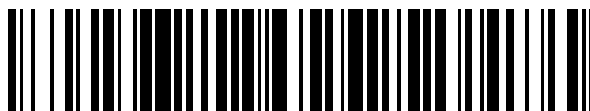


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 164**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048	(2006.01)	A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/353	(2006.01)	A61P 27/12	(2006.01)
A61K 36/886	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
A61K 36/185	(2006.01)	A61P 3/10	(2006.01)
A61K 36/704	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 36/282	(2006.01)		
A61K 36/38	(2006.01)		
A61K 36/48	(2006.01)		
A61K 36/489	(2006.01)		
A61K 36/296	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03733934 .8**
96 Fecha de presentación: **01.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503777**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **7-Hidroxicromonas como antioxidantes potentes**

30 Prioridad:

03.05.2002 US 138932

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

05.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

05.12.2012

73 Titular/es:

**UNIGEN, INC. (100.0%)
2660 Willamette Drive, N.E.
Lacey, WA 98516, US**

72 Inventor/es:

**JIA, QI y
FARROW, THOMAS M.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 164 T3

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

DESCRIPCIÓN

7-Hidroxicromonas como antioxidantes potentes

CAMPO DE LA INVENCION

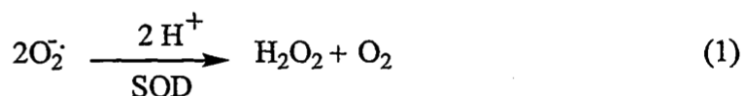
5 La presente invención se refiere al campo de los antioxidantes. Concretamente, esta invención se refiere a la identificación de una clase de compuestos, denominados en la presente memoria 7-hidroxicromonas, que tienen una potente actividad antioxidante. Más en concreto, esta invención se refiere a un método para prevenir y tratar enfermedades y afecciones relacionadas con daños de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y de otros procesos de oxidación mediante la administración de una o más 7-hidroxicromonas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se producen por procesos fisiológicos normales en el cuerpo y desempeñan una función importante en el flujo de energía y de información en todos los sistemas vivos (Voeikov (2001) *Riv. Biol.* 94: 237-258). Las ERO también desempeñan funciones críticas relacionadas con la inducción intercelular de la apoptosis (Bauer (2000) *Anticancer Res.* 20: 4115-4139), los procesos inflamatorios y las respuestas inmunitarias. Las ERO también se generan como subproductos de procesos metabólicos normales, de aditivos alimentarios, de origen medioambiental, tal como la radiación ultravioleta (Wenk et al. (2001) *Curr. Probl. Dermatol.* 29: 83-94), y del humo del tabaco (Stich et al. (1991) *American Journal of Clinical Nutrition* 53: 298S-304S), y de muchos otros contaminantes. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) incluyen radicales libres relacionados con el oxígeno, tales como superóxido (O_2^-), peróxido (ROO^\cdot), alcoxilo (RO^\cdot), hidroxilo (HO^\cdot) y óxido nítrico (NO^\cdot); y especies no radicales, tales como el oxígeno singulete (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl).

25 Las células tienen mecanismos específicos para mantener la homeostasis y que están constantemente verificando la cantidad de ERO (Mates (2000) *Toxicology* 153: 83-104). Se emplean una serie de vías biológicas diferentes para mantener la homeostasis oxidativa dentro de una célula. Estas vías incluyen la síntesis y el reciclaje de γ -glutamyl-cisteinil-glicina (glutatión, GSH) y la acción de enzimas específicas, tales como la SOD, las catalasas y las peroxidases (Dekene et al. (1989) *Am. J. Physiol.* 257: L163-L173). La generación y el reciclaje del GSH se suele denominar el ciclo del γ -glutamilo (Lieberman et al. (1995) *Amer. J. Pathol.* 147: 1175-1185). Este ciclo, que se ilustra en la figura 1, culmina en la producción del GSH, el antioxidante intracelular que se produce de forma natural. El mantenimiento de la concentración apropiada de GSH es muy importante para el estado de óxido-reducción de la célula.

30 Los aniones superóxido se encuentran en las ERO más reactivas y dañinas producidas por la mitocondria. En consecuencia, la regulación de su producción y neutralización es un componente muy importante para mantener el estado de óxido-reducción celular. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la producción de peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo, a partir de los aniones superóxido, como se ilustra mediante la ecuación 1. El peróxido de hidrógeno producido posteriormente lo reduce a agua la catalasa o la glutatión peroxidasa (GPx) (Wei et al. (2001) *Chin. J. Physiol.* 31: 1-11).



40 Si los procesos que mantienen la homeostasis oxidativa de la célula se desequilibran, la cantidad de radicales libres se volverá peligrosa, porque son moléculas muy reactivas que dañan el ADN, las proteínas y los componentes en las membranas celulares, lo que finalmente conduce a daños celulares por todo el cuerpo y contribuyen a su importante función en el proceso de envejecimiento.

Como resultado de nuestro moderno estilo de vida y dieta, la exposición a los radicales libres está incrementándose considerablemente, lo que tiene un efecto profundo en nuestra vulnerabilidad a las enfermedades. Está bien establecida la importancia del estrés oxidativo y de las enfermedades asociadas en relación con la edad. Los cambios fisiológicos que se producen a medida que envejecemos dan lugar a la pérdida de un equilibrio homeostático entre la generación de las ERO, que ocasionan el daño oxidativo, y la producción de antioxidantes que se sintetizan de forma natural, tal como el glutatión (GSH) y otras enzimas reguladoras (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidases). Como el origen de estas ERO está en la mitocondria, esta pérdida de homeostasis que se produce durante el envejecimiento se conoce como la «teoría mitocondrial del envejecimiento» (Simon (2000) *Annals New York Acad Sci.* 908: 219-225). Los cambios característicos dentro de la mitocondria durante el envejecimiento incluyen una disminución de la expresión de las enzimas Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD), que son responsables de la «neutralización» de los aniones superóxido, muy reactivos y oxidantes, la acumulación de peróxido de hidrógeno, y la reducción de las reservas mitocondriales de glutatión. También disminuye la cantidad de GSH plasmático e intracelular, lo que da lugar, durante el envejecimiento, a un entorno cada vez más oxidante de forma global dentro del cuerpo humano. Este entorno se traduce en una serie de problemas a nivel celular y a nivel del propio organismo, como lo prueba la generación de enfermedades crónicas asociadas al daño oxidativo durante

el envejecimiento.

Por ejemplo, se ha encontrado una disminución de la cantidad de GSH en las personas que padecen enfermedades neurodegenerativas debilitantes tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Los cambios celulares dentro de cada célula incluyen el daño físico de los componentes celulares así como la alteración de las respuestas celulares que son resultado del entorno cada vez más oxidante. El daño físico incluye el daño oxidativo al ADN celular y mitocondrial, y la peroxidación de los lípidos de las membranas celular y mitocondrial. Estos cambios afectan a la integridad de ambos componentes y se traducen en una pérdida de la función. El entorno oxidativo también contribuye a que cambien muchas respuestas génicas (Forsberg et al. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 389: 84-93). Esto ocurre porque algunos factores de transcripción, tales como en NF- κ B y AP-1, están controlados por los cambios del estado de óxido-reducción de las células. Por ejemplo, el factor de transcripción NF- κ B se activa en entornos oxidantes. Así pues, las mínimas alteraciones del estado de óxido-reducción que tienen lugar durante el envejecimiento podrían cambiar considerablemente el modo en el que una célula responde a un estímulo determinado. La alteración de las respuestas puede manifestarse como incremento de la apoptosis, neoplasias malignas o la pérdida de una función que finalmente ocasiona muchas de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Zs.-Nagy (2001) *Annals New York Acad Sci.* 928: 187-199).

Las ERO también desempeñan una función crítica después de una lesión cerebral, pues intervienen en la patología del daño traumático del SNC y de la isquemia cerebral (Lewen (2000) *J. Neurotrauma* 17: 871-890). El estrés oxidativo ocasionado por las ERO en las células endoteliales es la primera afección en la patogenia de muchas enfermedades cardiovasculares (Touyz (2000) *Curr. Hypertens. Rep.* 2: 98-105), enfermedades pulmonares (Berry et al. (2001) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 247-255) y trastornos metabólicos (Takashashi (2000) *Nippon Rinsho* 58: 1592-1597).

La protección de las células del epitelio alveolar y las células del endotelio vascular frente al estrés oxidativo del endotelio pulmonar (Muzykantov (2001) *Antioxid. Redox Signal* 3: 39-62) y vascular (Muzykantov (2001) *J. Control Release* 12: 1-21) se ha investigado mediante la administración de enzimas antioxidantes, tales como la SOD y la catalasa. Se han documentado los efectos beneficiosos de los antioxidantes dietéticos, tales como los resveratroles (Hung et al. (2002) *Br. J. Pharmacol.* 135: 1627-1633) y el ácido α -lipoico (Takaoka et al. (2002) *Clin. Exp. Pharmacol.* 29: 189-194), a la hora de reducir la incidencia de las cardiopatías coronarias, y el hidroxitolueno butilado y el β -caroteno en la fotocarcinogenia (Black (2002) *Front Biosci.* 7: D1044-1055). Incluso aunque los antioxidantes pueden reducir los radicales libres generados por la radioterapia y la quimioterapia, no hay pruebas que sugieran que interfieren con el tratamiento convencional del cáncer. Los resultados clínicos indican que los pacientes con cáncer a los que se administra antioxidantes muestran mayor tolerancia y menor generación de efectos secundarios durante el tratamiento, y además viven más tiempo y tienen una mayor calidad de vida (Lamson et al. (1999) *Altern. Med. Rev.* 4: 304-329). Aunque estas enfermedades representan ejemplos extremos, está bien documentado que una característica del proceso de envejecimiento es que se desplaza el estado de óxido-reducción hacia un entorno oxidativo. Por consiguiente, a la persona media le resulta beneficioso mantener un equilibrio oxidativo homeostático. Debido a que el daño oxidativo que se produce durante el proceso de envejecimiento puede estar vinculado directamente a los aspectos patológicos de estas enfermedades, controlar o restaurar el equilibrio homeostático del estado oxidativo tiene un gran interés para la industria médica en conjunto. Por consiguiente, los antioxidantes ocupan un lugar por derecho propio dentro del terreno de la DSHEA (Dietary Supplemental Health and Education Act), como queda probado por el número de productos antioxidantes comercializados en el mercado del anti-envejecimiento.

Los mecanismos antioxidantes de defensa son específicos de especie y muy influidos por la nutrición, ya que los principales antioxidantes, tales como el ácido ascórbico y el α -tocoferol, no lo pueden sintetizar los humanos y, por consiguiente, se deben obtener de la dieta (Benzie (2000) *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61). Los antioxidantes son complementos dietéticos muy populares en la industria de la nutrición y de los productos cosmeticéuticos. Los tipos de productos ascendidos a antioxidantes incluyen las vitaminas (a saber, Vc, Ve, Vb, β -caroteno), minerales (a saber, selenio), aminoácidos (a saber, lisina, cisteína, N-acetilcisteína, ácido lipoico), ácidos fenólicos (a saber, curcumina, resveratrol, catequinas, EGCG), flavonoides (a saber, rutina, quercetina, etc.) (Pietta (2000) *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042), antocinadinas, picrogenol, derivados de la coumarina, polifenoles (a saber, taninos) y muchos tipos diferentes de extractos vegetales. Los productos antioxidantes incluyen ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aminoácidos de especialidad, que se alega que sirven para desde reducir el riesgo de cardiopatías hasta para tratar problemas de las articulaciones y aliviar la depresión. El β -caroteno es un antioxidante importante, que se ha demostrado que reduce el riesgo de cáncer de próstata. El β -caroteno está disponible principalmente en los complementos dietéticos, específicamente en las formulaciones multivitamínicas y en las cápsulas de gel blando con una sola entidad. El producto es un antioxidante popular, pensado para ayudar a prevenir muchas enfermedades.

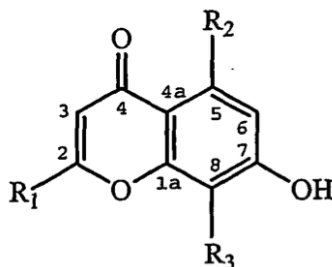
El licopeno, un producto fitoquímico muy prometedor de la familia del β -caroteno, está recibiendo cada vez más atención debido a que promete ser un antioxidante. El nuevo producto, Lycopene 5% TG, ya está disponible en formulaciones multivitamínicas, antioxidantes, convencionales y masticables. Sabinsa Corp. ha desarrollado un nuevo extracto incoloro de raíz de cúrcuma, los tetrahidrocurcuminoides (THC), para el uso como complementos dietéticos y productos cosmeticéuticos como un bioprotector y antioxidante versátil que no tiñe. Los THC son depuradores de radicales libres, que previenen las reacciones en cadena de los radicales libres al neutralizar los radicales libres existentes y/o mantener un entorno reductor alrededor de las células y prevenir la formación de

radicales libres; y actúa como un atrapador para generar complejos inactivos con metales prooxidantes. Se alega que algunos antioxidantes mejoran la capacidad protectora de la pared celular, por lo que refuerzan la defensa de las células frente a los radicales libres y reparan el daño que los radicales libres provocan en las células. No obstante, no hay muchos datos científicamente significativos que prueben la eficacia de estos antioxidantes.

