, es decir, para reducir la glucosa en sangre o tratar la diabetes mellitus, en mamíferos; y dos o más de los compuestos de diterpeno fenol elegidos entre el grupo formado por: 7-ceto-ferruginol, 6,7-didehidro-ferruginol, ácido carnósico, carnosol, isocarnosol, rosmanol, isorosmanol, epirosmanol, galdosol y isogaldosol obtenidos en una realización preferida a partir de *Salvia canariensis*; o sus sales farmacéuticamente aceptables para utilizarlos como agentes hipoglucemiantes, es decir, para reducir la glucosa en sangre o tratar la diabetes mellitus, en mamíferos. Dichas composiciones contienen opcionalmente un vehículo o portador far-

macéuticamente aceptable y opcionalmente otro agente o agentes hipoglucemiantes útiles para el tratamiento de la diabetes.

5 La invención también abarca métodos para la obtención de los compuestos triterpenoides, procesos para la obtención de los compuestos de diterpeno fenol, composiciones que comprenden los compuestos de triterpeno y diterpeno fenol y métodos para utilizar las composiciones que comprenden los compuestos de triterpeno y diterpeno como agentes hipoglucemiantes.

10 La presente invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a las figuras, descripción detallada y ejemplos dirigidos a ejemplificar realizaciones no limitativas de la invención.

Aislamiento de los compuestos triterpenoides y de diterpeno fenol

15 El material de las plantas de la familia *Basellaceae*, preferentemente *Anredera cordifolia*, o de *Salvia canariensis*, se extraen en primer lugar con un solvente orgánico, incluyendo solventes orgánicos apolares, solventes orgánicos polares, o sus mezclas, para obtener una solución de los presentes compuestos triterpenoides. Como “material de las plantas” se entiende cualquier parte de la planta tal como las hojas, raíces, flores o el tallo, preferentemente las hojas. Los solventes orgánicos apolares útiles incluyen, pero no se limitan a, tetracloruro de carbono, diclorometano, benceno, tolueno, xileno, pentano, heptano y similares. Los solventes orgánicos polares útiles incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, isopropanol, acetona, 2-butanona, acetato de etilo, éter dietílico, tetrahidrofurano, cloroformo, dimetilformamida, N-metilpirrolidina, dimetil sulfóxido, y sus mezclas entre ellos o con agua. Preferentemente el solvente utilizado para extraer los compuestos triterpenoides de la *Baselloid ssp.* es un solvente orgánico polar, más preferentemente n-butanol. Preferentemente el solvente utilizado para extraer los compuestos de diterpeno fenol de *Salvia canariensis* es un solvente orgánico polar, más preferentemente acetona. Antes de la extracción con el solvente orgánico polar el material de las plantas puede ser opcionalmente molido, rallado, macerado o tratado de cualquier otra forma para aumentar el área de superficie total.

25 La extracción de *Baselloid ssp.* o *Salvia canariensis* con el solvente orgánico polar o apolar puede llevarse a cabo con un aparato de extracción tipo soxhlet en el que se colocan los fragmentos pequeños de *Baselloid ssp.* o *Salvia canariensis* dentro de un dedal poroso y se extraen de forma continua con el solvente orgánico polar o apolar a temperatura de reflujo durante entre varias horas a varios días, o preferentemente, colocando simplemente pequeños fragmentos de *Baselloid ssp.* o *Salvia canariensis* en un recipiente que contiene el solvente orgánico polar o apolar y dejando la mezcla resultante macerar o agitarse a temperatura ambiente durante entre varias horas y varias semanas.

35 Después de la extracción, la solución orgánica se concentra (es decir, se evapora), opcionalmente al vacío, o se liofiliza, para obtener un extracto polar o apolar que comprende los compuestos triterpenoides de la *Baselloid ssp.* o un extracto polar o apolar que comprende los compuestos de diterpeno fenol de *Salvia canariensis*.

40 El extracto polar o apolar se purifica a continuación para obtener la mezcla de los compuestos triterpenoides de *Baselloid ssp.* en forma purificada, o los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis* en forma purificada. Como “forma purificada” se entiende una forma del compuesto aislada y que no se encuentra de forma natural, que tiene un grado de pureza de al menos el 50%, preferentemente al menos el 90%, y más preferentemente al menos el 95%. El extracto polar o apolar puede ser purificado mediante cristalización o preferentemente, por cromatografía en columna, incluyendo cromatografía convencional con gel de sílice, cromatografía en columna Sephadex, cromatografía flash al vacío y cromatografía líquida de alta resolución preparativa o semipreparativa. Cuando se usa la cromatografía en columna para purificar los compuestos del extracto polar o apolar, puede ser necesario utilizar varias iteraciones de la cromatografía en columna para obtener la mezcla de compuestos triterpenoides de *Basellaceae spp.* en forma purificada o los compuestos de diterpeno fenol de *Salvia canariensis*, que tengan el grado deseado de pureza. Preferentemente, el extracto polar o apolar se purifica en primer lugar utilizando cromatografía Sephadex HL-20 convencional para obtener una serie de fracciones que están enriquecidas con la mezcla de triterpenoides de *Basellaceae spp.* o los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*. Estas fracciones son preferentemente repurificadas, más de una vez si es necesario, para obtener la mezcla de triterpenoides de *Basellaceae spp.* o los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*, en forma sustancialmente purificada. Como “forma sustancialmente purificada” se entiende una forma aislada que no ocurre de forma natural de la mezcla de triterpenoides de *Basellaceae spp.* o los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*, que tiene un grado de pureza de al menos el 95%. Las formas purificada y sustancialmente purificada de los triterpenoides de *Basellaceae spp.*, preferentemente *Anredera cordifolia*, pueden obtenerse mediante purificación de materiales aislados por extracción de fuentes naturales de plantas, o por purificación de compuestos obtenidos a partir de un proceso de síntesis químico. Las formas purificada y sustancialmente purificada de los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*, pueden obtenerse mediante purificación de materiales aislados por extracción de fuentes naturales de plantas, o por purificación de compuestos obtenidos a partir de un proceso de síntesis químico.

