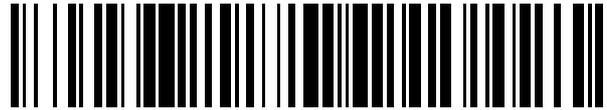


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 773**

51 Int. Cl.:

A61K 31/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2008 E 08713667 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2117532**

54 Título: **Cromonas como agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

09.01.2007 US 884107 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.06.2013

73 Titular/es:

**UNIGEN, INC. (100.0%)
3005 1st Avenue
Seattle, WA 98121 , US**

72 Inventor/es:

**ZHAO, JI-FU;
TSENG-CRANK, JULIE;
YIMAM, MESFIN y
JIA, QI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 773 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

Cromonas como agentes terapéuticos.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere, en general, al aislamiento e identificación de cromonas y de nuevas composiciones de cromonas que son eficaces en la mejora de la producción de adiponectina por los adipocitos, y en la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de los ácidos grasos, en la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, en la biosíntesis de los esteroides, en la gluconeogénesis, en el transporte de las grasas, en la señalización en el hígado de los PPAR- α /RXR- α y en el metabolismo de los xenobióticos. Se incluyen los métodos para la prevención y el tratamiento de la resistencia a la insulina, de la intolerancia a la glucosa, de la hiperglucemia, de los síndromes metabólicos, de la dislipidemia y de la hipertrigliceridemia.

Antecedentes de la invención

15 Obesidad, diabetes y síndrome metabólico se han convertido rápidamente en una epidemia global. Según publica la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), en el 2005, aproximadamente 400 millones de adultos resultaron ser obesos, y está previsto que para el 2015 más de 700 millones de adultos serán obesos. La obesidad es el principal factor de riesgo para diversas enfermedades crónicas, incluidas la enfermedad cardiovascular y la diabetes.

20 El síndrome metabólico fue descrito por primera vez por Reaven en 1988 (Reaven (1988) Diabetes 37:1595-1607) como un racimo de trastornos clínicos comunes interrelacionados que incluía la obesidad, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y la dislipidemia (hipertrigliceridemia y bajos niveles de colesterol HDL). El Adult Treatment Panel III (ATP III) del National Cholesterol Education Program estableció en 2001 los criterios para diagnosticar el síndrome metabólico (JAMA (2001) 285:2486-2497). Por parte de la ATP III se seleccionaron cinco criterios para identificar individuos con síndrome metabólico, que incluye la obesidad abdominal, la alteración de la glucosa en ayunas, niveles altos de triglicéridos (TG), bajas concentraciones de colesterol HDL (HDL-C) y el aumento de la presión arterial. Se diagnostica síndrome metabólico si cualquiera de los tres componentes está presente en un individuo. El síndrome metabólico se da con mucha frecuencia en todo el mundo y está asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica que cualquiera de sus componentes individuales.

30 El análisis de los datos en 8814 hombres y mujeres de 20 años de edad o mayores de la 3ª Encuesta Nacional de Examen sobre Salud y Nutrición (Third National Health and Nutrition Examination Survey) (1988-1994) reveló que la predominancia no ajustada y ajustada a la edad del síndrome metabólico era del 21,8 % y del 23,7 %, respectivamente. Usando datos del censo del 2000, aproximadamente 47 millones de personas residentes en los EE.UU. pueden tener el síndrome metabólico (Ford et al. (2002) JAMA 16:359). En niños y adolescentes obesos, la predominancia del síndrome metabólico es muy elevada, incrementándose con la gravedad de la obesidad y alcanzando el 50 por ciento en jóvenes extremadamente obesos (Weiss et al. (2004) "Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents". N. Eng. J. Med. 350:2362-2374). Los biomarcadores de un mayor riesgo de resultados cardiovasculares adversos están presentes en estos jóvenes. El síndrome metabólico y sus componentes individuales no se han encontrado sólo en poblaciones obesas, sino que se han encontrado también en individuos de peso normal y con un ligero sobrepeso.