- 5 El ensayo de la capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC, por su nombre en inglés) es un método que mide la actividad antioxidante total en el suero (Cao et al. (1993) *Free Rad. Biol. Med.* 14: 303-311). Se puede utilizar para medir cuantitativamente la capacidad antioxidante total, así como medir cualitativamente la cantidad de antioxidantes de acción rápida frente a los de acción lenta en una muestra de suero de sangre. El ensayo utiliza la β-ficoeritrina (β-PE), una proteína indicadora fluorescente sensible a los radicales libres, para monitorizar la eficacia de los distintos antioxidantes séricos a la hora de impedir que la β-PE sea vea dañada por los radicales libres. Los resultados del ensayo se cuantifican al permitir que la reacción termine y luego se integra el área bajo la curva cinética respecto a una reacción en blanco que no contiene antioxidante. El área bajo la curva es proporcional a la concentración de todos los antioxidantes presentes en la muestra (DeLang y Glazer (1989) *Analyt. Biochem.* 177: 300-306).
- 15 El ensayo de la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC, por su nombre en inglés) es un método para medir la capacidad que tiene una muestra a la hora de inhibir el inicio y la propagación de una reacción espontánea de peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos representa el mecanismo principal de destrucción de lípidos que tiene lugar en un organismo. Esta reacción también es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno. En parte, la peroxidación de lípidos está controlada *in vivo* por:
- 20 1) El atrapamiento de metales traza, tales como el hierro y el cobre, que intervienen en el inicio de las reacciones de la peroxidación de lípidos; y
 - 2) La presencia de antioxidantes que detienen la reacción de propagación una vez que se ha iniciado.

Se cree que la peroxidación de lípidos es una de las principales reacciones destructoras, que se lleva a cabo en los componentes plasmáticos y en las paredes de los vasos sanguíneos, lo que desencadena la enfermedad cardiovascular (Riemersma et al. (1991) *Lancet* 337: 1-5). Así pues, una función importante de los antioxidantes y de los componentes atrapadores de metales en el suero es la protección de todo el aparato circulatorio mediante el control de la peroxidación de lípidos (Stampfer et al. (1993) *New England Journal of Medicine* 328: 1444-1449; Rimm et al. (1993) *New England Journal of Medicine* 328:1450-1456). Se conocen bien los atrapadores de metales, tales como la ferritina para el hierro y la metalotioneína para el cobre, pero otros constituyentes del suero, tales como el urato, que pueden atrapar el hierro, pueden ser importantes también (Maples et al. (1988) *J. Biol. Med.* 263: 1709-1712). Los antioxidantes, tales como el α-tocoferol, se sabe que impiden la propagación de las reacciones de peroxidación de lípidos, pero pueden existir muchos otros constituyentes del suero que podrían ser igual o incluso más importantes que el α-tocoferol (Stahelin et al. (1984) *Journal of the National Cancer Institute* 73: 1463-1468). El ensayo LPIC mide la capacidad que tiene una muestra para inhibir y detener una reacción de peroxidación de lípidos. El valor de LPIC complementa el valor de ORAC. El ensayo ORAC proporciona información sobre la capacidad antioxidante total, mientras que el ensayo LPIC proporciona información sobre la capacidad antioxidante total y sobre el estado de los catalizadores metálicos a la hora de proteger con eficacia frente a las reacciones de la peroxidación de lípidos *in vivo*.

Las cromonas son un tipo específico de compuestos aromáticos que tienen una benzopirán-4-ona en su esqueleto estructural principal, como se ilustra mediante la siguiente estructura general:



en la que

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenoilo, oxoalquilo, oxoaquenoilo, hidroxialquilo, hidroxialquenoilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de los grupos de sustitución mencionados, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo de los mismos; glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de un sólo azúcar o de una combinación de varios azúcares que incluyen, pero sin limitarse a ellas, aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa y sus derivados químicos de los mismos; cromonas diméricas, triméricas y de otra polimerización;

en donde dicho grupo alquilo y/o alqueno es una cadena ramificada y/o lineal que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces en diferentes posiciones;

X se selecciona entre el grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero sin limitarse a ellos, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato, etc; y

5 R es un grupo alquilo que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono.

Hasta la fecha sólo se han aislado 183 cromonas de fuentes naturales (*The Combined Chemical Dictionary*, Chapman & Hall/CRC, Versión 5: 1 de junio de 2001).

Se ha descrito que las cromonas muestran actividad inhibidora de la monoamino oxidasa (Fujimoto et al. (2002) *Chem. Pharm. Bull.* 50: 330-336), actividad inhibidora de la tirosinasa (Piao et al. (2002) *Chem. Pharm. Bull.* 50: 309-311), efectos antiplaquetarios (Leoncini et al. (1991) *Pharmacol. Res.* 23: 139-148), actividad inhibidora de la fosfatidilinositol-3-cinasa (Pong et al. (1998) *J. Neurochem.* 71: 1912-1919; Blommaert et al. (1997) *Eur. J. Biochem.* 243: 240-246), actividad inhibidora del crecimiento frente a patógenos orales (Cai (1996) *J. Nat. Prod.* 59: 987-990), actividad inhibidora de la prostaglandina H sintasa (Jurenka et al. (1989) *Comp. Biochem.* 93: 53-255). Las cromonas también poseen eficacia terapéutica contra la artritis inducida por el colágeno de tipo II en las ratas (Inaba et al. (2000), *Chem. Pharm. Bull.* 48: 131-139) y actividad hipolipidémica (Witiak et al. (1975) *J. Med. Chem.* 18: 934-942; Tetko et al. (1995) *Bioorg Khim.* 21: 809-815). También se ha descrito que las cromonas son capaces de funcionar como ligandos selectivos del receptor σ (Erikson et al. (1992) *J. Med. Chem.* 35: 1526-1535). Basándose en los estudios con animales, las cromonas se absorben y se metabolizan con facilidad (Crew et al. (1976) *Xenobiotica* 6: 89-100) y el enlace de c-glucosilo de la aloesina lo pueden escindir las bacterias intestinales de los humanos (Che et al. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* 39: 704-708).

El aloe es una planta enrevesada que contiene muchas sustancias biológicamente activas (Cohen et al. en *Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects*, 1.^a ed., WB Saunders, Filadelfia (1992)). Se conocen más de 300 especies de aloe, la mayoría de las cuales son indígenas de África. Los estudios han demostrado que las sustancias biológicamente activas se localizan en tres secciones independientes de la hoja de aloe: una tira de gel transparente localizada en el centro de la hoja, en la piel de la hoja o en la corteza de la hoja, y en un líquido amarillo contenido en las células pericíclicas de los haces vasculares, localizado entre la piel de la hoja y la tira de gel interna, denominada el látex. Históricamente, los productos del aloe se han utilizado en aplicaciones dermatológicas para el tratamiento de quemaduras, úlceras y otras heridas. Estos usos han estimulado una gran cantidad de investigaciones para la identificación de compuestos de las plantas de aloe que tienen actividad clínica, en particular actividad antiinflamatoria (véase, p. ej., Grindlay y Reynolds (1986) *J. of Ethnopharmacology* 16: 117-151; Hart et al. (1988) *J. of Ethnopharmacology* 23: 61-71). Como resultado de estos estudios, se han descrito muchos compuestos de aloe que tienen diversas actividades biológicas, entre ellas actividad antitumoral, actividad contra la úlcera gástrica, actividad anti diabética, actividad antitirosinasa (véase, p. ej., Hirata y Suga et al. (1977) *Z. Naturforsch* 32c: 731-734) y actividad antioxidante (Yu y Lee, patente de los EE.UU. n.º 5 939 395).

Se ha descrito que las cromonas aisladas de diferentes especies de *Aloe* tienen distintas actividades biológicas. Se ha descrito que la aloesina (figura 2) inhibe la actividad tirosinasa (Jones et al. *Journal of Pigment Cell Research*, aceptado el 10 de febrero de 2002) e induce la actividad cinasa dependiente de la ciclina E (Lee et al. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41: 285-292). Una C-glucosil-cromona aislada de *Aloe barbadensis* muestra actividad antiinflamatoria (Hutter et al. (1996) *J. Nat. Prod.* 59: 541-543) y actividad antioxidante similar a la del α -tocoferol, basándose en un modelo de homogeneizados de cerebro de rata (Lee et al. *Free Radic Biol. Med.* 28: 261-265).

Las hojas de *Aloe barbadensis* y sus principios amargos muestran efectos sobre la glucemia en los ratones normales y en los ratones diabéticos por aloxano (Ajabnoor (1990) *J. Ethnopharmacol.* 28: 215-220), y la savia seca de distintas especies de *Aloe* muestra actividad anti diabética en los estudios clínicos (Ghannam, (1986) *Horm Res.* 24: 288-294).

Yagi et al. describen un grupo de compuestos aislados del aloe, en particular la aloesina y uno de sus derivados, la 2"-O-feruloilaloesina, que son inhibidores eficaces de la tirosinasa (Yagi et al. (1987) *Plant Medica* 515-517). El análisis bioquímico de la inhibición enzimática mediante la representación de Lineweaver-Burk demostró que la 2"-feruloilaloesina era un inhibidor acompetitivo de la tirosinasa, mientras que la aloesina es un inhibidor competitivo. La aloesina es una 5-metilcromona C-glucosilada (Holdsworth (1972) *Chromones in Aloe Species, part I-Aloesin PM* 19 (4): 322-325). *In vitro*, la aloesina es un fuerte inhibidor de la actividad tirosinasa (Yagi et al. (1987) *Planta Medica* 515-517). En los ensayos de la actividad tirosinasa sobre el sustrato L-DOPA, la aloesina es capaz de inhibir al 50% a una concentración de 0,2 mM.

La patente de los Estados Unidos n.º 6 083 976, titulada «Method of Synthesis of Derivatives of Aloesin», describe un nuevo método para la síntesis de derivados de la aloesina por alquilación del grupo hidroxilo en C-7. Las aloesinas alquiladas producidas con este método tiene la funcionalidad de la aloesina, un compuesto inhibidor de la tirosinasa con actividad blanqueadora de la piel, pero tienen una mayor actividad biológica que la aloesina, según indican los ensayos de la tirosinasa *in vitro*. Adicionalmente, el grupo alquilo hace que los derivados de la aloesina sean más liposolubles que la aloesina, lo que les permite mantenerse en la capa córnea de la piel con más eficacia

que la aloesina. Como resultado, las aloesinas alquiladas son agentes blanqueadores de la piel de acción más rápida y más potentes que la aloesina.

La patente de los Estados Unidos n.º 6 123 959, titulada «Aqueous Composition Comprising Active Ingredients for the De-pigmentation of the Skin», describe composiciones acuosas que comprenden liposomas de fosfolípidos y al menos un inhibidor competitivo de una enzima para la síntesis de melanina, en combinación con al menos un inhibidor incompetitivo de una enzima para la síntesis de melanina. Los inhibidores competitivos de la invención incluyen la aloesina y los derivados de la misma. La invención también incluye el uso de las composiciones para la despigmentación de la piel.

Hasta la fecha, los métodos conocidos para purificar la aloesina así como otras cromonas, implican la utilización de la cromatografía (véase, p. ej., Rauwald y Beil (1993) *J. of Chromatography* 639: 359-362; Rauwald y Beil (1993) *Z. Naturforsch* 48c: 1-4; Conner et al, (1990) *Phytochemistry* 29: 941; Holdsworth (1972) *Chromones in Aloe Species, Part I-Aloesin* PM 19 (4): 322-325; Mebe (1987) *Phytochemistry* 26: 2646; Haynes et al. (1970) *J. Chem. Soc. (C)* 2581; McCarthy y Haynes (1967) *The Distribution of Aloesin in Some South African Aloe Species*; Heft 3 342). Estos procedimientos se desarrollaron para el análisis químico y no son prácticos para la producción de la aloesina a escala preparativa. En la solicitud de patente de los EE.UU. de n.º de serie 09/792 104, registrada el 26 de febrero de 2001, titulada «Method of Purification of Aloesin», se describe un método para la purificación de la aloesina mediante cristalización. El solicitante no conoce ningún informe ni sugerencia de un método para la purificación de cromonas desde el aloe ni desde otras especies indicadas con el uso de la cromatografía en columna de LH-20 o de poliamida.

Uma Devi et al. (*Radiation Research* 1999, 1, 74-78) describieron la radioprotección *in vivo* mediante los flavonoides de *Ocimum*. A dos flavonoides, la orientina y la vicenina, aislados de las hojas de la planta india *Ocimum sanctum*, se les comprobó su efecto radioprotector en los ratones. Ambos compuestos proporcionaban protección frente a la muerte por síndrome digestivo así como del síndrome de la médula ósea cuando se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) antes de la exposición de todo el cuerpo a 11 Gy de radiación γ . La dosis farmacológica óptima para la protección fue de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa corporal: un incremento en la dosis del fármaco no incrementó la protección. No se observó ninguna toxicidad inmediata con dosis de hasta 100 mg/kg de masa corporal de cualquiera de los compuestos. Se obtuvo la protección máxima cuando alguno de los compuestos se inyectó por vía i.p. 30 min antes de la irradiación. El cambio de la vía de administración o del intervalo entre la inyección del fármaco (i.p.) y la irradiación redujo la protección. El tratamiento con el fármaco después de la irradiación no fue muy eficaz. La vicenina fue ligeramente mejor que la orientina en cuanto a incrementar la supervivencia a los 30 días; la protección de la vicenina también duró más tiempo. Los factores de modificación de la dosis (FMD) para la DL₅₀ fueron 1,37 para la vicenina y 1,30 para la orientina. Se ha demostrado que la orientina y la vicenina tienen actividad de depuración de radicales, y este parece ser uno de los mecanismos de protección debido a estos flavonoides.