Métodos para usar los compuestos triterpenoides y de diterpeno fenol

65 Debido a la actividad hipoglucemiante de los compuestos triterpenoides de *Anredera cardifolia* y la actividad antioxidante (capturadores eficientes de los radicales libres y de las especies de oxígeno en estado singulete que causan procesos degenerativos en mamíferos) de los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*, las mezclas adecuadas com-

binadas de ambos tipos de compuestos es ventajosamente útil en veterinaria y medicina humana para el tratamiento terapéutico de la diabetes mellitus. Adicionalmente, estas mezclas combinadas pueden ser ventajosamente utilizadas como agente hipoglucemiante para reducir los niveles de glucosa en sangre en situaciones de estrés agudo tal como se ha experimentado en animales o pacientes con hipertermia, trauma, sepsis, y quemaduras y sometidos a anestesia general. La hiperglucemia asociada a veces con dolor agudo de cabeza, trombosis cerebral, encefalitis y choque térmico pueden también ser tratados terapéuticamente con estas mezclas combinadas de triterpenos de *Anredera cordifolia* y diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*. Adicionalmente, estas mezclas combinadas son útiles como agente hipoglucemiante para la enfermedad de almacenamiento de glucógeno metabólico congénita rara asociada con la hiperglucemia.

Aunque la presente invención no pretende estar limitada a ningún mecanismo de acción particular para explicar la actividad hipoglucemiante de la mezcla combinada de triterpenoides y diterpeno fenoles de la presente invención, se prevé que pueda ser ventajosamente útil para el tratamiento tanto de la diabetes dependiente de insulina o Tipo I (antes denominada diabetes de aparición juvenil o propensa a cetosis) y de la diabetes no dependiente de insulina o Tipo II (antes denominada diabetes de aparición adulta, de aparición en la madurez o no cetótica).

Las mezclas combinadas de compuestos de triterpeno y diterpeno fenol de la presente invención pueden ser administradas solas o en forma de una composición que comprende cualquier portador fisiológicamente aceptable tal como agua, una solución acuosa, suero salino u otro excipiente fisiológicamente aceptable. En general, la dosis terapéuticamente efectiva estaría en el rango entre alrededor de 10-1000 mg/kg/día, preferentemente 1-250 mg/kg/día. Las mezclas combinadas de compuestos de triterpeno y de diterpeno fenol de la presente invención, pueden ser administradas por varias vías, incluyendo, pero no limitadas a: vía oral, inyección, incluyendo, pero no limitada a, vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc. La ruta de administración preferida es la vía oral. Las composiciones pueden contener adicionalmente otros agentes hipoglucemiantes tales como insulina; una biguanida tal como metformina o buformina; una sulfonilurea tal como acetohexamida, cloropropamida, tolazamida, tolbutamida, gliburida, glipizida o gliclazida; una tiazolidinodiona tal como troglitazona; un inhibidor de α -glucosidasa tal como acarbosa o miglatol; o un agonista del receptor adrenérgico P3 tal como CL-316, 243, etc.; o sus mezclas.

Las mezclas combinadas de compuestos de triterpeno y de diterpeno fenol de la presente invención, pueden ser administradas en una cantidad efectiva como una sal farmacéuticamente aceptable utilizando contraiones tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, zinc y hierro.

Además, las mezclas combinadas de compuestos de triterpeno y de diterpeno fenol de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser utilizados para fines de investigación, por ejemplo, para investigar el mecanismo y la actividad de los agentes hipoglucemiantes.

La siguiente serie de ejemplos se presentan como medio de ilustración y no como medio de limitación en el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de los compuestos triterpenoides a partir de Anredera cordifolia

Ejemplo 1.1

Materiales y métodos

Las purificaciones de los compuestos para espectroscopia se realizaron en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia formado por dos bombas SHIMADZU LC-9A y un detector espectrofotométrico UV-VIS de longitud de onda variable SHIMADZU SPD-6AV, equipado con una columna WATERS de 19 x 150 mm rellena de gel de sílice μ porasil con tamaño de partícula 10 μ m, utilizando siempre como eluyentes disolventes grado Lichrosolv de la casa MERCK. Para la realización de los experimentos de RMN, los productos fueron disueltos en CDCl_3 , C_6C_6 , Py-D_5 , CD_3OD , $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, usando Tms como referencia interna. Los espectros de RMN ^1H fueron realizados en espectrómetros BRUKER WP-200 SY (200 MHz) y BRUKER AMX 400 (400 MHz), y los de RMN ^{13}C se efectuaron en un espectrómetro WP-200 SY (200 MHz) y BRUKER AMX 400 (400 MHz), WP-200 SY (50 MHz) y BRUKER AMX 400 (100 MHz). Los espectros de IR se realizaron usando película o disolución en CHCl_3 del producto puro en células de NaCl, en un espectrofotómetro PERKIN ELMER, modelo 1600 (FTIR). Los espectros UV se efectuaron en un espectrofotómetro PERKIN ELMER 550 SE, con células de cuarzo de 5 mm usando EtOH como disolvente. La determinación de fórmulas moleculares de fragmentos y del ión molecular fueron realizados en un espectrómetro de alta resolución VG-MICROMASS, ZAB-2F, a potenciales de ionización de 15 ó 70 eV. Los espectros de masa de baja resolución se realizaron en un espectrómetro HEWLETT-PAKARD, modelo 5995. La determinación de las actividades ópticas se realizó en un polarímetro PERKIN ELMER, modelo 141, usando la línea D del sodio, a 25°C y en disolución de CHCl_3 con células de 1 dm. Las cromatografías en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, con indicador de luminiscencia a 254 nm, SCHLEICHER & SCHUELL, F-1500/LS 254. Las placas se revelaron con oleum (CH_3COOH 80%, H_2O 16% y H_2SO_4 4%), calentándolas posteriormente a 120°C. Para la cromatografía en capa fina preparativa se usaron placas de 1 mm de espesor SCHLEICHER & SCHUELL F-1510/LS 254 20 x 20 cm. Para las columnas tanto húmedas como secas se utilizó gel de sílice (0.0063 - 0.0020 nm) ó 60 G de la casa MERCK, para

ES 2 255 869 A1

las cromatografías en SEPHADEX LH-20 de la casa PHARMACIA FINE CHEMICALS. Las columnas se montaron de la siguiente forma: durante al menos una noche se dejó la cantidad de SEPHADEX deseada en suspensión con metanol (1 g para 3,9-4,1 cm³) y se vertió en la columna dejándola reposar. Cada vez que se cambió el disolvente empleado como eluyente se pasó al menos, unas tres veces, una cantidad equivalente al volumen muerto de la columna. El producto se deposita en la parte superior disuelto en una cantidad de disolvente no inferior al 5% del volumen muerto de la columna.