40 Existen sólidos indicios de que la resistencia a la insulina es la raíz del problema de los trastornos metabólicos (Reaven GM. (1998) Diabetes 37:1595-1607). La prevalencia del síndrome metabólico aumenta significativamente con un aumento de la resistencia a la insulina ($P < 0,001$ como tendencia) después de ajustar la raza o el grupo étnico y el grado de obesidad (Weiss et al. (2004) "Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents". N. Eng. J. Med. 350:2362-2374). La resistencia a la insulina es un estado de capacidad de respuesta reducida a concentraciones normales de insulina en circulación (Saltiel AR (2000) J. Clin. Invest. 106:163-164) y una importante etiología de la diabetes de tipo 2. La resistencia a la insulina está relacionada con la obesidad, los factores del estilo de vida y los factores genéticos (Kadowaki T (2000) J. Clin. Invest. 106:459-465; Stem, M. (2000), J. Clin. Invest. 106:323-327). Los estudios en animales demuestran claramente que los defectos genéticos del receptor de insulina y las rutas de señalización de la insulina están involucradas en la patogénesis de la resistencia a la insulina en la diabetes de tipo 2. Por ejemplo, una deficiencia en la acción de la insulina era evidente en músculos, hígado y en el tejido adiposo en ratones con su receptor de insulina desactivado. Estos ratones mostraban también hiperinsulinemia y diabetes grave. Los ratones con una incrementada actividad de la PI3-cinasa (PI3K), que es una enzima clave en la señalización de la cascada de transducción de la señal de insulina, mostraban sensibilidad a un aumento de la insulina e hipoglucemia debido a un aumento de transporte de glucosa en el músculo esquelético y en los adipocitos (Kadowaki T (2000) J. Clin. Invest. 106:459-465). De forma similar, los ratones deficientes en Akt2, una cinasa aguas abajo de la PI3K, mostraba una disminución de la resistencia a la insulina y un aumento en el transporte de glucosa a los músculos (Cho et al. 2001 Science 292:1728).

55 En humanos, recientes estudios son valiosos en la base genética y fisiología de la resistencia a la insulina y diabetes. Sujetos con "pérdida parcial de la función" por mutación de Pro12Ala en el exón B específico del PPAR gamma-2 tienen una combinación de menor IMC (Índice de Masa Corporal), mayor sensibilidad a la insulina y

mejora de los perfiles de lípidos (Deeb et al. (1998) *Nat. Genet.* 20:284-287; Alhuler et al. (2000) *Nat. Genet.* 26:76-80). Las consecuencias fisiológicas del polimorfismo Pro12Ala dependen en gran medida de factores genéticos y medioambientales desconcertantes. Los sujetos con ganancia de la función por mutación de Pro115Gln son extremadamente obesos y sensibles a la insulina (Ristow et al. (1998) *N. Engl. J. Med.* 339:953-959), que es coherente con el efecto de PPAR- γ en la estimulación de la diferenciación de los adipocitos. Por otra parte, las mutaciones dominantes-negativas, como Pro495Leu, Val318Met, Phe388Leu y Arg425Cys, están asociadas con lipodistrofia parcial, resistencia grave a la insulina, diabetes, e hipertensión (Savage et al. (2003) *Diabetes* 52:910-917; Agawal y Garg (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:408-411).

La enfermedad genética humana, la diabetes al comienzo de la madurez del joven (MODY), se caracteriza por la aparición clínica de la diabetes antes de los 25 de edad, un modo dominante autosómico de herencia, y un defecto primario en la función de células β pancreáticas. Se han identificado seis genes MODY: MODY1, factor nuclear 4 α de hepatocitos (HNF-4 α); MODY2, glucocinasa; MODY3, HNF-1 α , MODY4, factor-1 de promoción de la insulina (IPF-1); MODY5, HNF-1 β ; y MODY6, transactivador de células beta de la caja E o NeuroD1 (Fajans et al. (2001) *N. Engl. J. Med.* 345:971). Los genes MODY están involucrados en la anómala expresión de los genes y del metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas lo que conduce a la disfunción de las células β .