Silva et al. (*Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2002, 17 (1), 45-48) describieron que las 2-estirilcromonas eran inhibidores nuevos de la xantina oxidasa. El propósito de este estudio fue evaluar la inhibición de la xantina oxidasa (XO) producida por algunas 2-estirilcromonas sintéticas. Se sintetizaron 10 derivados polihidroxilados con varios patrones de sustitución, y a éstos y a un control positivo, el alopurinol, se les comprobó si tenían efecto sobre la actividad de la XO mediante la medición de la formación de ácido úrico a partir de la xantina. Las 2-estirilcromonas sintetizadas inhibieron la xantina oxidasa de una manera incompetitiva y dependiente de la concentración. Algunos valores de CI₅₀ encontrados iban desde tan sólo 0,55 M que, en comparación con el CI₅₀ encontrado para el alopurinol (5,43 M), era indicador de que los nuevos inhibidores eran prometedores. Las 2-estirilcromonas que se encontró que eran potentes inhibidores de la XO se deberían evaluar además como posibles agentes para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de la enzima, como es el caso de la gota, la isquemia/daño por reperfusión, la hipertensión, la hepatitis y el cáncer.

Fukuyasu et al. (*Nippon Koshohin Kagakkaishi*, vol 30, n.º 2, 1996, páginas 80-85) describieron los efectos preventivos de la homonotaloína y de la aloesina sobre la depresión inmunitaria inducida por los UV-B. Describieron que el extracto de *Aloe andongensis* (*A. andongensis* ex.) prevenía la supresión de la respuesta de hipersensibilidad por contacto (HSC) mediante irradiación con UV-B en los ratones. Investigaron la capacidad que la homonotaloína y la aloesina, que son constituyentes del *A. andongensis* ex., tenían para impedir la supresión de la respuesta de HSC inducida por los UV-B. Los investigadores impidieron la supresión de la respuesta de HSC inducida por la radiación UV-B. Para explorar el mecanismo de prevención de la depresión inmunitaria provocada por el *A. andongensis* ex., la homonotaloína y la aloesina, utilizaron la línea celular de queratinocitos murinos (PAM212). La inyección intravenosa de sobrenadantes procedentes de las células PAM212 irradiadas con UV-B suprimió significativamente la respuesta de HSC. Por otra parte, no se inhibió la respuesta de HSC con los sobrenadantes procedentes de las células PAM212 irradiadas con UV-B a las que se les añadieron el *A. andongensis* ex. o la aloesina después de la radiación con UV-B. Los autores consideraron que la aplicación del *A. andongensis* ex., de la homonotaloína y de la aloesina disminuye la liberación del inhibidor de la HSC mediada por UV-B desde los queratinocitos irradiados con UV-B, e impide la depresión inmunitaria inducida por los UV-B en los ratones.

La patente japonesa JP10101541 describe una composición cosmética que causa el efecto de embellecimiento porque hace desaparecer de la piel las manchas hepáticas, el oscurecimiento y las arrugas. Esta composición cosmética contiene como ingrediente eficaz el 0,0001-5 % en peso del polisacárido que contiene aminoácidos

(aloesina), que está contenido en una sustancia gelatinosa del centro de las hojas de *Aloe africana*, que pertenece al aloe del Cabo, que es una planta de aloe perteneciente a la familia de las liliáceas, después de retirar la epidermis de las hojas. El polisacárido tiene las propiedades siguientes: a) polvo pardo oscuro o negro poco oloroso y de sabor amargo; b) cuando se disuelven 5 g del polvo en 50 g de agua con calentamiento, se deja reposar para que se enfríe, y se filtra, y se analiza el filtrado de la siguiente forma: (1) cuando se añade bórax al filtrado, y se calienta la solución y se deja reposar para que se enfríe, entonces se añade agua a la solución, y se agita la solución para mezclarla bien, aparece un color fluorescente verde; (2) cuando se añade bromo a la solución, se hace aparecer un precipitado amarillo claro; y (3) cuando se añade ácido nítrico a la solución, se vuelve pardomarrillenta, y poco a poco se va poniendo verde, y torna a pardorrojiza al calentarla.

La patente internacional WO 95/23604 describe composiciones estimuladoras del crecimiento celular que contienen aloesina. Los autores proporcionaron una composición que estimulaba el crecimiento celular, en particular que estimulaba las células epidérmicas y los hepatocitos, que contenía aloesina como ingrediente activo. La aloesina es un componente de *Aloe vera*, para la cual se ha descrito en la técnica anterior un efecto de bloqueo de los rayos ultravioleta en la piel y una actividad inhibidora de la tirosinasa de champiñón. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, ahora se ha identificado que la aloesina tiene el nuevo uso farmacológico como estimulador del crecimiento celular, lo que no se había descrito nunca antes en la técnica.

Occhuito et al. (*Phytotherapy Research* 1991, 5 (1), 9-14) compararon la actividad arritmica y antiisquémica de algunas flavonas en el conejillo de Indias y en la rata. Llevaron a cabo un estudio comparativo de 16 flavonas en 4 modelos experimentales: 1: arritmias ventriculares hipercinéticas inducidas por reperusión en la corazón aislado de rata; 2: arritmias después de la reperusión-ligamiento de la arteria coronaria en los conejillos de Indias anestesiados; 3, arritmias por pitresina con espasmo coronario en los conejillos de Indias anestesiados; y 4: actividad antiisquémica con una técnica de perfusión cardíaca *ex vivo* después de la oclusión coronaria en los conejillos de Indias. Las relaciones entre el efecto y la estructura de flavona, 3-hidroxiflavona, 6-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, 6,7-dihidroxiflavona, 7,8-dihidroxiflavona, apigenina, apiína, diosmina, 5-hidroxiflavona, luteolina, glucósido de luteolina, orientina, pratol, roifolina, vitexina, ensayada como agentes antiarrítmicos y antiisquémicos, se comparó con la lidocaína y el verapamilo a dosis equimolares. Los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de estos compuestos ejercían un efecto protector frente al espasmo coronario y la crisis isquémica inducida por el ligamiento coronario, y frente a las arritmias isquémicas y posisquémicas. En las flavonas ensayadas se encontró que la potencia era dependiente de la estructura.

Prabhakar et al. (*Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1978, 10, supl. 1, 80) describieron los efectos cardiovasculares de la vitexina. A la vitexina (VT), 8-C-B-D-glucopiranosilapigenina, aislada de *Ochrocarpus longifolius* y *Amebia hispidissima*, se le investigó su acción cardiovascular. La VT (0,01-1,0 mg/kg, iv) desencadenó un incremento, independiente de la dosis, de la tensión arterial media (tam 1 de las ratas normotensas anestesiadas). Sin embargo, en las ratas suprarrenalectomizadas bilateralmente, se observó una caída dependiente de la dosis. Con las dosis más altas (1 mg/kg), después de un periodo de latencia de unas 45 series, desencadenó bradicardia e hipotensión continua (30-70%, 2-3 horas). Apareció taquifilaxia con las administraciones consecutivas. En el pico de la caída, la vagotomía bilateral instantánea incrementó la tam al valor normal. La vagotomía bilateral, antes de la administración de la VT, redujo sustancialmente la duración de la hipotensión. La VT incrementó significativamente la velocidad y la profundidad de la respiración. Potenció la hipotensión inducida por la isoprenalina e inhibió la respuesta hipertensora de la nicotina en las ratas anestesiadas. La VT indujo efectos cronótrpos e inótrpos negativos sobre el corazón aislado de conejo, rata y rana; no se vieron afectados por la atropina. En la perfusión *in situ* del corazón de gato y de la extremidad posterior de rata no se produjo una acción apreciable. Los resultados sugieren que la VT, al igual que la nicotina, tiene unas propiedades bloqueadoras y estimuladoras de los ganglios.

Alves et al. (*Journal of Molecular Structure*, 1999, 491, 123-131) describieron un estudio estadístico y de química cuántica de los compuestos de flavonoides con actividad anti-VIH. Se emplea el método PM3 semiempírico de orbitales moleculares para calcular una serie de propiedades moleculares (variables) de 21 compuestos flavonoides con actividad anti-VIH. Se emplearon técnicas de reconocimiento de patrones, análisis de componentes principales (PCA, por su nombre en inglés) y análisis de aglomeración jerárquica (HCA, por su nombre en inglés) para reducir la dimensionalidad e investigar qué subconjunto de variables sería más eficaz para clasificar los compuestos flavonoides de acuerdo con su grado de actividad anti-VIH. Los estudios de componentes principales y de aglomeración jerárquica demostraron que las variables LUMO (la energía más baja del orbital molecular sin ocupar), X (electronegatividad), y Q2, Q3 y Q7 (cargas en los átomos 2, 3 y 7) estaban relacionadas con los compuestos de mayor actividad anti-VIH. Estas variables juntan los flavonoides más activos en un agrupamiento y los mantiene separados de los que son menos activos cuando se emplean el análisis de componentes principales y el análisis de aglomeración jerárquica.

El documento S120073 describe nuevos policétidos, derivados de piranona, que tienen la fórmula I, en donde A y B tienen los significados que se describen en la descripción, y cada uno de los nuevos policétidos derivados de la piranona contiene un grupo carboxamida. Los nuevos policétidos pueden utilizarse bien independientemente o como intermedios de la síntesis de nuevos compuestos biológicamente activos que ejercen una posible actividad terapéutica. El documento S120073 se refiere a nuevos policétidos, derivados de piranona, que tienen la fórmula I, en donde A y B tienen los significados que se describen en la descripción, y cada uno de los nuevos policétidos

derivados de la piranona contiene un grupo carboxamida. Los policétidos pueden utilizarse independientemente o bien como intermedios de la síntesis de nuevos compuestos biológicamente activos que ejercen una posible actividad terapéutica.

5 La patente internacional WO 95/05169 describe derivados de flavonoides y biflavonoides, sus composiciones farmacéuticas y su actividad ansiolítica. Algunos flavonoides, en especial los derivados de flavona, crisina y apigenina junto con dímeros de los mismos, tales como la amentoflavona, se ha encontrado que poseen propiedades ansiolíticas (a saber, propiedades reductoras de la ansiedad) sin presentar un efecto sedante. Los compuestos se definen por la fórmula general (I) en donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₈ se seleccionan independientemente entre H, OH, R, NO₂, halo, OR, NH₂, NHR, NR₂, COOR, COOH, CN o un grupo de azúcar; R₆ y 10 R₇ son ambos H, o R₆ y R₇ forman juntos un enlace simple; R es alquilo(C₁₋₆) o alqueno(C₁₋₆); o la administración de una cantidad no tóxica eficaz de un biflavonoide que es un dímero de un compuesto de fórmula general (I).

15 La patente de los EE.UU. US-B1-6 306 383 describe un método para el tratamiento tópico de las cicatrices con inhibidores de la proteína cinasa C. La patente de los EE.UU. US-B1-6 306 383 se refiere al tratamiento tópico de queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices por quemaduras mediante el uso de un inhibidor concreto de la proteína cinasa C y un agente penetrante eficaz seleccionado entre organogel de lecitina u organogel de lecitina poloxámero 407. Los inhibidores de la proteína cinasa C se pueden seleccionar entre esfingosina, esfinganina, fitoesfingosina, N-acetilesfingosina, N-hexanoilesfingosina, N-octanoilesfingosina, curcumina, tetrahidrocurcumina, curcuminoides o apigenina.

20 En *Annual Drug Data Report*, 1991, 13 (7), 583, RC-3911 se describe que la 2-(dietilamino)-7-hidroxicromona es un agente que impide la agregación plaquetaria.

En *Annual Drug Data Report* 1999, 21 (9), 770, 278844 se describe que la *N,N*-dipropil-6,11-dihidro-1-benzotiopirano-[4,3-b]-indol-6-carboxamida es un ansiolítico.

25 Uma Devi et al. (*Radiation Research* 2000, 154, 455-460) describieron la protección de la radiación con los flavonoides de *Ocimum* orientina y vicenina. En los estudios anteriores, los flavonoides orientina y vicenina, que se aislaron del extracto de la hoja de *Ocimum sanctum*, se encontró que protegían a los ratones de la lesión por radiación. Se sabe que varios flavonoides son buenos antioxidantes. Por consiguiente, se estudió el efecto de la orientina y la vicenina sobre la peroxidación *in vivo* de lípidos inducida por la radiación y su actividad antioxidante *in vitro*. A los ratones adultos se les inyectó por vía intraperitoneal 50 µg/kg de orientina o vicenina y se expuso todo el cuerpo a 3 Gy de radiación γ. Se midió la peroxidación lipídica en el hígado de 15 min a 8 h después de la irradiación. La actividad antioxidante de la orientina/vicenina (10-500 µM) se estudió con la medición de la inhibición de los radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton (Fe³⁺-EDTA-ácido ascórbico-H₂O₂) *in vitro*. También se comprobó si los compuestos tenían una posible actividad de atrapamiento del hierro y favorecedora de la oxidación a las concentraciones anteriores en el sistema *in vitro*. La orientina y la vicenina proporcionaron una protección casi igual frente a la peroxidación lipídica inducida por la irradiación en el hígado de ratón. Ambos 30 compuestos mostraron una actividad inhibidora de radicales libres *in vitro* significativamente mayor que el DMSO. Ni la orientina ni la vicenina mostraron ninguna actividad favorecedora de la oxidación a las concentraciones ensayadas. Ambos compuestos inhibieron la formación de radicales libres en ausencia de EDTA. Estos flavonoides parece probable que tengan un mecanismo de protección frente a la radiación basado en la depuración de los radicales libres.