Ejemplo 1.2

10 *Aislamiento de los principios activos a partir de Anredera cordifolia*

El aislamiento de los compuestos de triterpeno se resume más adelante en el Esquema I. El material de plantas fresco (156.8 g) se sometió a un proceso de liofilización y después de 36 horas se obtuvo la planta deshidratada. La planta deshidratada se extrajo con 200 ml de hexano (3 repeticiones), y se dejó durante 6 horas a temperatura ambiente. La evaporación del hexano rindió 235.5 mg de extracto hexánico. Este extracto se pasó a través de una columna cromatográfica de gel de sílice. La elución del residuo se hizo con un gradiente de polaridad creciente de hexano y EtOAc, recogiendo 200 fracciones (50 ml cada una). En base al análisis por TLC, se combinaron en tres fracciones F-1, F-2 y F-3, la fracción F-1 contenía las ceras, la F-2 los ácidos grasos y la F-3 los diterpenos. Una segunda extracción con CH₂Cl₂ (tres repeticiones de 200 ml cada una), rindió un extracto verdoso de diclorometano (228 mg). La cromatografía de este extracto sobre gel de sílice, utilizando gradientes de elución de polaridad creciente de hexano-EtOAc y en base al análisis por TLC se combinaron en cuatro fracciones F-1, F-2, F-3 y F-4. Las purificaciones continuas por cromatografía con gel de sílice y cromatografía preparativa además de análisis por ¹H y ¹³C - NMR verificaron en las F-1 y F-2 la presencia de ácidos grasos y triterpenos en las fracciones F-3 y F-4.

El material de plantas que quedó después de la extracción continua con CH₂Cl₂ se sometió a una tercera extracción con una mezcla de MeOH-H₂O (50%). Después de la evaporación del MeOH en un rotavapor se obtuvo una fase acuosa (3.964 g). La fase acuosa se extrajo 5 veces con n-butanol (200 ml cada una) y la evaporación del n-butanol utilizando evaporación rotativa a alto vacío utilizando nitrógeno líquido, dio un extracto butanólico (910 mg) y un resto de fase acuosa (3.050 g). Cromatografías repetidas del extracto butanólico sobre Sephadex LH-20 (MeOH) además de los análisis por ¹H y ¹³C-NMR verificaron la presencia de compuestos de triterpeno glicosilados (480 mg) y compuestos glicosilados aromáticos.

El residuo de la fase acuosa se sometió a purificaciones repetidas sobre Sephadex LH-20 (MeH:H₂O 7:3) para dar la mezcla de compuestos glicosilados (2.500 g). El material de plantas (primer residuo) del extracto de MeH:H₂O se extrajo posteriormente con H₂O. Este extracto fue liofilizado, obteniéndose un polvo amarillento pálido. El análisis por ¹H-NMR indicó la presencia de una mezcla de glicosilados.

(Esquema pasa a página siguiente)

ES 2 255 869 A1

Esquema 1

Aislamiento de los principios activos de *Anredera c.*

5

Aislamiento del principio activo

10

15

20

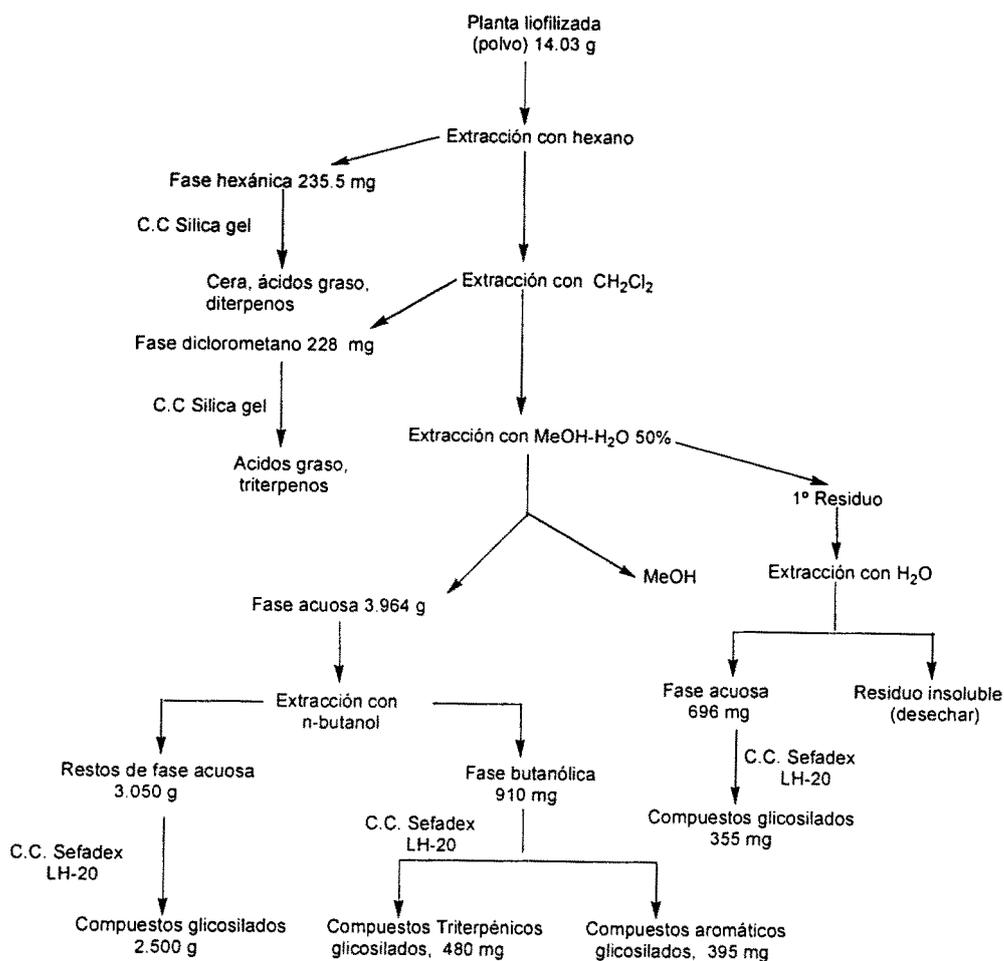
25

30

35

40

45



Ejemplo 2

Aislamiento de los diterpeno fenoles de *Salvia canariensis*

55

El aislamiento de los diterpeno fenoles de *S. canariensis* se resume más adelante en el Esquema 2. 1,5 Kg de la parte aérea seca de *S. canariensis* cultivada, de la cual un espécimen se encuentra depositado en el Herbolario del Departamento de Botánica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna. El material vegetal seco fue finamente triturado y macerado con acetona destilada a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida a 40°C, obteniéndose 112,65 gr de extracto.