La diabetes tipo II es una enfermedad multifactorial compleja y heterogénea. Las formas monogénicas raras de MODY, aunque instructivas en relación con la patofisiología de la diabetes, puede no capturar el espectro de etiología de la diabetes humana. Las exploraciones del genoma humano completo eran usadas por muchos grupos de investigaciones genómicas para investigar los loci de diabetes y de resistencia a la insulina entre varias poblaciones étnicas susceptibles usando el polimorfismo genético (McIntyre y Walker (2002) *Clin. Endocrinol.* 57:303). El gen calpain-10 en el cromosoma 15 fue el primer gen identificado usando una exploración del genoma completo de 252 pares de hermanos de un grupo étnico mejicano-americano en Texas y se confirmó más tarde usando estudios de otros grupos étnicos. Los estudios clínicos sugieren que calpain-10 es uno de los factores que afectan a la acción de la insulina en el tejido muscular y a la secreción de insulina de la célula β pancreática. Los estudios en ratones a los que les falta calpain-10 sugieren que el calpain-10 media en la apoptosis inducida en ácidos grasos en las células β pancreáticas que segregan insulina (Horikawa et al. (2000) *Nat. Genet.* 26:163; Weedon et al. (2003) *Am. J. Hum. Genet.* 73:1208). La investigación de genes de la diabetes humana está aún muy lejos de su conclusión, el FTO en el cromosoma 16 es un descubrimiento reciente. El FTO con una función desconocida estaba asociado con el IMC y fue confirmado en varias poblaciones de estudio de la diabetes que totalizan unas 39.000 personas (Kaiser (2007) *Science* 316:185). Además, mediante estudios de asociación de genes candidatos, también se encontró que los genes KCNJ 11 (la subunidad rectificadora hacia dentro del canal de potasio sensible a ATP de la célula β) y HNF-4 α eran genes NIDDM (Taylor (2007) *Diabetes* 56:2844).

El ácido graso libre (FFA) es quizás el factor más importante en la patofisiología de la resistencia a la insulina. La espectroscopía de resonancia magnética no invasiva se ha usado en estudios clínicos que utilizan isótopos ^{13}C , ^{31}P , y ^1H para rastrear la síntesis de glucógeno en los músculos, la absorción de glucosa y la concentración de glucosa-6-fosfato por el grupo de Shulman en la Universidad de Yale. En sujetos humanos sanos bajo las pinzas euglicémica hiperinsulinémica, usando infusión de lípidos para mantener un elevado nivel de FFA en sangre, desarrollaron una resistencia a la insulina de forma gradual, alcanzando una reducción del 50 % en la absorción de glucosa por el músculo, estimulada por insulina, y una reducción del 50 % en la síntesis del glucógeno y de oxidación de la glucosa en el músculo después de 4-6 horas de infusión de lípidos, acompañada por una disminución >90 % en la actividad de la PI3K asociada a IRS-1 estimulado por insulina (Roden et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 97:2859; Dresner et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103:253).