40 Constantino et al. (*Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, 42, 1881-1893) describieron que los antioxidantes de 1-benzopiran-4-ona eran inhibidores de la aldosa reductasa. Comenzando desde la actividad inhibidora del flavonoide quercetina, se sintetizaron una serie de derivados de la 4H-1-benzopiran-4-ona y se les ensayó su capacidad de inhibición de la aldosa reductasa, una enzima que interviene en la aparición de las complicaciones diabéticas. Algunos de los compuestos obtenidos muestran una actividad inhibidora similar a del sorbinil, pero son más selectivos que la quercetina y el sorbinil respecto a la enzima estrechamente relacionada, la aldehído reductasa, y también poseen actividad antioxidante. Resulta notable que estos compuestos posean unos valores pKa más altos que los ácidos carboxílicos, una característica que podría hacer que la farmacocinética de estos compuestos sea muy interesante. Se realizaron investigaciones de modelado molecular sobre las estructuras de los inhibidores fijados al centro activo de la aldosa reductasa para sugerir cómo podrían fijarse estos nuevos inhibidores a la enzima 45 y también para interpretar las relaciones entre la actividad y la estructura.

50 La patente internacional WO 01/30342 A1 describe flavonas que son inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 y activadores del canal de potasio. La patente internacional WO 01/30342 A1 se refiere a un método para inhibir la expresión de iNOS o de COX-2, o ambas, en los mamíferos mediante compuestos de flavona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La patente internacional WO 01/30342 A1 también se refiere a un método de activación de canales de K⁺ en los mamíferos; así como a métodos para tratar el choque septicémico, para inhibir la expresión de la enzima convertidora de angiotensina, para tratar o prevenir aneurismas y para reducir la inflamación y los cambios patológicos relacionados con la utilización de estos compuestos. Los compuestos preferentes en la presente memoria son oroxilina A (5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona) y wogonina (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavona).

- Budzianowski et al. (*Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* 1991, 43, 395-401) describieron estudios sobre la actividad antioxidante de algunas C-glucosilflavonas. Para estudiar sus propiedades antioxidantes se sintetizaron a partir de fracciones de flavonoides de *Adonis vernalis* L. y especies de *Crataegus*, o se han aislado de *Stellaria media* (>.) Vill. 10 derivados de flavonoides por C-glucosilación: orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina 7,2"-di-O-glucósido, isovitexina 7-O-galactósido-2"-O-glucósido, dos 6,8-di-C-hexosilapigeninas diferentes, y dos 6-C-hexosil-8-C-pentosilapigeninas diferentes. Sólo se encontraron propiedades antioxidantes en dos compuestos: orientina e isoorientina.
- La patente de los EE.UU. US-A-6 083 976 se refiere a un método de síntesis de derivados de la aloesina que están alquilados en el grupo C-7. La patente de los EE.UU. US-A-6 083 976 incluye las aloesinas modificadas producidas por el método y la utilización de estos compuestos como blanqueadores de la piel.
- La patente de los EE.UU. US-A-5 939 395 se refiere a la identificación de un potente antioxidante de *Aloe barbadensis*. La patente de los EE.UU. US-A-5 939 395 se refiere a un método para proporcionar un compuesto antioxidante a un paciente que lo necesita, que comprende la administración de un compuesto fenólico aislado de *Aloe barbadensis*, y a los métodos para aislar el compuesto fenólico.
- Qaraabaadeen Najm-al-Ghani por Mohammad Najmul Ghani Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL A NA4/3926 1928) describe Habb-e-Nuzool-al-maa, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del ingrediente siguiente: vitriolo azul/sulfato de cobre (Aaboos/Tootiya-e-Sabz/Heera Kasees / Tootia/Sang-e-Surmah/Hajar-al-Kohl), *Acacia catechu* (Linn. f.) Willd. (Khair/Kath Safaid) (catechu), *Terminalia chebula* Retz. (Halelah) jmyrobalan, (negro, amarillo, marrón), *Chebulic Myrobalan*, potash alum (Zaaj-e-Safaid/Zaaj-e-Abyaz/Phitkari/Shibb), agua (Aab).
- Bharata Bhasajya Ratnakara, recopilado por Naginadasa Chaganalala Saha (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AB/1048, 1999) describe Khadiraradikasayah, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: *Acacia catechu* (Linn. f.) Willd. (khadira) (catechu). *Acacia polyacantha* Willd. Sin.: *A. suma* Buch. Ham. ex Voigt (svetakhadira, kadara) (catechu), *Areca catechu* Linn. (puga) (palma de betel).
- Qaraabaadeen Azam wa Akmal por Mohammad Akmal Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AH5/3559, 1909) describe Marham Sartaan, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los siguientes ingredientes: cinabrio (Shanjraf/Shangraf/Zanjafar), *Piper nigrum* Linn. (Filfil (Safaid/Siyah)) (pimienta negra), *Acacia catechu* (Linn. f.) Willd. (Khair/Kath Safaid) (catechu). *Curcuma longa* (Zard Chob/Haldi/Urooq al Sufr/Urooq al Zafraan) (cúrcuma común. Cúrcuma), *Cydonia oblonga* (Behi/Safarjal) (membrillo), mercurio (Abularwaah/Seemaab/Paara/Zamzam), cera de abeja/Cera alba (Mom-e-Sufaid), mantequilla clarificada (Roghan-e-Zard/Ghee).
- Qaraabaadeen Azam wa Akmal por Mohammad Akmal Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL BA3/870, 1909) describe Kuhal Bara-e-Nuzool-ul-Maa-2, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: *Aloe barbadensis* Mill. (Gheekawaar/Sibr) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad), gallina (Maakiyaan/Murghi/Dajaajah). Leche humana/Lactus (Sheer-e-Zanaan).
- Muheet-e-Azam Vol. IV (Parte I) por Mohammad Azam Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL FA1/328E1, 1899) describe Nuskha-e-zulal, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: *Aloe barbadensis* Mill. (Gheekawaar/Sibr) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad).
- Qaraabaadeen Azam wa Akmal por Mohammad Akmal Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AH5/2694, 1909) describe Qairooti Bara-e-Sartaan, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: cera de abejas/Cera (Mom), *Viola odorata* Linn. (Banafsha) (violeta dulce), *Cydonia oblonga* (Behi/Safaijal (membrillo). Cabra (Buz/Ma'z), *Nepta orientalis* (Zufa Ratab), *Aloe barbadensis* Mill. (Gheekawaar/Sibr) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad), *Curcubita moschata* (Duchesne) Poir. (Kadu), *Salix alba* Linn. (Bed Saadah) (sauce amarillo, sauce blanco), *Malva sylvestris* Linn. (Khubbazi/Malookhiyah).
- Rasatarangini por Sadanandasarma (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AK1/710, 2000) describe Amrtarasayanam, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: *Aconhuh chasmanthum* Stapf & Holmes / *Aconhuh ferox* Wall, ex Sen (srrtigika viṣa) (acónito de la India), magnetita / ferromagnético (kanta pa? ar»a/lauha). Mica / Biotita (abhakra), pirita de cobre / calcopirita (maksika). Sulfuro rojo de mercurio preparado con oro (Svarna sindura / Makardhwaja), plata (rajata), estaño / *Stannum* (vaitiga). *Acacia catechu* (Linn. (.)) Willd. (khadira) (catechu). *Zingiber officinale* Roscoe (ardraka, surithi) (jengibre de jardín, jengibre), *Aloe barbadensis* Mill. (kumari) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad).
- Qaraabaadeen Azam wa Akmal por Mohammad Akmal Khan (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AH5/252D, 1909) describe Nuskha-e-marham, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o

de los ingredientes siguientes: *Aloe barbadensis* Mill. (Gheekawaar/Sibr) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad), *Basella alba* Linn. (Poi/Bachla) (espinaca de Ceilán).

5 Bhaisajya Ratnavall por Govinda Dasa (ATRIBUTOS CLAVE DE TKDL AK/1521, 2001) describe Caturbhujar-asah, una formulación terapéutica con un único compuesto que consiste en partes útiles del o de los ingredientes siguientes: HgS procesado (Rasa sindura). Oro (svarna), rejalgar/sulfuro arsénico rojo (manahsiia), almizcle (kasturi), oropimente/trisulfuro arsénico (haritala), *Aloe barbadensis* Mill. (kumari) (aloe de Barbados, aloe de la India, aloe de Curacao, aloe de Jaffarabad).

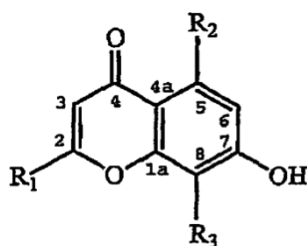
COMPENDIO DE LA INVENCION

10 La presente descripción describe la identificación y purificación de 7-hidroxicromonas que muestran una potente actividad antioxidante. La presente descripción incluye un método para proporcionar un antioxidante a un hospedador que lo necesita, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una 7-hidroxicromona o una mezcla de 7-hidroxicromonas.

15 La presente invención también incluye métodos que son eficaces para inhibir la peroxidación de lípidos a través de la supresión simultánea de la generación de radicales libres y de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). El método para inhibir la peroxidación de lípidos comprende administrar una composición que comprende una 7-hidroxicromona o una mezcla de 7-hidroxicromonas a un hospedador que lo necesita.

20 La presente invención también incluye métodos para prevenir y tratar enfermedades y afecciones mediadas por las ERO y enfermedades y afecciones asociadas a otros procesos oxidativos. El método para prevenir y tratar las enfermedades y afecciones mediadas por ERO y las enfermedades y afecciones asociadas a otros procesos oxidativos comprende la administración, a un hospedador que lo necesita, de una cantidad eficaz de una composición que comprende una 7-hidroxicromona o una mezcla de 7-hidroxicromonas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las 7-hidroxicromonas que se pueden utilizar de acuerdo con lo siguiente incluyen compuestos ilustrados por la estructura general siguiente:



25 como se define en la reivindicación 1.

En una realización preferente de esta invención, la 7-hidroxicromona se selecciona entre aloesina (figura 2) o aloerresina A (figura 3).

30 Las 7-hidroxicromonas de esta invención se pueden obtener por métodos sintéticos o se pueden aislar de géneros de numerosas familias de plantas, entre ellas, *Acacia*, *Adina*, *Aloe*, *Alternaria*, *Amoora*, *Antidesma*, *Artemisia*, *Baeckia*, *Cassia*, *Clusea*, *Cnidium*, *Convolvulus*, *Epinedium*, *Eriosema*, *Eriostemon*, *Eugenia*, *Garcinia*, *Hypericum*, *Lindenbergia*, *Pancratium*, *Penicillium*, *Polygonum*, *Ptaeroxylon*, *Rheum*, *Sophora*, *Stephanitis*, *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*. En una realización preferente, la planta se selecciona entre el grupo que incluye *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremonophila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera var. chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baeckia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygonum cuspidatum*, *Saphora tomentosa* y *Stephanitis rhododendri*.

40 Las 7-hidroxicromonas se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, tallos, corteza de tallos, troncos, corteza de troncos, ramitas, tubérculos, raíces, corteza de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas.

El método de esta invención puede utilizarse para tratar o prevenir una serie de enfermedades y afecciones mediadas por las ERO, entre ellas, arterioesclerosis, cardiopatías coronarias, cataratas, demencia, enfermedad de Alzheimer, disfunción cognitiva, diabetes sacarina, cáncer y melanoma.

45 Las composiciones de esta invención se pueden administrar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Los modos de administración incluyen, pero sin limitarse a ellos, administración (oral) enteral, administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y aplicación tópica. Los métodos de tratamiento de acuerdo con esta invención comprenden la administración por vía interna o tópica, a un paciente que lo necesita,

de una cantidad terapéuticamente eficaz de una y/o de una mezcla de varias 7-hidroxicromonas aisladas de una única fuente o varias fuentes, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, la obtención mediante síntesis, la producción de forma natural, o una combinación de las mismas.

- 5 La presente descripción también incluye un método mejorado para el aislamiento y la purificación de las cromonas, en particular las 7-hidroxicromonas, a partir de plantas que contienen estos compuestos. El método comprende: a) extraer la biomasa molida de una planta que contiene una cromona, en particular una 7-hidroxicromona; b) neutralizar y concentrar dicho extracto; y c) purificar dicho extracto neutralizado y concentrado mediante un método cromatográfico que incluye, pero sin limitarse a ellos, cromatografía en fase inversa, en poliamida, o en LH-20. En una realización preferente se purifica el extracto mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en retrocristalización, precipitación, reparto de solventes y/o separación cromatográfica. La presente descripción da a conocer un procedimiento comercialmente viable para el aislamiento y la purificación de cromonas que tienen una actividad fisiológica deseable.

Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada que viene a continuación sólo son ejemplares y explicativas, y no restringen lo que se reivindica en la invención.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la figura 1 se representa esquemáticamente un ciclo del γ -glutamilo.

En la figura 2 se representa el cromatograma de la aloesina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En la figura 3 se representa el cromatograma por HPLC de la aloerresina A.

- 20 En la figura 4 se ilustra gráficamente el valor de ORAC total de las cromonas de aloe aloesina y aloerresina A respecto al extracto de semilla de uva y al extracto de té verde.