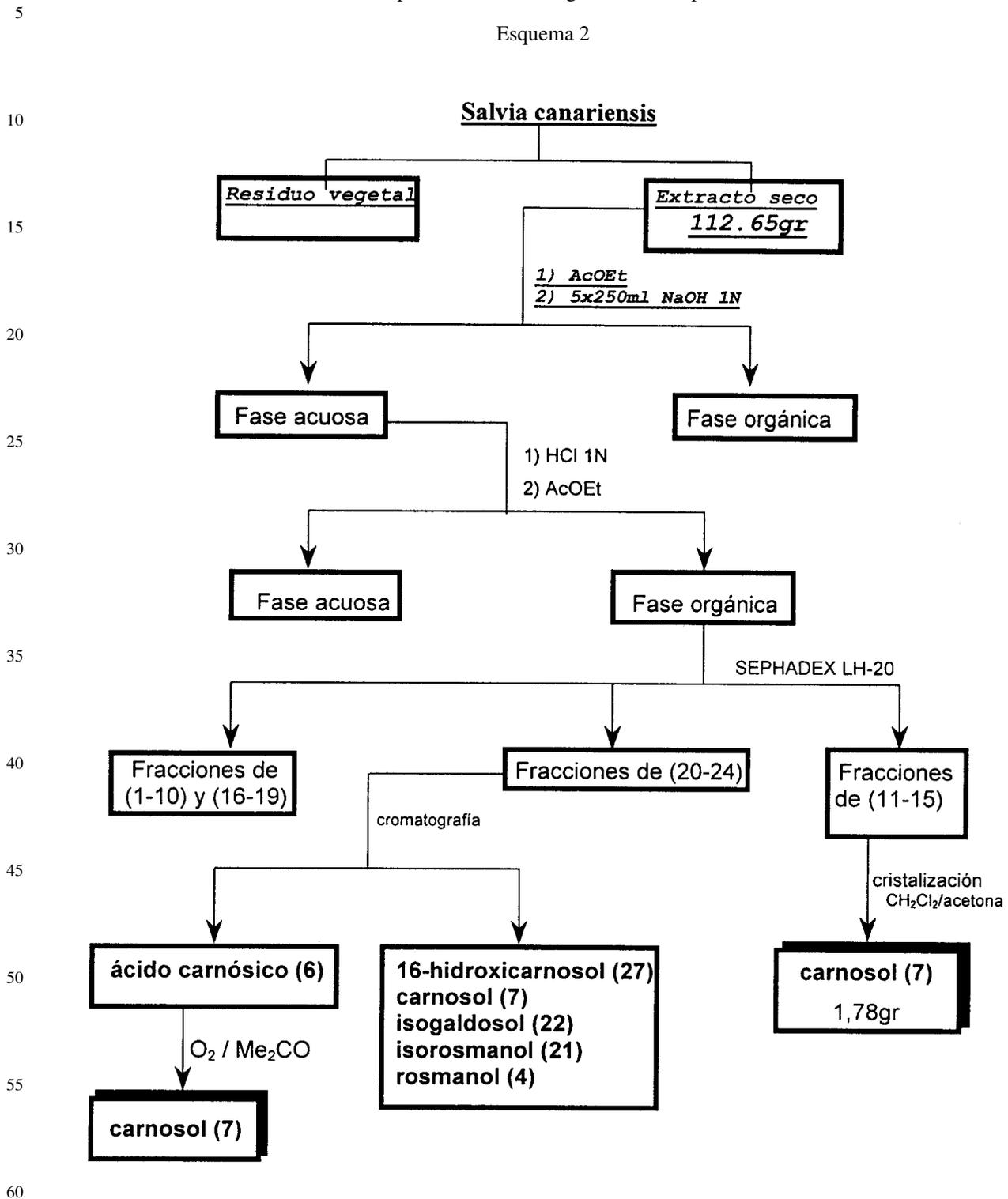
60

El extracto así obtenido se disolvió en 250 ml de acetato de etilo, y se extrajo 5 veces con una disolución acuosa de NaOH 1N. Cada fracción acuosa (por separado) se aciduló usando una disolución de HCl al 5%. Las fases acuosas aciduladas se extrajeron cada una 3 veces con porciones de 100 ml de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida en el rotavapor, obteniéndose de esta manera 5 fracciones, de las cuales después de realizar un análisis por capa fina se decidió reunir de la 2ª a la 5ª y desecharse la 1ª.

65

Las fracciones 2 a la 5 se cromatografiaron en una columna de Sephadex LH-20, usando como mezcla eluyente n-Hexano/CH₂Cl₂/MeOH en la proporción 2:1:1. Tras realizar el correspondiente análisis en cromatografía en capa fina, se reunieron aquellas fracciones donde el carnosol era el producto mayoritario y se pusieron a cristalizar en la mezcla acetona/diclorometano. De este modo, el proceso rindió 1,73 gr de carnosol puro.

Esquema 2



Reducción de la concentración de glucosa en plasma

Estos ejemplos ilustran la efectividad de la mezcla hipoglucemiante de triterpenos y diterpenos, reduciendo la concentración de glucosa en sangre en ratones obesos db/db, un reconocido modelo de la diabetes no insulino dependiente, usado en ensayos sobre actividad hipoglucemiante en mamíferos, incluidos los humanos.

ES 2 255 869 A1

Ejemplo 3

Materiales y métodos usados

5 Se adquirieron ratones obesos y diabéticos alterados genéticamente (C57BUKs-db/db) al Laboratorio Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbour Me., USA) que sirvieron como animales de experimentación.

Se escogieron machos con edades comprendidas entre las 7 y 9 semanas, para el estudio. Los animales se distribuyeron en jaulas (4 ratones/jaula) que se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio a 22°C y se alimentaron con pienso Purina® para roedores, y agua a demanda. Se usaron 15 animales seleccionados aleatoriamente, sin tener en cuenta previamente su nivel de glucosa en sangre.

10 A 11 ratones diabéticos C57BUKs-db/db, se les administró, mediante inyección intraperitoneal, 0.5 ml de mezcla de diterpenos y triterpenos con una dosis de 2 g/kg peso. Los 4 restantes sirvieron de control, inyectándoles 0.5 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%).

Cuatro horas más tarde (tiempo = 0) se tomó una muestra de sangre de la cola, sobre la cual se determinó la concentración de glucosa, para después administrar a cada ratón del ensayo una carga de glucosa de 150 mg/ratón, mediante sonda gástrica.

20 Se tomaron muestras de sangre de las colas, a los 30, 60 y 120 minutos, además de a las 16 horas, en condiciones de ayuno tras las administración inicial de glucosa (150 mg/ratón). Las muestras de sangre fueron analizadas mediante el medidor de glucosa Glucocard G Meter® (Menarini Diagnostics) y sus correspondientes tiras reactivas Glucocard G Sensor® (Menarini Diagnostics).