Los receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPAR) son una subclase de la superfamilia de los receptores nucleares. Los PPAR son factores de transcripción dependientes del ligando que unen a elementos de respuesta específicos de ADN, como los heterodímeros con el receptor X retinoide. Esta unión del ligando conduce al reclutamiento preferente de complejos coactivadores de la descondensación de cromatina y la desestimación de los favores del complejo correpressor (Glass (2006) *J. Clin. Invest.* 116:556-560 doi:10.1172/JCI129713). Además, los PPAR pueden influir indirectamente, y normalmente de forma negativa, en la expresión de los genes, a través de la competencia con otros factores de transcripción (Gervois et al. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:33471-33477). Hay tres miembros en la familia de los PPAR: PPAR α , PPAR δ (o PPAR β) y PPAR γ . Muchas evidencias experimentales enlazan los tres receptores nucleares con la regulación y coordinación del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. Es bien conocida la asociación de las tres proteínas con varias enfermedades que incluyen diabetes, obesidad, dislipidemia e inflamación. Los tres PPAR son expresados de forma diferencial en tejidos diferentes (Semple et al. (2006). *J. Clin. Invest.* 116:556-560 doi:10.1172/JCI128003). El PPAR α tiene la mayor expresión en el hígado, en el riñón y en el corazón. El PPAR γ es expresado preferentemente en el tejido adiposo y en los macrófagos. La expresión de los PPAR δ está ampliamente desarrollada, pero con la mayor expresión en el tejido adiposo, en la piel y en el cerebro. Los tres receptores nucleares están involucrados en varios procesos celulares. La activación de PPAR α o PPAR δ conduce a un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos. El PPAR α está implicado en la síntesis de las lipoproteínas y en el catabolismo de los aminoácidos. El PPAR γ es crítico en la diferenciación de los adipocitos. Las proteínas tienen diferentes funciones fisiológicas. El PPAR α coordina la respuesta metabólica de los tejidos al ayunar, mientras la expresión del PPAR γ aumenta de forma post-prandial y su activación conduce a la regulación al alza de los genes que median en la absorción de los ácidos grasos en los

tejidos adiposos. El PPAR γ es el factor transcripcional clave que articula la diferenciación de los adipocitos. La función fisiológica del PPAR δ no es completamente comprendida. Sin embargo, la prueba reciente indica que puede ser un regulador del tipo de fibra muscular y la activación de la proteína conduce a resistencia a la obesidad y perfiles metabólicos mejorados (Wang et al. (2004). *PloS Biology* 2:e294).

5 Múltiples rutas pueden estar involucradas en la resistencia a la insulina. La activación de PPAR γ en los tejidos adiposos regula al alza la transcripción de genes involucrados en la captación de ácidos grasos (Semple et al. (2006) *J. Clin. Invest.* 116:556-560 doi:10.1172/JCI128003). El PPAR γ activa la lipoprotein-lipasa (LPL) endotelial y las proteínas de transporte de los ácidos grasos (FATP y CD36), que fomentan la hidrólisis del triglicérido de la lipoproteína y absorción de los FFA en los adipocitos, respectivamente. El proceso realza la sensibilidad a la insulina reduciendo los lípidos en la circulación y el acceso directo del lípido a los tejidos sensibles a la insulina, tal como el músculo y el hígado (Semple et al. (2006) *J. Clin. Invest.* 116:556-560 doi:10.1172/JCI128003). El PPAR γ ha sido bien caracterizado. El papel esencial de PPAR γ se demostró en la letalidad embrionaria de ratones homocigóticos deficientes en PPAR γ (Tsuchida et al. (2005) *J. Pharmacol. Sci.* 97:164-170). En ratones normales, la obesidad y la resistencia a la insulina pueden ser inducidas por dietas altas en grasas. Sin embargo, la obesidad o resistencia a la insulina inducidas por dietas altas en grasa es impedida en ratones heterocigóticos deficientes en PPAR γ (Tsuchida et al. (2005) *J. Pharmacol. Sci.* 97:164-170). Por ejemplo, los ratones de PPAR γ (+/-) heterocigóticos eran alimentados con una dieta de alto contenido en grasas, los ratones eran menos resistentes a la insulina y tenían adipocitos más pequeños que los ratones normales. Los ratones tenían también niveles inferiores de ácidos grasos y un aumento de los niveles de leptina en plasma (Kubota et al. (1999) *Mol. Cell* 4:597-609; Tsuchida et al. (2005) *J. Pharmacol. Sci.* 97:164-170). El efecto protector de la deficiencia de PPAR γ en heterocigóticos, sin embargo, era disminuido al tratar los ratones con agonistas de PPAR γ . La clase de la tiazolidindiona (TZD) de fármacos que sensibilizan a la insulina (Lehmann et al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:12953-12956) disminuye paradójicamente la sensibilidad a la insulina de ratones PPAR γ (+/-). Estos resultados sugieren que el PPAR γ media en la obesidad y en la resistencia a la insulina inducida por dieta de alto contenido en grasas, y la inhibición de PPAR γ podía hacer a los animales, o a las personas, menos susceptibles a las causas endógenas y exógenas de resistencia a la insulina. Por otra parte, la activación supra-fisiológica de PPAR γ por TZD en ratones normales alimentados con dieta de alto contenido en grasas mejoraba también la sensibilidad a la insulina, pero inducía al mismo tiempo la diferenciación de los adipocitos. La evidencia experimental indica que tanto la regulación a la baja como la regulación al alza de la actividad del PPAR γ mejoran la sensibilidad a la insulina.