En la figura 5 se ilustra gráficamente las actividades antioxidantes rápida y lenta de las cromonas de aloe aloesina y aloerresina A respecto al extracto de semilla de uva y al extracto de té verde.

- 25 En la figura 6 se ilustra gráficamente la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) que tiene la aloerresina A respecto a la vitamina C y al α -tocoferol.

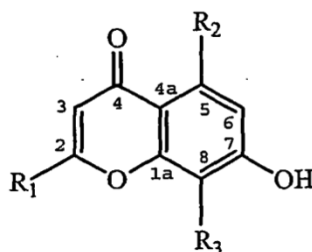
En la figura 7 se representa gráficamente la mejora del valor de ORAC que presenta una bebida de Mentaberry después de añadirle el 1% y el 5% de aloerresina A.

En la figura 8 se representa la mejora de la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos que presenta una fórmula antioxidante después de añadirle aloerresina A.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente memoria se utilizan diferentes términos para referirse a los aspectos de la presente invención. Para ayudar a que quede clara la descripción de los componentes de esta invención, se proporcionan las definiciones que vienen a continuación.

- 35 Las «cromonas» son una clase específica de productos naturales que tienen por esqueleto estructural principal una benzopiran-4-ona como la ilustrada por la estructura general siguiente:



en la que

- 40 R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenoilo, oxoalquilo, oxoalquenoilo, hidroxialquilo, hidroxialquenoilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, ésteres de los grupos de sustitución mencionados, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo de los mismos; glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de uno solo o de una combinación de varios azúcares que incluyen, pero sin limitarse a ellos, aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa y sus derivados químicos de los

mismos; cromonas diméricas, triméricas y de otra polimerización;

cuando dicho grupo alquilo y/o alqueno es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces en posiciones diferentes;

5 X se selecciona entre el grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluye, pero sin limitarse a ellos, hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, acetato, fosfato, fluoruro, carbonato, etc.; y

R es un grupo alquilo que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono. En una realización preferente de esta invención, la 7-hidroxicromona se extiende a aloesina (figura 1) o aloerresina A (figura 2).

10 La terminología «Aloe» se refiere al género de plantas sudafricanas de la familia de las liliáceas de la cual *Aloe ferox* es una de las especies. Las cromonas de aloe están presentes principalmente por toda la hoja de una serie de especies diferentes de *Aloe*.

15 La terminología «extracto de *Aloe*» o «extracto de aloe» se define como el jugo seco de la hoja completa de distintas especies de plantas de *Aloe*. El «extracto de *Aloe*» o «extracto de aloe» utilizado en los ejemplos de esta invención se preparó mediante un «procesamiento de la hoja entera» con hojas enteras de distintas especies de *Aloe*. En un ejemplo, las hojas enteras obtenidas de la planta *Aloe barbadensis* se molieron, se filtraron, se trataron con celulasa (opcional) y con carbón activo, y se liofilizaron. El polvo liofilizado se reconstituyó con el solvente de cromatografía antes de su utilización. En otro ejemplo, el exudado de las hojas de aloe se suspendió en agua, y luego se puso en contacto con un solvente de cromatografía adecuado antes de su utilización.

«Terapéutico», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye el tratamiento y/o la prevención. Cuando se utiliza, terapéutico se refiere a los humanos, así como a otros animales.

20 «Dosis o cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz» se refiere a un nivel de dosis suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la administración de una sustancia farmacéutica, alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración que afecte a un sistema biológico.

25 Un «hospedador» es un ser vivo, humano o animal, al que se administran las composiciones descritas en la presente memoria.

La presente descripción describe la identificación y purificación de 7-hidroxicromonas que muestran una potente actividad antioxidante. La presente descripción incluye un método para proporcionar un antioxidante a un hospedador que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de una 7-hidroxicromona o de una mezcla de 7-hidroxicromonas.

30 La presente invención también incluye métodos que son eficaces para inhibir la peroxidación de lípidos a través de la supresión simultánea de la generación de radicales libres y de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). El método para inhibir la peroxidación de lípidos comprende la administración de una composición que comprende una 7-hidroxicromona o una mezcla de 7-hidroxicromonas a un hospedador que lo necesita.

35 La presente invención también incluye los métodos para prevenir y las tratar enfermedades y afecciones mediadas por las ERO y las enfermedades y afecciones relacionadas con otros procesos oxidativos. El método para prevenir y tratar las enfermedades y afecciones mediadas por las ERO y las enfermedades y afecciones relacionadas con otros procesos oxidativos comprende la administración, a un hospedador que lo necesita, de una cantidad eficaz de una composición que comprende una 7-hidroxicromona o una mezcla de 7-hidroxicromonas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Las 7-hidroxicromonas que se pueden utilizar de acuerdo con esta invención incluyen los compuestos ilustrados por la estructura general presentada más arriba. En una realización preferente de esta invención, la 7-hidroxicromona se selecciona entre aloesina (figura 1) o aloerresina A (figura 2). Las 7-hidroxicromonas de esta invención se pueden obtener mediante métodos sintéticos o se pueden aislar de los géneros de numerosas familias de plantas, entre ellas, *Acacia*, *Adina*, *Aloe*, *Alternaria*, *Amoora*, *Antidesma*, *Artemisia*, *Baeckia*, *Cassia*, *Clusea*, *Cridium*, *Convolvulus*,
45 *Epimedium*, *Eriosema*, *Eriostemon*, *Eugenia*, *Garcinia*, *Hypericum*, *Lindenbergia*, *Pancratium*, *Penicillium*, *Polygonum*, *Ptaeroxylon*, *Rheum*, *Sophora*, *Stephanitis*, *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*. En una realización preferente, la planta se selecciona entre el grupo que incluye *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremnophila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera var. chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baeckia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygonum cuspidatum*, *Sophora tomentosa* y *Stephanitis rhododendri*.

50 Las 7-hidroxicromonas se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, tallos, corteza de tallos, troncos, corteza de troncos, ramitas, tubérculos, raíces, corteza de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes áreas.

Los ejemplos 1, 2 y 3 describen el aislamiento y la purificación de dos 7-hidroxicromonas representativas: la aloesina

y la aloerresina A. La aloesina y la aloerresina A se aislaron de exudados de las hojas de *Aloe ferax* con una pureza del 95,2% y del 61,5%, respectivamente.

5 Tal y como se da a conocer en el ejemplo 1, la aloesina se aisló y se purificó con los métodos descritos en la solicitud de patente de los EE.UU. de n.º de serie 09/792 104 registrada el 6 de febrero de 2001, titulada «Method of Purification of Aloesin». La aloesina se puede obtener de exudados de *Aloe*, tales como de jugo amargo de aloe y de otras fuentes, entre ellas, hojas, cortezas y plantas enteras de *Aloe* que contienen este compuesto como un componente.

10 El aislamiento y la purificación de la aloesina A se describe en los ejemplos 2 y 3. En una separación típica, el material vegetal que contiene la aloerresina A (típicamente jugo amargo de aloe) se extrae en alcohol al 10-100% (u otro solvente orgánico miscible) en agua (típicamente metanol al 30% en agua). A continuación, la aloesina A se purifica con medios cromatográficos típicos, en particular medios de poliamida o LH-20, y/o de fase inversa. La solución del extracto se concentra y/o se aplica directamente a un lecho de un material a base de resina de poliamida y/o de fase inversa. Después, el lecho de la columna se lava con metanol al 0-30% (u otro solvente orgánico hidrosoluble; típicamente un volumen de 2 columnas de metanol al 30% en agua) hasta que se eluyen todos los demás compuestos (típicamente aloesina y antraquinonas). El lecho de la columna se eluye entonces con solvente orgánico al 30-100% en agua (típicamente 2 volúmenes de columna de acetona al 100%). A continuación se concentra esta fracción para obtener la aloerresina A.

20 El ejemplo 4 describe la medición de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) que tienen la aloesina y la aloerresina A, respecto al extracto de semilla de uva y al extracto de té verde. Los resultados se presentan en la figura 4. Con referencia a la figura 4, se puede observar que la aloesina tenía un valor de ORAC total mucho más alto que la aloerresina A y que los extractos estandarizados de té verde y de semilla de uva. La aloerresina A tenía un valor de ORAC total de 33 y 299 veces más alto que los extractos de té verde y de semilla de uva, respectivamente. El ejemplo 5 describe la medición de la ORAC rápida y lenta para las cuatro composiciones analizadas en el ejemplo 4. Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 5. Como antioxidante rápido, la aloerresina A era cuatro veces más potente que las otras tres composiciones ensayadas. Sin embargo, la aloesina era más potente que un antioxidante de acción lenta. La aloesina era casi un 70% más activa que el extracto de té verde y más de seis veces más activa que el extracto de semilla de uva a unas condiciones del 50% de la ORAC. La aloerresina A también era un antioxidante mejor respecto a los extractos de semilla de uva y de té verde en estas condiciones. La aloesina y la aloerresina A contienen el grupo hidroxilo fenólico en la posición C-7 (véanse las figuras 2 y 3). Este grupo hidroxilo se oxida muy fácilmente en presencia de especies reactivas del oxígeno (ERO) para formar un grupo cetónico. El grupo hidroxicinámico extra de la aloerresina A no mejora el valor de ORAC total de este compuesto. Sin embargo, cambia significativamente su polaridad, que puede ser la razón por la que este compuesto es un antioxidante rápido mejor.

35 El ejemplo 6 describe la evaluación de la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) para la aloerresina A, respecto a la vitamina C y al α -tocoferol. Tal y como se observó más arriba, se cree que la peroxidación de lípidos es una reacción destructiva importante, que se produce en los componentes del plasma y en las paredes de los vasos sanguíneos, y que contribuye a la enfermedad cardiovascular. El experimento descrito en el ejemplo 6 se diseñó como un indicador de la destrucción de lípidos que se produce en un organismo inducida por los radicales libres. El ensayo de LPIC mide la capacidad de una muestra tanto para inhibir como para terminar la reacción de peroxidación de lípidos. El valor de LPIC complementa el valor de ORAC. El ensayo de ORAC proporciona información sobre la capacidad antioxidante total, mientras que el ensayo LPIC proporciona información sobre los antioxidantes totales y el estado de los catalizadores metálicos a la hora de proteger con eficacia frente a las reacciones de peroxidación de lípidos *in vivo*.

45 Los resultados del ensayo descrito en el ejemplo 6 se presentan en la figura 6. Tal y como se ilustra en la figura 6, la aloerresina A es un antioxidante más fuerte que el α -tocoferol o que la vitamina C, según se midió mediante la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) de concentraciones de 10 mg/ml a 50 mg/ml. También inhibió la peroxidación de lípidos al 30,7% incluso a una concentración de tan solo 5 mg/ml frente a por debajo del 10% para el α -tocoferol.

50 La peroxidación de lípidos se controla *in vivo* mediante el atrapamiento de metales traza, tales como el hierro y el cobre que intervienen en el inicio de las reacciones de peroxidación de lípidos; y por la presencia de antioxidantes que terminan la reacción de propagación una vez que se ha iniciado. Se conocen bien los atrapadores de metales, tales como la ferritina para el hierro y la metalotioneína para el cobre, pero otros constituyentes del suero, tales como el urato, que es capaz de atrapar el hierro, también pueden ser importantes. Los antioxidantes, tales como el α -tocoferol, se sabe que impiden la propagación de las reacciones de peroxidación de lípidos, pero pueden haber muchos otros constituyentes del suero que podrían ser igualmente o más importantes. Dado que la aloerresina A contiene una cetona así como una serie de grupos hidroxilo sobre el anillo de benzopirran-4-ona y sobre la unidad de azúcar, es funcional como un atrapador de metales y como un depurador de radicales libres. Así pues, una función importante de las cromonas antioxidantes es la protección de todo el sistema celular a través del control de la peroxidación de lípidos mediante el atrapamiento y la depuración de los radicales libres.

60 Las 7-hidroxicromonas no sólo poseen valores altos de ORAC y de LPIC en y por sí mismos, sino que también

5 pueden mejorar la capacidad antioxidante de un producto si se formulan apropiadamente en el producto, tal y como se ilustra en los ejemplos 7 y 8. En el ejemplo 6 se demuestra que la aloerresina A a una concentración del 5% incrementa el valor de ORAC de una bebida de Mentaberry un 31,3%. Los resultados del ejemplo 7 se presentan en la figura 7. En el ejemplo 8, se muestra que la aloerresina A incrementa la LPIC de un producto antioxidante formulado del 19% al 38% a una dosis de 50 mg a 250 mg/porción.

El método de esta invención se puede utilizar para tratar y prevenir una serie de enfermedades y afecciones mediadas por las ERO, entre ellas arterioesclerosis, cardiopatías coronarias, cataratas, demencia, enfermedad del Alzheimer, disfunción cognitiva, diabetes sacarina, cáncer y melanoma.

10 Las composiciones de esta invención las pueden administrar los expertos en la técnica mediante cualquier método conocido. Los modos de administración incluyen, pero sin limitarse a ellos, administración enteral (oral), administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y aplicación tópica. El método de tratamiento de acuerdo con esta invención comprende la administración por vía interna o tópica, a un paciente que lo necesita, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una y/o de una mezcla de varias 7-hidroxicromonas aisladas de una única fuente o de varias fuentes que incluyen, pero sin limitarse a ellas, obtención sintética, producción natural o cualquier combinación de las mismas.