25 Analizando los datos estadísticamente (ANOVA) se puede observar como existen evidencias estadísticamente significativas de la actividad hipoglucemiante de la mezcla de triterpenos y diterpenos objeto de esta patente.

Resultados

30 Como se puede observar en la Fig. 1, la administración intraperitoneal de la mezcla hipoglucemiante de triterpenos y diterpenos en ratones obesos y diabéticos alterados genéticamente (C57BUKs-db/db) a una dosis de 2 g/kg peso, produjo una reducción de la glucemia estadísticamente significativa, en relación con los ratones control tratados con suero fisiológico, a los 0 y 60 minutos, y a las 16 horas tras la administración de glucosa.

Ejemplo 4

Materiales y métodos usados

40 Se adquirieron ratones obesos y diabéticos modificados genéticamente (C57BUKs-db/db) al Laboratorio Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbour Me., USA) que sirvieron como animales de experimentación.

Se escogieron machos con edades comprendidas entre las 8 y 10 semanas, para el estudio. Los animales se distribuyeron en jaulas (2 ratones/jaula), se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio a 22°C y se alimentaron con pienso Purina® para roedores. Se usaron 6 animales seleccionados aleatoriamente, sin tener en cuenta su nivel de glucosa en sangre al inicio del tratamiento.

45 Se les suministró, por espacio de 28 días, a cuatro de los ratones, y *ad libitum* una disolución de la mezcla hipoglucemiante de triterpenos y diterpenos como bebida, con una concentración de 60 mg/ml. A dos ratones, identificados como control, se les administró agua normal (embotellada, Fuente Alta) como bebida, por el mismo periodo de tiempo.

Se tomó cada 4 días una muestra de sangre de la cola, tras ayuno de una noche, sobre la que se determinó la concentración de glucosa. Se determinó también el peso de los animales para ver su evolución en el tiempo. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante el medidor de glucosa Glucocard G Meter® (Menarini Diagnostics) y sus correspondientes tiras reactivas Glucocard G Sensor® (Menarini Diagnostics).

55 Analizando los datos mediante la comparación de las gráficas se puede observar como existen datos significativos de la actividad hipoglucemiante de la mezcla de triterpenos y diterpenos objeto de esta patente.

Resultados

60 Como se puede observar en las Fig. 2-7, la administración continuada de una disolución de la mezcla hipoglucemiante de triterpenos y diterpenos a ratones obesos y diabéticos alterados genéticamente (C57BUKs-db/db) a una concentración de 60 mg/ml, produjo una significativa reducción de la glucemia y el control de ésta a lo largo del tiempo, en relación con los ratones control, tratados con agua *ad libitum*.

ES 2 255 869 A1

La presente invención no debe ser limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en los ejemplos los cuales pretenden ilustrar algunos aspectos de la invención y cualquier realización que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí serán aparentes para el experto en la materia y están recogidas en las presentes reivindicaciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende dos o más de los compuestos triterpenoides elegidos entre el grupo formado por: ácido 3-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-glucopiranosil]-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, ácido 3 β -hidroxi-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, Momordin Ib, Momordin Ib-28- β -glucopiranosil éster, ácido 3-*O*-[β -D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-oico, Larreagenina A, ácido 3 β ,20 ξ -dihidroxi-30-norolean-12-en-28-oico, ácido 3 β -hidroxi-30-norolean-12,19-dien-28-oico, 3 β -hidroxi-30-norolean-12,19-dien-28-oato, 3-*O*-[β -D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-*O*-[β -D-glucopiranosil] éster, 3-*O*-[β -D-glucopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-28-*O*-[β -D-glucopiranosil] éster, ácido 3-*O*-[β -D-glucuronopiranosil]-30-norolean-12,20(29)-dien-23-hidroxi-28-oico, ácido 3- β -[*O*- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-glucopiranuronosil]oxi)-olean-12-eno-28-oico, 3-*O*-[β -D-glucuronopiranosil]-20(29)-eno-30 norhederagenin 28-*O*-[β -D-glucopiranosil] éster, Quinoasapoina-9, ácido ursólico y ácido oleanólico, obtenidos de *Anredera cordifolia*, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y dos o más de los compuestos de diterpeno fenol elegidos entre el grupo formado por: 7-ceto-ferruginol, 6,7-didehidro-ferruginol, ácido carnósico, carnosol, isocarnosol, rosmanol, isorosmanol, epirosmanol, galdosol y isogaldosol obtenidos de *Salvia canariensis*, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal farmacéuticamente aceptable se elige entre el grupo formado por sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, zinc y hierro.

25 3. Una composición farmacéutica para ser utilizada como agente hipoglucemiante en mamíferos que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de la reivindicación 1.

30 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende además un agente hipoglucemiante elegido entre el grupo formado por una sulfonilurea, una biguanida, una tiazolidinodiona, un agonista del receptor adrenérgico P3, un inhibidor de α -glucosidasa, insulina y sus mezclas.

35 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 donde la sulfonilurea se elige entre el grupo formado por acetohexamida, cloropropamida, tolazamida, gliburida, glipizida y glicazida.

40 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 donde la biguanida es metformina o buformina.

45 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 donde el inhibidor de α -glucosidasa es ascarbosa o miglatol.

50 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4 donde la tiazolidinodiona es troglitazona.