30 El PPAR α es un sensor molecular de ácidos grasos endógenos y sus derivados. Juega un papel clave en la homeostasis de la glucosa y en el metabolismo de los lípidos en el hígado y en el músculo esquelético. Se ha demostrado que los agonistas de PPAR α , tal como fibratos, son eficaces en la disminución de los lípidos (Lefebvre et al. (2006). *J. Clin. Invest.* 116:571-580. doi:10.1172/JCI27989). En roedores, un agonista de PPAR α , Wy14643, mejoraba la sensibilidad a la insulina en ratones KKAY y realizaba el efecto antidiabético del agonista del PPAR γ rosiglitazona (Tsuchida et al. (2005) *Diabetes* 54:3358-3370). La hipertrofia de los adipocitos era impedida por el Wy14643 (Tsuchida et al. (2005) *Diabetes*. 54:3358-3370).

El PPAR δ ha surgido recientemente como un regulador metabólico en varios tejidos que incluyen las grasas, el músculo esquelético y el corazón (Barish et al. (2006) *J. Clin. Invest.* 116: 590-597). Realza el catabolismo de los ácidos grasos y el desacoplamiento de la energía, lo que conduce a una disminución en el almacenamiento de los triglicéridos y a una fortaleza mejorada. La expresión concreta de una forma activada de PPAR δ en el músculo esquelético en ratones confería resistencia a la obesidad con perfiles metabólicos mejorados (Wang et al. (2004). *PloS Biology* 2:1532-1539).

45 Modular la actividad del PPAR en el cuerpo es crítico para mantener una normal sensibilidad a la insulina en respuesta a la dieta y otros impactos medioambientales. Estudios genéticos en ratón ofrecen grandes oportunidades para comprender la compleja interacción de los receptores nucleares y de los factores medioambientales. La actividad del PPAR puede ser regulada por diferentes moduladores. Los PPAR interactúan con diferentes ligandos, llevando a la activación de diferentes conjuntos de genes diana. Como resultado, se generan actividades transcripcionales y perfiles farmacológicos diferentes debido a la diferente afinidad y efectos de los moduladores por los PPAR. Los moduladores de los PPAR pueden dividirse en varios grupos, incluidos el agonista completo, el agonista parcial, el antagonista y el coagonista (Knouff y Auwerx (2004), *Endocrine Review* 25:899-918).

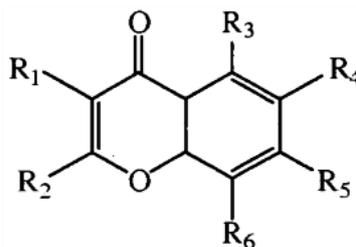
55 Se han desarrollado muchos agonistas completos de PPAR. Rosiglitazona y pioglitazona son dos TZD que se emplean clínicamente en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 (Lehmann et al. (1995) *J. Biol. Chem* 270:12953-12956). Aunque estos agonistas PPAR γ disminuyen la resistencia a la insulina y minimizan los niveles de glucosa en el plasma, los agonistas completos tienen graves efectos secundarios incluida la ganancia de peso debido a un aumento en la masa de grasa y edema, retención de líquidos, hemodilución, y fallo cardíaco en hasta el 15 % de los pacientes (Mudaliar et al. (2003). *Endocr. Pract.* 9:406-416). Algunas TZD están asociadas también con una significativa toxicidad para el hígado. Las terapias con fármacos que impiden o tratan múltiples aspectos del síndrome metabólico tienen limitadas sus opciones y su tasa de éxito, aunque se han perseguido activamente nuevas dianas moleculares con los fármacos.