15 La presente descripción también incluye un método mejorado para aislar y purificar cromonas, en particular 7-hidroxicromonas, de plantas que contienen estos compuestos. El método comprende: a) extraer la biomasa molida de una planta que contiene una cromona, en concreto una 7-hidroxicromona; b) neutralizar y concentrar dicho extracto; y c) purificar dicho extracto neutro y concentrado mediante un método cromatográfico, que incluye, pero sin limitarse a ellos, cromatografía en poliamida, en LH-20 o de fase inversa. En una realización preferente, el extracto se purifica mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en retrocristalización, precipitación, reparto de solventes y/o separación cromatográfica. La presente descripción da a conocer un procedimiento comercialmente viable para el aislamiento y la purificación de cromonas que tienen una actividad fisiológica deseable.

20 La preparación de productos para la administración en preparaciones farmacéuticas se puede realizar mediante muchos métodos diferentes bien conocidos por los expertos en la técnica. Las 7-hidroxicromonas se pueden formular como un polvo fitoterapéutico en el foro de su existencia natural; como solvente y/o extractos de líquido supercrítico a diferentes concentraciones; como compuestos enriquecidos y purificados mediante retrocristalización, separación en columna, reparto de solventes, precipitación y otros medios, como una mezcla pura y/o una mezcla que contiene 7-hidroxicromonas sustancialmente purificadas preparadas mediante métodos sintéticos.

25 Se conocen en la técnica distintos sistemas de administración y se pueden utilizar para administrar las composiciones terapéuticas de la invención, solución acuosa, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas.

30 Las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección, aunque también se contemplan otras formas de administración eficaces, tales como inyección intraarticular, vahos para inhalación, formulaciones activas por vía oral y tópica, iontoforesis transdérmica o supositorios. Un vehículo preferente es la solución salina fisiológica, pero se contempla que también se puedan utilizar otros vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización preferente se contempla que el vehículo y la(s) 7-hidroxicromona(s) constituyan una formulación de liberación prolongada fisiológicamente compatible. El solvente principal en tal vehículo puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Además, el vehículo puede contener otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución y olor de la formulación. De igual forma, el vehículo puede contener aún otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener la estabilidad, la velocidad de disolución, la liberación o la absorción del ligando. Tales excipientes son las sustancias que se suelen usar convencionalmente para formular dosis para la administración parenteral en dosis unitarias o bien en forma de varias dosis.

35 Una vez que se ha formulado la composición terapéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, crema, gel, emulsión, sólido, o polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden conservar en una forma lista para usar o que requiere su reconstitución inmediatamente antes de la administración. La manera de administrar formulaciones que contienen las composiciones para la administración sistémica pueden ser subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, intranasal o vaginal o supositorios por vía rectal.

40 La cantidad de la composición que será eficaz para el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o de la afección, que se pueden determinar mediante técnicas clínicas estándares. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los márgenes óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad o del avance de la enfermedad o afección, y se debe decidir de acuerdo con el médico de cabecera y las circunstancias de cada paciente. Se pueden extrapolar las dosis eficaces a partir de las curvas de respuesta a la dosis obtenidas mediante los sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición de la invención se determina fácilmente mediante la administración de dosis graduales de la composición y mediante la observación del efecto deseado.

5 El método de tratamiento de acuerdo con esta invención comprende la administración por vía interna o tópica, a un paciente que lo necesita, de una cantidad terapéuticamente selectiva de una y/o de una mezcla de 7-hidroxicromonas de una fuente única o de varias fuentes. La pureza de una y/o de la mezcla de 7-hidroxicromonas incluye, pero sin limitarse a ellas, del 0,01% al 100%, según la metodología utilizada para obtener el o los compuestos. En una realización preferente, la dosis de la 7-hidroxicromona y de las composiciones farmacéuticas que contienen las mismas son una cantidad no tóxica eficaz seleccionada por lo general en el margen de 0,01 a 200 mg/kg de masa corporal. Las personas expertas en la técnica que utilizan pruebas clínicas convencionales son capaces de determinar las dosis óptimas para la dolencia concreta a tratar.

10 Esta descripción incluye un método mejorado para aislar y purificar 7-hidroxicromonas a partir de plantas. El método mejorado comprende: extracción de la biomasa molida de una planta que contiene 7-hidroxicromona con un solo solvente orgánico, o una combinación de ellos, y/o agua; neutralización y concentración del extracto neutralizado; y purificación de dicho extracto mediante cromatografía de poliamida o de LH-20. Tal y como se dio a conocer más arriba, estas 7-hidroxicromonas se pueden identificar en géneros de varias familias de plantas. El método se puede extender al aislamiento de estos compuestos de cualquier fuente vegetal que contiene estos compuestos.

15 Adicionalmente, las 7-hidroxicromonas se pueden aislar de distintas partes de la planta, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, la planta entera, tallos, corteza de tallos, ramitas, tubérculos, flores, frutos, raíces, corteza de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas y partes aéreas. En una realización apremiante, las 7-hidroxicromonas se aíslan de las hojas enteras de *Aloe ferox*.

20 Los ejemplos siguientes se dan a conocer sólo con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 de referencia. Preparación de la aloesina a partir de los exudados de *Aloe ferox*

25 Se preparó una muestra de aloesina mediante los métodos descritos en la solicitud de patente de los EE.UU. de n.º de serie 09/792104, registrada el 6 de febrero de 2001, titulada «Method of Purification of Aloesin». Brevemente, se aisló extracto de aloe de la hoja entera de *Aloe ferox* que se había disuelto previamente en agua caliente y se había filtrado para retirar las partículas no disueltas. A continuación se cargó el extracto en una columna de fase inversa y la aloesina se eluyó de la columna con metanol al 20-30%.

EPIC preparativa

Columna: IB SIL C18; 250 mm x 4,6 mm, tamaño de las partículas: 5 µm

30 Fase móvil: gradiente de agua/metanol: 80%/120% (20 minutos); 40%/60% (10 minutos); 80%/20% (10 minutos)

Temperatura: ambiental

Velocidad del flujo: 1 ml/min

Longitud de onda del detector: 297

Sensibilidad: 20

35 El producto eluye a los 8-9 minutos.

El compuesto se purificó adicionalmente mediante retrocristalización para producir un sólido amarillo claro con una pureza de > 95,2%.

Ejemplo 2 de referencia. Preparación de la aloerresina A a partir de exudados de *Aloe ferox*

40 Una mezcla de exudados de aloe (35 kg) aislados de *Aloe ferox*, como se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. de n.º de serie 09/792 104, registrada el 26 de febrero de 2001, titulada «Method of Purification of Aloesin», que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, se añadió a agua caliente (200 l a 74 °C) y se agitó durante 1 hora. Se dejó reposar la solución a temperatura ambiente durante 2 días. Se decantó la capa acuosa y se extrajo de nuevo el residuo líquido grueso con agua caliente (200 l a 60 °C). Una porción de este extracto secundario (20 l) se concentró y se evaporó hasta secarlo completamente.

45 El extracto seco (1,5 kg), que contenía el 20,1% de aloerresina A, se disolvió en 25 l de agua DI. Se agitó esta solución durante 30 minutos y se cargó directamente en una columna de poliamida preparada previamente. La columna preparada previamente (20 cm x 100 cm) contenía 20 l de poliamida y se limpió con hidróxido de sodio acuoso y a continuación se acidificó con HCl acuoso. Entonces se lavó la columna con agua DI hasta una condición neutra antes de cargar la solución que contenía la aloerresina A.

50 El material cargado se alimentó por el fondo de la columna a unos 1,5 l por minuto cuando se mantenía la presión a

10 psi. Se lavó la columna con agua (20 l) y después con una mezcla de metanol/agua (20 l de metanol al 25%). La columna se secó con una bomba peristáltica. A continuación se eluyó la aloerresina A con acetona (20 l). Se recogió el eluyente, se analizó y se evaporó para producir un total de 377 g de un sólido que contenía la aloerresina A al 61,5%.

5 Ejemplo 3 de referencia. Purificación de la aloerresina A mediante cromatografía en columna LH-20

Un extracto seco (9,6 g), que contenía aproximadamente el 45% de aloerresina A, se disolvió en 250 ml de agua DI. Esta solución se cargó directamente en una columna de LH-20 preparada previamente. La columna preparada previamente (6,0 cm x 12,0 cm) contenía 400 ml de resina LH-20 y se equilibró con 2 volúmenes de la columna de agua DI. El material a cargar se depositó en la parte superior de la columna y se eluyó con 800 ml de metanol al 30% seguido de 600 ml de metanol al 100%. La columna se equilibró luego con 800 ml de agua DI y quedó lista para utilizarla de nuevo. Se recogieron 38 fracciones con 50 ml en cada una. Las fracciones 1 a 14 no contenían compuesto y se descartaron. Las fracciones 15 a 30 se combinaron y se evaporaron para proporcionar 1,43 g de antraquinonas en una cantidad total de 4,615 g de sólido. La aloerresina A estaba en las fracciones 31 a 36. Estas fracciones se combinaron y se evaporaron para producir 4,05 g de aloerresina A con una pureza del 98%. La recuperación total del sólido a partir de la cromatografía en columna de LH-20 fue del 90,3%.

Ejemplo 4. Medición de la capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC) que tienen la aloerresina A y la aloesina

A las cromonas, aloesina y aloerresina A, se les analizó su capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC) respecto al extracto de té verde que contenía más del 50% de catequinas totales y más del 25% de epigallocatechingalato (EGCG) y extracto de semilla de uva que contenía más del 95% de fenoles. El ensayo de ORAC mide la disminución de la fluorescencia de la proteína indicadora β -ficoeritrina (β -PE) en función del tiempo, resultado del daño de los radicales libres. Este ensayo proporciona una medición cuantitativa de la capacidad antioxidante total para proteger a la β -ficoeritrina sensible a los radicales libres. Cada reacción se calibró con Trolox, el estándar conocido que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E. El valor de ORAC se refiere al área de protección neta bajo la curva de desaparición de la β -ficoeritrina en presencia de un antioxidante. Los resultados del ensayo se describen sobre la base de que 1 unidad de ORAC equivale a 1 μ M de Trolox. Se disolvieron en agua desionizada (solución al 5% p/v) la aloerresina A (76,0% de pureza), la aloesina (95,2%), el extracto de té verde y el extracto de semilla de uva, y se analizaron directamente con los procedimientos experimentales descritos en Cao et al. (1994) *Free Radic. Biol. Med.* 16: 135-137 y Prior y Cao (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220: 255-261. Los resultados se presentan en la figura 4.

Ejemplo 5. Cuantificación de la capacidad de absorción de radicales libres (ORAC) rápida y lenta para la aloerresina (A) y para la aloesina

La actividad antioxidante rápida se mide por el área de protección neta bajo la curva de desaparición de la β -ficoeritrina en presencia de un antioxidante, el cual inhibe completamente la propagación de los radicales libres, hasta conseguir que sobreviva el 95% de la β -ficoeritrina. El ácido ascórbico, los compuestos fenólicos libres y los compuestos tiólicos son antioxidantes de acción rápida. La actividad antioxidante lenta se mide por el área de protección neta bajo la curva de desaparición de la β -ficoeritrina en presencia de un antioxidante, el cual inhibe la propagación de los radicales libres hasta conseguir que sobreviva el 50% de la β -ficoeritrina. Los flavonoides, los carotenoides y los polifenoles son antioxidantes de acción lenta. Se disolvieron respectivamente en agua desionizada (solución al 5% p/v) la aloerresina A (76,0% de pureza), la aloesina (95,2%), el extracto de té verde y el extracto de semilla de uva, y se analizaron directamente con los procedimientos experimentales descritos por Cao et al. (1994) *Free Radic. Biol. Med.* 16: 135-137 y Prior y Cao (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220: 255-261. Los resultados se presentan en la figura 5.

Ejemplo 6. Cuantificación de la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) que tiene la aloerresina A con respecto a la vitamina C y al α -tocoferol

La capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) es una medida de la capacidad antioxidante que tiene una muestra para inhibir el inicio y la propagación de una reacción espontánea de peroxidación de lípidos. El malonildialdehído (MDA) es uno de los principales subproductos de la peroxidación de lípidos y se suele utilizar para medir la magnitud de la peroxidación de lípidos. La concentración del MDA se midió mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico. La aloerresina A (pureza del 76,0%), la vitamina C y el α -tocoferol se disolvieron en un tampón fosfato en solución salina a cuatro concentraciones diferentes (5 mg/ml, 10 mg/ml; 25 mg/ml y 50 mg/ml) y después se analizaron directamente con los procedimientos experimentales descritos por Stocks et al. (1974) *Clinical Sci. Mol.* 47: 215-222, y Yu y Lee, patente de los EE.UU. n.º 5 939 395. Los resultados se presentan en la figura 6.

Ejemplo 7. Mejora de la capacidad de absorción de radicales libres (ORAC) para una bebida MetaBerry al añadirle la aloerresina A

Con los métodos descritos en el ejemplo 3 se determinó que una bebida de frutas obtenida de Oasis Wellness Network tenía un valor de ORAC de 3,129/oz. Se añadió aloerresina A, que contenía aloerresina A al 76,0%, a 40 ml de la bebida (lote n.º 0612, exp. 11-02) para producir una concentración final de aloerresina A de 5 mg/ml y de 15

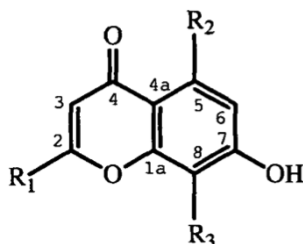
mg/ml en la solución, respectivamente. A continuación se analizó el valor de ORAC total de estas muestras respecto al producto en ausencia de la aloerresina A mediante los procedimientos experimentales ilustrados que se describen en Cao et al. (1994) *Free Radic. Biol. Med.* 16: 135-137 y Prior y Cao (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220: 255-261). Los resultados se presentan en la figura 7.