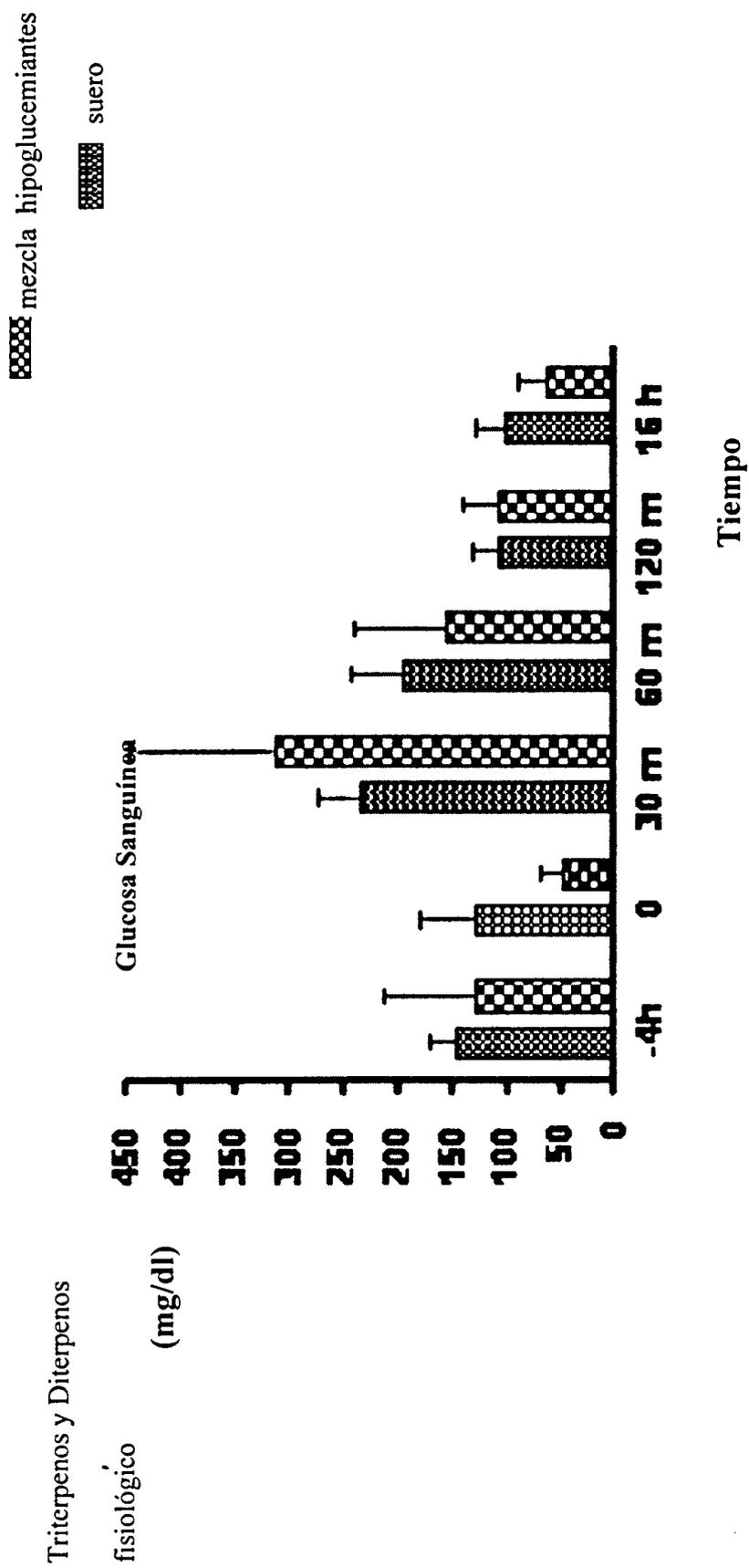


Fig.1

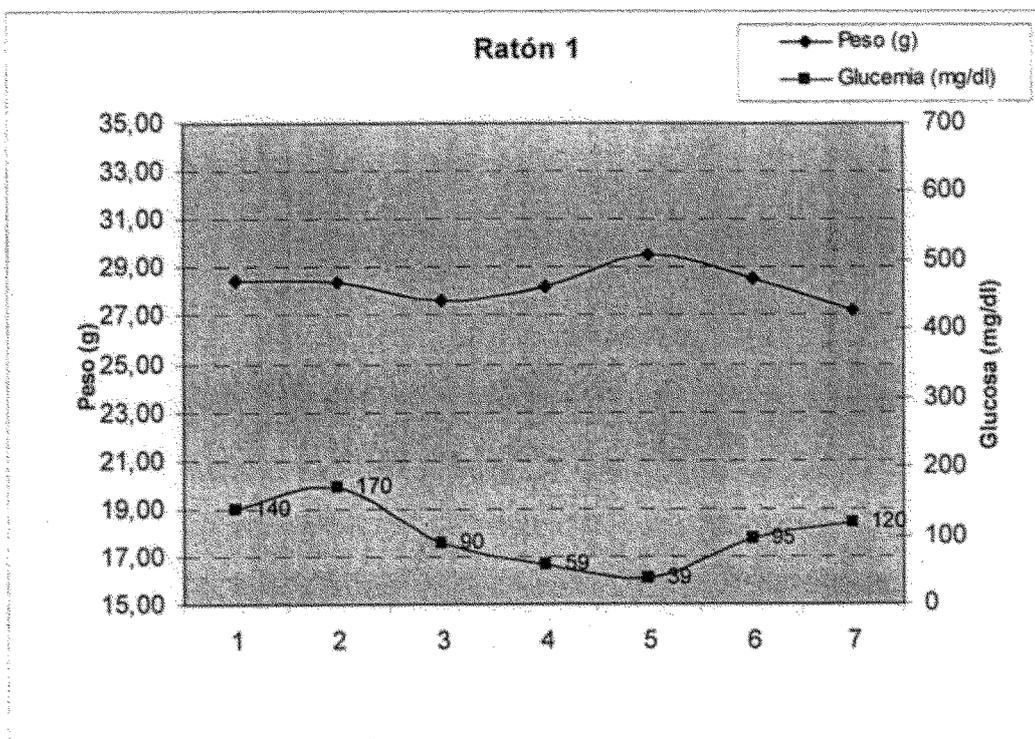


Fig. 2

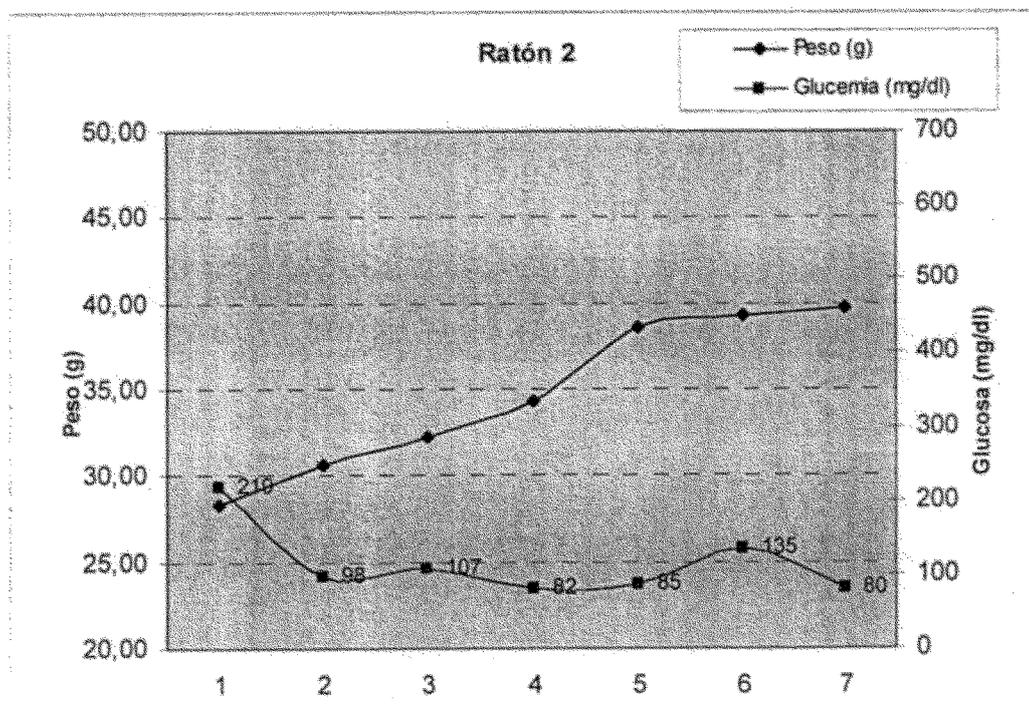


Fig. 3

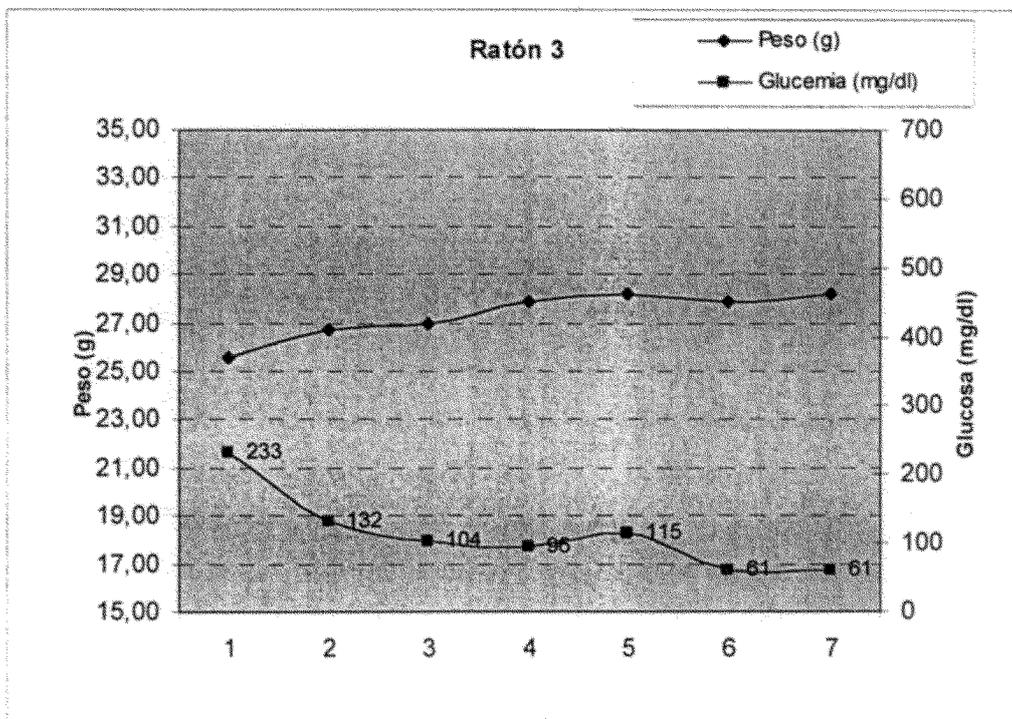


Fig. 4

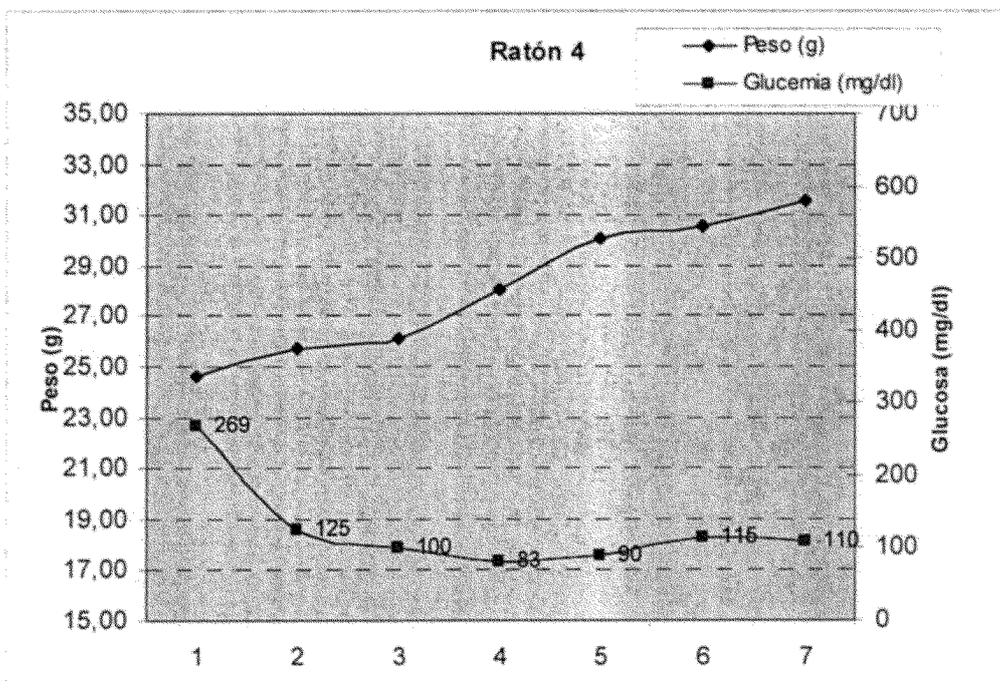


Fig. 5

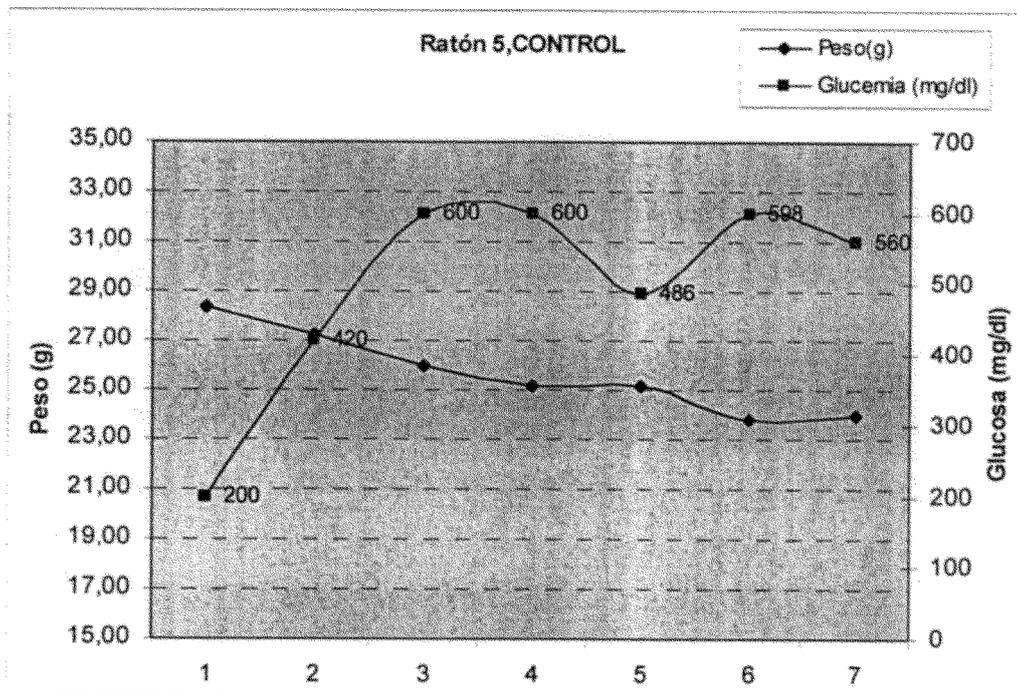


Fig. 6

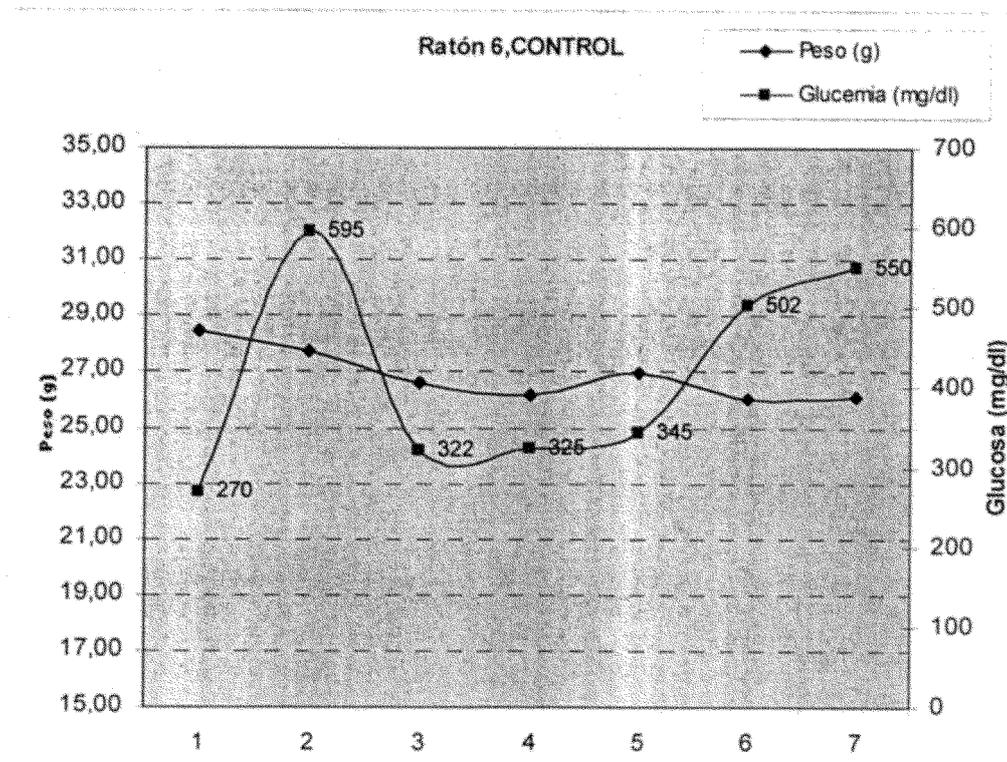


Fig. 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 255 869

② Nº de solicitud: 200403150

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ESPADA, A. et al. "Boussingoside E, an new triterpenoid saponin from the tubers of Boussingaultia baselloides". Journal of Natural Products, 1997. Vol. 60, nº 1, páginas 17-19. ISSN: 0163-3864.	1-3
A	ESPADA, A. et al. "Hypoglucaemic triterpenoid saponins from Boussingaultia baselloides". Canadian Journal of Chemistry, 1990. Vol. 68, nº 11, páginas 2039-2044. ISSN: 0008-4042.	1-3