60 Otras rutas de sensibilización a la insulina involucran los perfiles modificados de adipocinas producidas a partir de adipocitos incluidas TNF α , IL-6, CRP, PAI-1, angiotensinógeno, resistina, leptina y adiponectina (Lau et al. (2004).

Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol. 288:H2031-H2041). Estas adipocinas tienen profundos efectos sobre la resistencia a la insulina y sobre la homeostasis vascular. Entre estas proteínas, la adiponectina es una de las mejor caracterizadas hormonas de los adipocitos que median en la sensibilización a la insulina. Las TZD estimulan la expresión del gen adiponectina e incrementan las concentraciones de adiponectina circulante en ratones obesos y la resistencia a la insulina en humanos obesos (Maeda et al. (2001) Diabetes 50:2094-2099). Debido a que la adiponectina mejora la tolerancia a la glucosa incrementando la sensibilidad a la insulina, el efecto de las TZD sobre la secreción de adiponectina puede explicar, al menos en parte, el efecto hipoglucémico de las TZD en pacientes con diabetes sacarina de tipo 2.

Rutas adicionales están involucradas en la sensibilización a la insulina en humanos. Por ejemplo, también se mostró que leptina mejoraba la sensibilidad a la insulina en los roedores. En ratones lipoatróficos, la administración de una combinación de dosis fisiológicas de adiponectina y leptina conducen a una restauración completa de la sensibilidad a la insulina, pero sólo se observó una sensibilización parcial a la insulina con un tratamiento de forma individual de adiponectina o leptina (Yamauchi et al. (2001). Nat. Med. 7:941-946). La leptina disminuye la expresión de las enzimas lipogénicas y consiguientemente activa la ruta del PPAR α en el hígado, en el tejido adiposo marrón y en el músculo esquelético, lo que conduce a un aumento de la expresión de UCP-2 y de las enzimas involucradas en la beta-oxidación. En humanos, las concentraciones de adiponectina en plasma no habían cambiado en los individuos con una mejora en la sensibilidad a la insulina por pérdida de peso (Abbasi et al. (2004), Metabolism 53:280-283). En otro estudio, se demostró que las mejoras en sensibilidad a la insulina con el ejercicio y el entrenamiento no eran los resultados del cambio de los niveles de adiponectina en humanos (Marcell et al. (2005), Metabolism 54:533-41). Los datos sugieren que existen rutas adicionales para la sensibilización a la insulina y diferentes mecanismos están involucrados en la mejora de la sensibilidad a la insulina después de la pérdida de peso y después del tratamiento con compuestos TZD.

Las cromonas son un tipo específico de compuestos aromáticos con una benzopiran-4-ona como su principal estructura esquelética como se ilustra por la siguiente estructura general:



en donde

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, un éster seleccionado del grupo constituido por galato, acetato, ésteres de cinnamoilo y de hidroxilcinnamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; y una hexosa o pentosa, en donde dicha hexosa o pentosa está unida a la cromona mediante un carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno y en donde dicha hexosa o pentosa se selecciona del grupo constituido por aldopentosas, metil-aldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa y los derivados químicos de los mismos, incluidos un dímero, un trímero y otras cromonas polimerizadas;

en donde dicho grupo alquilo y/o alquenilo es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1-20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces y un grupo o grupos de sustitución seleccionados del grupo constituido por -OH, =O y -OR en diferentes posiciones;

X se selecciona del grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables incluyendo pero sin limitarse a hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato, etc.; y

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

Hasta la fecha hay sólo 183 cromonas aisladas de fuentes naturales (The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall/CRC, Versión 5:1 Junio 2001).