5 Ejemplo 8. Mejora de la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) para un producto antioxidante al añadirle la aloerresina A

10 Un producto antioxidante en forma de comprimido formulado obtenido de Oasis Wellness Network se molió y mezcló con una muestra de aloerresina A (pureza al 76,0%) a una concentración final equivalente a 50 mg/comprimido y 250 mg/comprimido, respectivamente. A continuación se analizó la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos (LPIC) de estas muestras y se compararon con la del producto sin la aloerresina A, mediante los procedimientos experimentales descritos por Stocks et al. (1974) *Clinical Sci. Mol.* 47: 215-222 y Yu y Lee, patente de los EE.UU. n.º 5 939 395. Los resultados del ensayo se ilustran en la figura 8.

REIVINDICACIONES

1. 7-Hidroxicromona o mezcla de 7-hidroxicromonas cuya estructura es la siguiente:



en la que:

- 5 R₁ es un grupo oxoalquilo u oxoalquenilo; y

R₂ y R₃ se seleccionan independientemente el uno del otro entre el grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, un éster seleccionado entre el grupo que consiste en galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; un glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de uno solo o de una combinación de varios azúcares seleccionados entre el grupo que consiste en aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa;

en la que dicho grupo alquilo es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces en diferentes posiciones;

para la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por las ERO seleccionada entre el grupo que consiste en arterioesclerosis, cardiopatías coronarias, cataratas, demencia, enfermedad de Alzheimer, disfunción cognitiva, diabetes sacarina, cáncer y melanoma.

2. 7-Hidroxicromona para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₂ es alquilo; y

R₃ es un éster seleccionado entre el grupo que consiste en galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; un glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de uno solo o de una combinación de varios azúcares seleccionados entre el grupo que consiste en aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa.

3. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se selecciona entre aoesina o aloerresina A.

4. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se obtiene mediante síntesis orgánica.

5. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se obtiene de una planta o de parte de una planta.

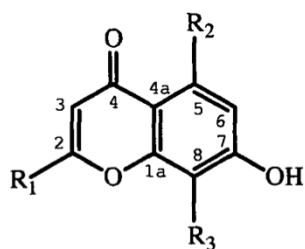
6. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha planta se selecciona entre el grupo que consiste en los géneros *Acacia*, *Adina*, *Aloe*, *Alternaria*, *Amoora*, *Antidesma*, *Artemisia*, *Baeckia*, *Cassia*, *Clusea*, *Cnidium*, *Convolvulus*, *Epimedium*, *Eriosema*, *Eriostemon*, *Eugenia*, *Garcinia*, *Hypericum*, *Lindenbergia*, *Pancratium*, *Penicillium*, *Polygonum*, *Ptaeroxylon*, *Rheum*, *Sophora*, *Stephanitis*, *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*.

7. 7-Hidroxicromona para el utilización de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha planta se selecciona entre el grupo que consiste en *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremnophila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera var. chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baeckia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygonum cuspidatum*, *Sophora tomentosa* y *Stephanitis rhododendri*.

8. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha parte de la planta se selecciona entre el grupo que consiste en tallos, corteza de tallos, troncos, corteza de troncos, ramitas, tubérculos, raíces, corteza de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas.

9. 7-Hidroxicromona para utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho antioxidante actúa a través de la supresión simultánea de la generación de radicales libres y la supresión de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO).

10. Utilización de una 7-hidroxicromona o de una mezcla de 7-hidroxicromonas cuya estructura es la siguiente:



en la que:

R₁ es oxoalquilo u oxoalquenilo; y

- 5 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente el uno del otro entre el grupo que consiste en -H, -OH, alquilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo; un éster seleccionado entre el grupo que consiste en galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; un glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de uno solo o de una combinación de varios azúcares seleccionados entre el grupo que consiste en aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa;

- 10 en la que dicho grupo alquilo es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces en diferentes posiciones;

en la preparación de un producto para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por las ERO seleccionadas entre el grupo que consiste en arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, cataratas, demencia, enfermedad de Alzheimer, disfunción cognitiva, diabetes sacarina, cáncer y melanoma.

11. Utilización de acuerdo con la reivindicación 10, en la que R₂ es alquilo; y

- 15 R₃ es un éster seleccionado entre el grupo que consiste en galato, acetato, ésteres de cinamoilo y de hidroxicinamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; un glucósido de carbono, de oxígeno, de nitrógeno o de azufre de uno solo o de una combinación de varios azúcares seleccionados entre el grupo que consiste en aldopentosas, metilaldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa.

- 20 12. Utilización de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que la 7-hidroxicromona es aloesina o aloerresina A.

13. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el producto comprende del 0,01% al 100% de la 7-hidroxicromona.

14. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el producto se administra a una dosis seleccionada en el margen de 0,01 a 200 mg/kg de masa corporal.

- 25 15. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que las vías de administración se seleccionan entre el grupo que consiste en las administraciones por las vías oral, tópica, intravenosa, intradérmica, intragástrica, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa, y mediante un supositorio, en una fórmula farmacéutica apropiada.

- 30 16. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en la que dicho producto comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