A	ESPADA, A. et al. "Boussingoside D1, a new triterpenoid saponin from Boussingaultia baselloides". Liebigs Annalen der Chemie, 1991. Nº 3, páginas 291-293. ISSN: 0170-2041.	1-3
A	TENERIFE NEWS English Local News from Tenerife Canary Islands - Archive Health. "Sage of the Canary Islands". Noviembre 2004. [en línea] [recuperado el 19.12.2005] Recuperado de Internet:<URL: http://www.tenerifenews.com/cms/front_content.php?client=1&lang=1&idcat=54&idart=514	1,3
A	GONZÁLEZ, A.G. et al. "Abietane diterpenes with antibiotic activity from the flowers of Salvia canariensis. Reaction of galdosol with diazomethane". Canadian Journal of Chemistry, 1989. Vol. 67, nº 2, páginas 208-212. ISSN: 0008-4042.	1
A	FRAGA, B.M. et. al. "Diterpenes from the roots of Salvia canariensis". Phytochemistry, 1986. Vol. 25, nº 1, páginas 269-271. ISSN: 0031-9422.	1
A	GONZÁLEZ, A.G. et al. "Diterpenes from the flowers of Salvia canariensis". Phytochemistry, 1987. Vol. 26, nº 5, páginas 1471-4. ISSN: 0031-9422.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.01.2006

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 255 869

② Nº de solicitud: 200403150

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.12.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FAMILY PRACTICE NOTEBOOK.COM. "Oral Hypoglycemic", 2003 [en línea] [recuperado el 19.12.2005] Recuperado de Internet:<URL: http://www.fpnotebook.com/END153.htm	4-8
A	Medicamentos para la diabetes por vía oral- En Español - Asociación Americana, octubre 2004. [en línea] [recuperado el 19.12.2005] Recuperado de Internet:<URL: http://www.diabetes.org/espanol/diabetes-tipo-2/medicamentos-via-oral.jsp	4-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.01.2006

Examinador

Asha Sukhwani

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/537 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)