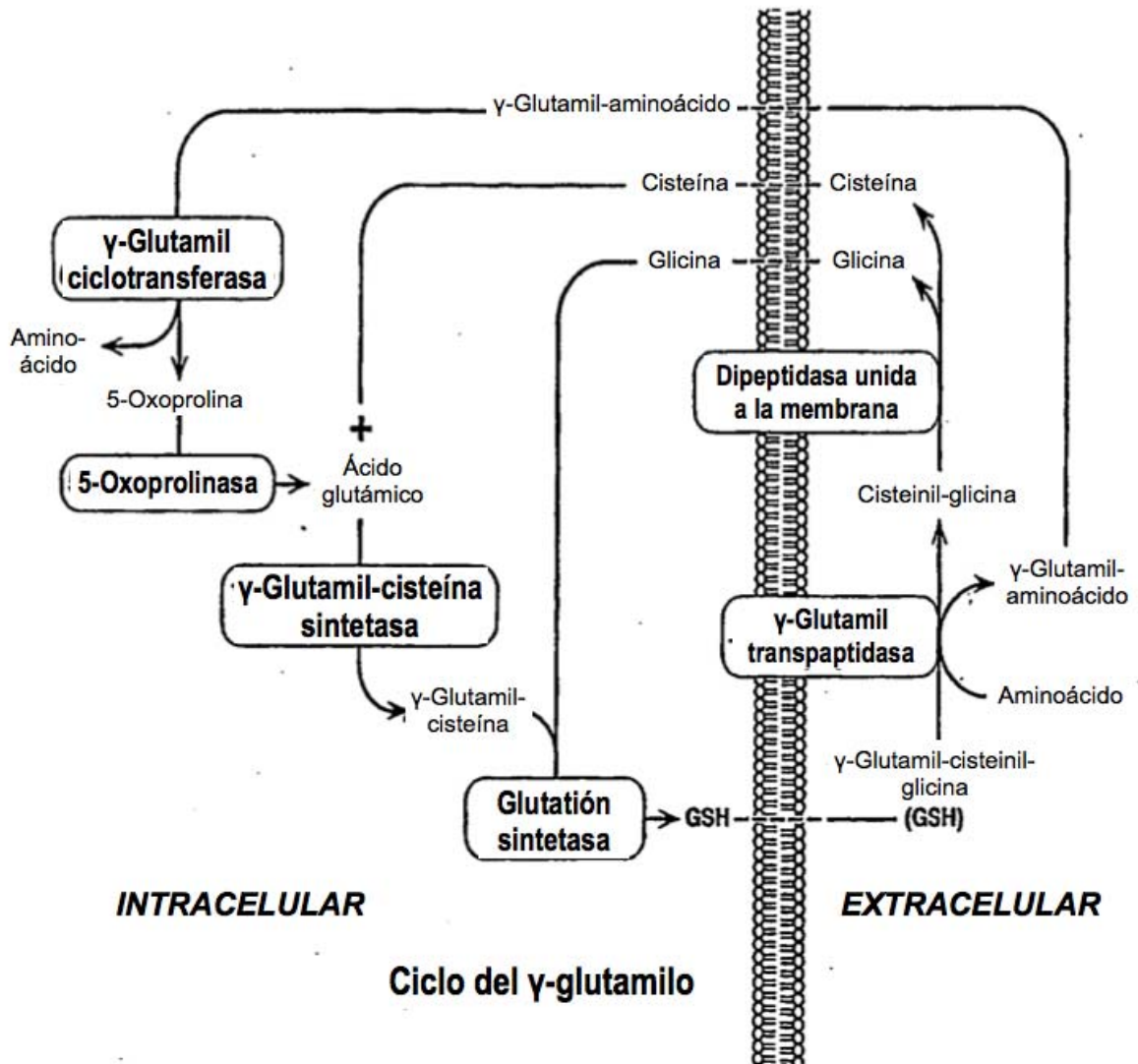


FIG. 1

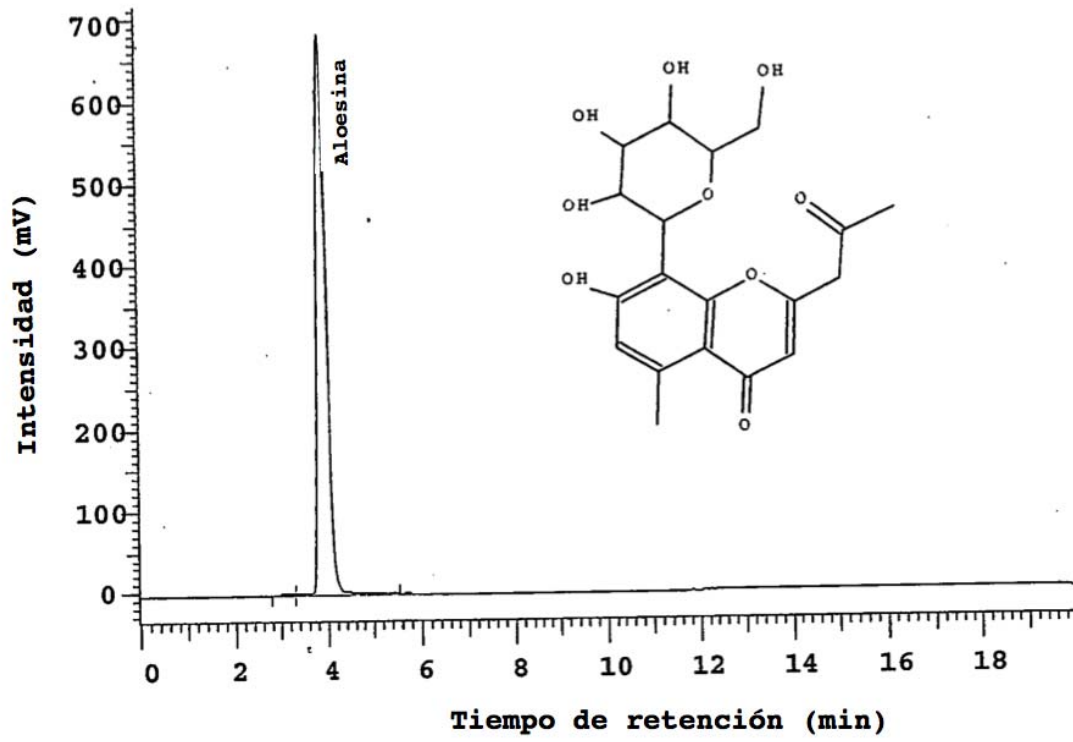


FIG. 2

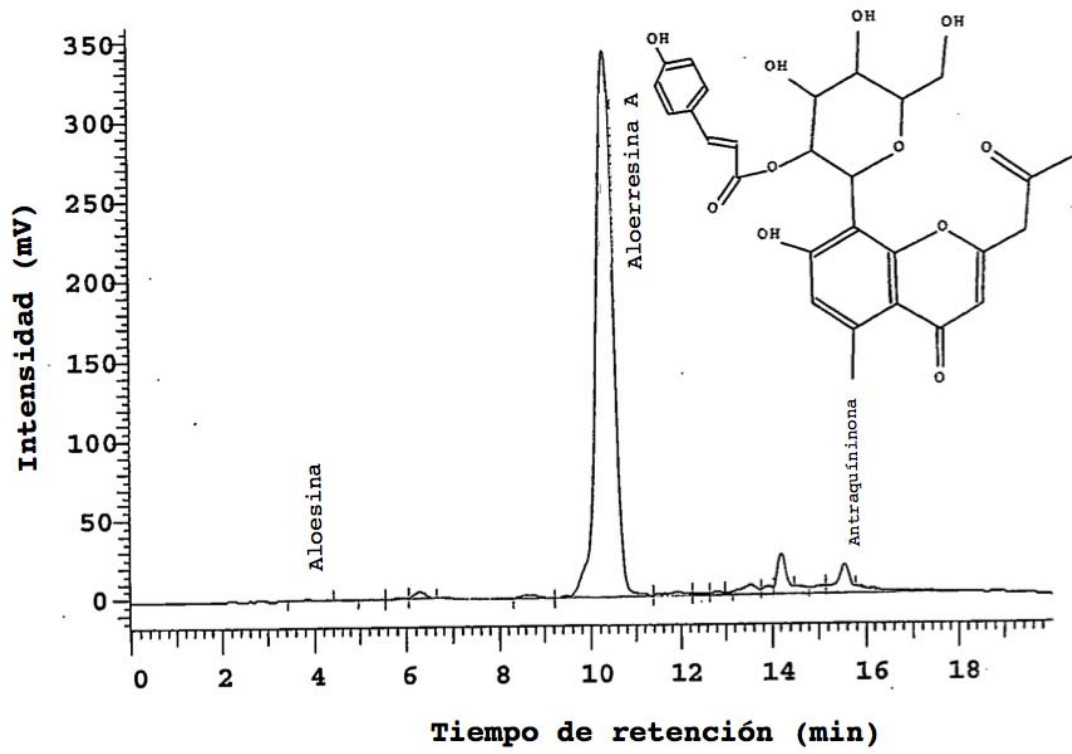


FIG. 3

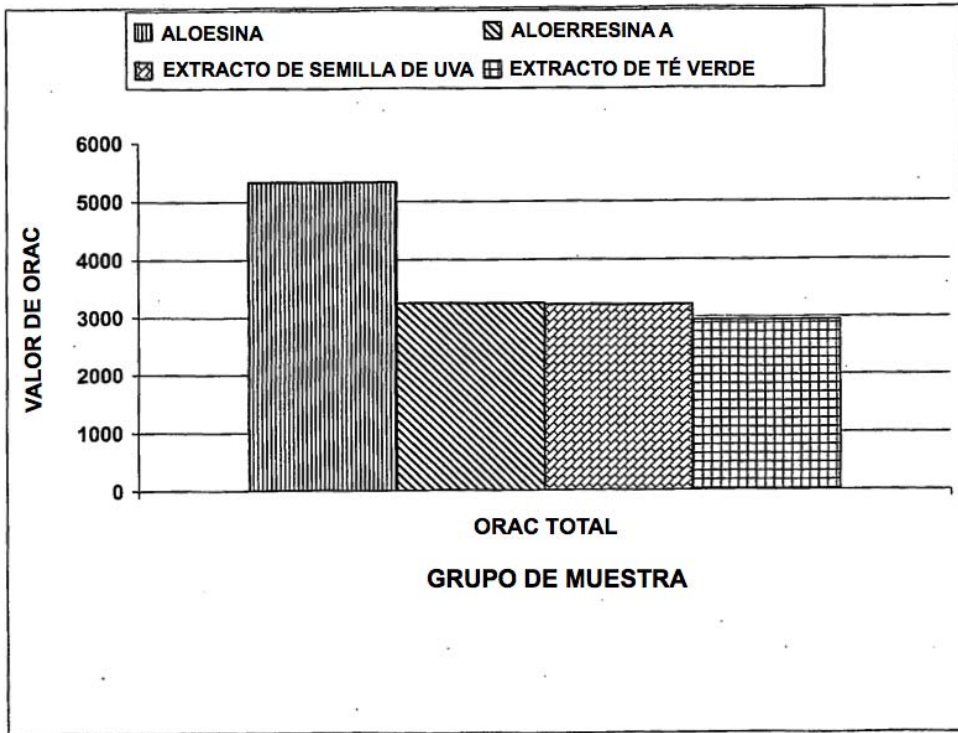


FIG. 4

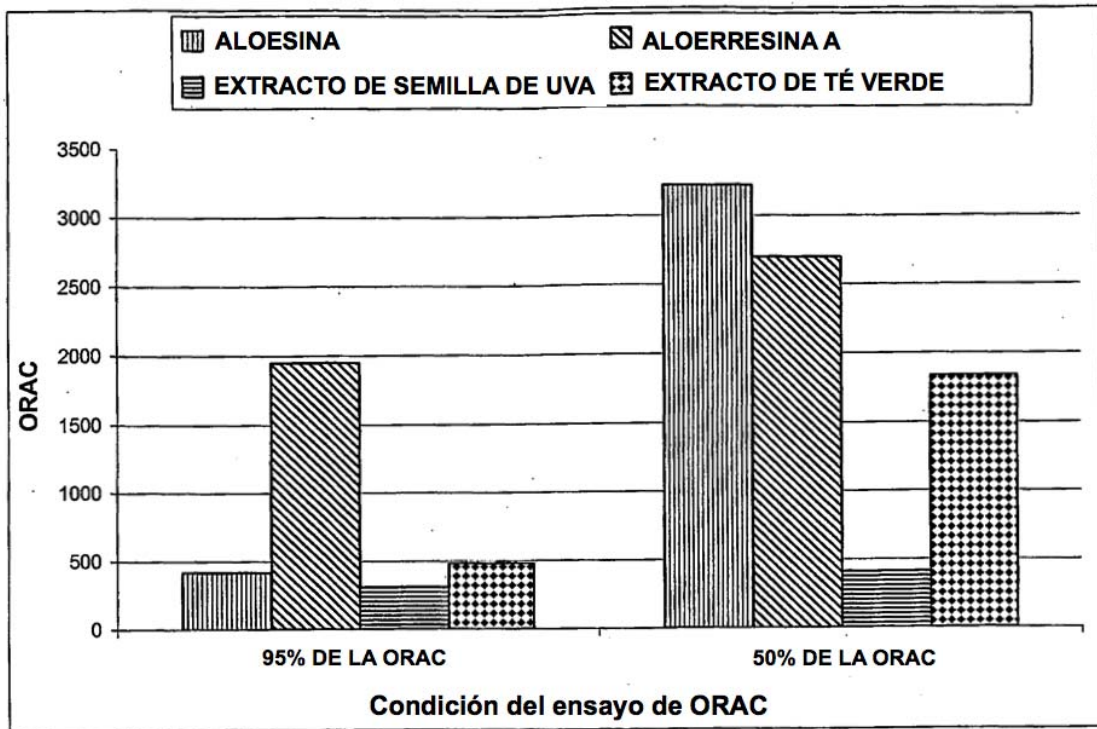


FIG. 5

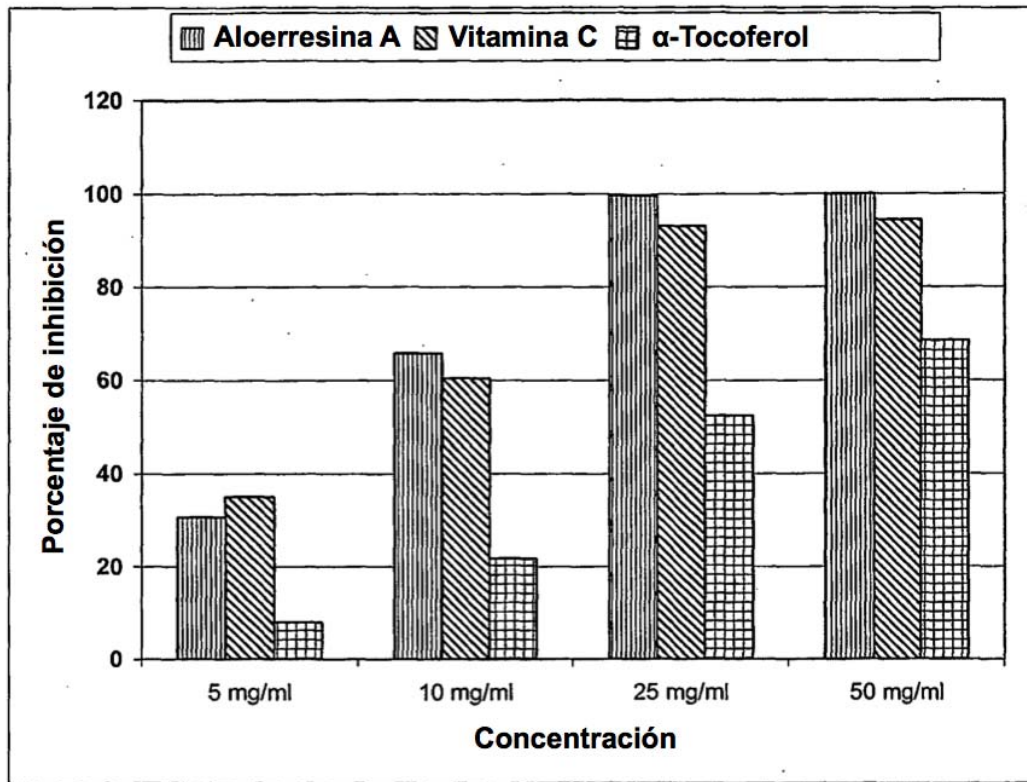


FIG. 6

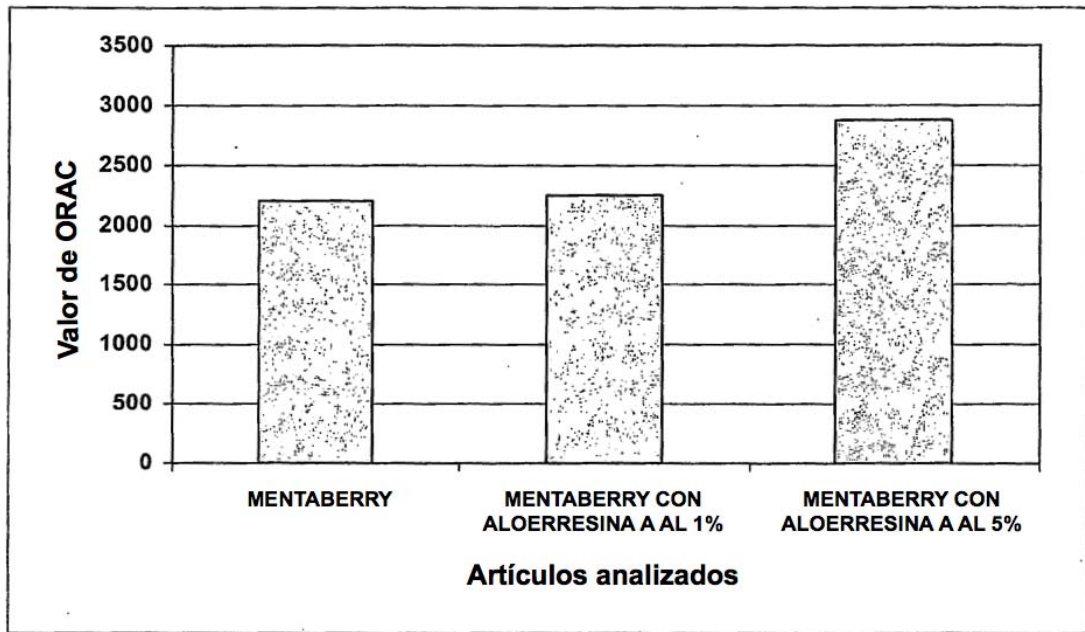


FIG. 7

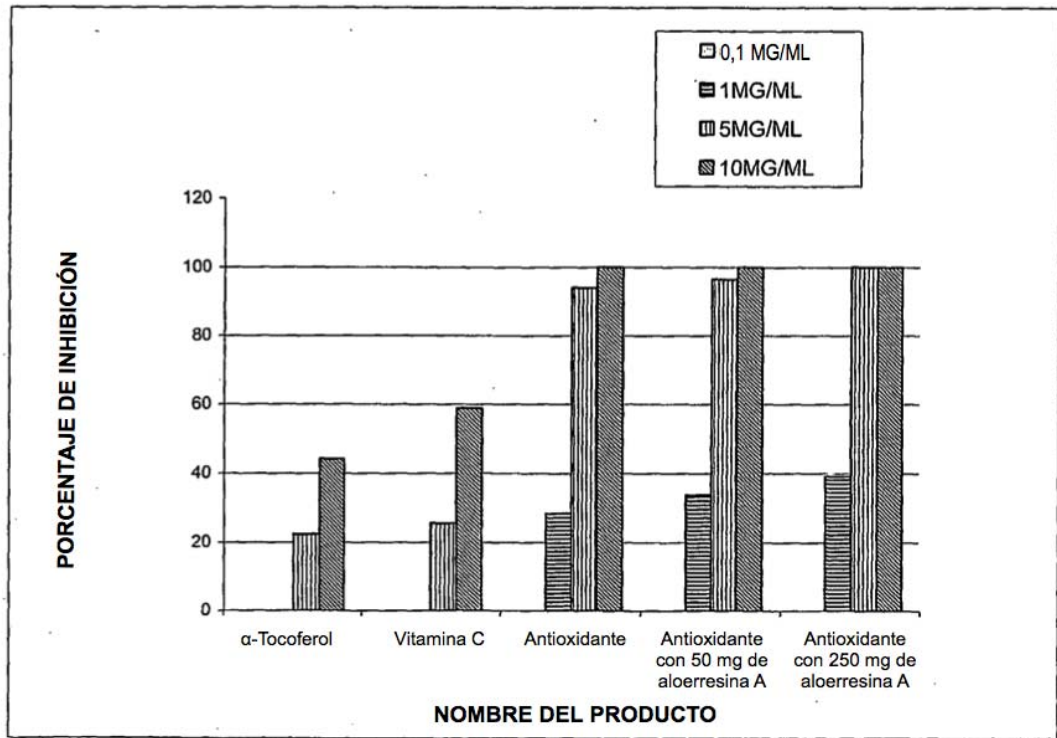


FIG. 8