Se dice que las cromonas exhiben actividad inhibidora de la monoamino-oxidasa (Fujimoto et al. (2002) Chem. Pharm. Bull. 50:330-336), actividad inhibidora de la tirosinasa (Oiao et al. (2002) Chem. Pharm. Bull. 50:309-311), efectos anti-plaquetarios (Leoncini et al. (1991) Pharmacol. Res. 23:139-148), actividad inhibidora del crecimiento contra los patógenos orales (Cai (1996) J. Nat. Prod. 59:987-990), actividad inhibidora de la prostagladin-H-sintasa (Jurenka et al. (1989) Comp. Biochem. 93:253-255). Las cromonas poseen también eficacia terapéutica contra la artritis inducida por colágeno de tipo II en ratas (Inaba et al. (2000) Chem. Pharm. Bull. 48:131-139) y actividad hipolipidémica (Witiak et al. (1975) J. Med. Chem. 18:935-942; Tetko et al. (1995) Bioorg. Khim. 21:809-815). Se ha

informado también que las cromonas pueden funcionar como ligandos receptores sigma selectivos (Erickson et al. (1992) J. Med. Chem. 35:1526-1535). Basado en estudios en animales, las cromonas son fácilmente absorbidas y metabolizadas (Crew et al. (1976) Xenobiotica 6:89-100) y el enlace c-glucosilo de aloesina puede ser desdoblado por bacterias intestinales en humanos (Che et al. (1991) Chem. Pharm. Bull. 39:704-708).

5 Aloe es una planta complicada que contiene muchas sustancias biológicamente activas (Dagne et al. (2000) Current
Org. Chem. 4:1055-1078; Cohen et al., en Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects, 1ª ed. WB Saunders,
Filadelfia (1992)). Se conocen más de 300 especies de Aloe, la mayoría de las cuales son autóctonas de África.
10 Estudios han mostrado que las sustancias biológicamente activas están localizadas en secciones separadas de la
hoja de aloe, un filete de gel transparente localizado en el centro de la hoja, en la corteza de la hoja o córtex de la
hoja y en un fluido amarillo contenido en las células pericíclicas de los paquetes vasculares, localizados entre la
corteza de la hoja y el filete de gel interno, denominado látex de aloe (Dagne et al. (2000) Current Org. Chem.
4:1055-1078). El filete de gel transparente que está localizado en el centro de la hoja contiene polisacáridos solubles
en agua, ácidos orgánicos, aminoácidos y sales inorgánicas. El gel de Aloe vera es producido a partir de esta parte
15 de las plantas de Aloe. La corteza de la hoja o córtex de la hoja, y el fluido amarillo contenido en las células
pericíclicas de los paquetes vasculares contienen compuestos aromáticos tales como antraquinonas, cromonas,
ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas, sales y otros compuestos variados. El gel de la hoja entera de Aloe es
producido triturando la planta de aloe entera, lo que incluye los contenidos de todos los componentes solubles en
agua incluidas antraquinonas, cromonas, polisacáridos y otros compuestos. Debido al color y a la fototoxicidad, la
20 irritación GI (gastrointestinal), la citotoxicidad y otros efectos secundarios de las antraquinonas, el gel de la hoja
entera de aloe, se procesa para eliminar todos los componentes aromáticos, incluidas las antraquinonas y las
cromonas (International J. Toxicology (2007), 26 (supl. 2):1-50).

Históricamente, los productos de Aloe se han usado en aplicaciones dermatológicas para el tratamiento de
quemaduras, úlceras y otras heridas. Estos empleos han estimulado mucho la investigación en la identificación de
25 compuestos de plantas de Aloe que tienen actividad clínica, especialmente actividad anti-inflamatoria (véanse, p. ej.,
Grindlay y Reynolds (1986) J. of Ethnopharmacology 16:117-151; y Hart et al. (1988) J. of Ethnopharmacology
23:61-71). Como resultado de estos estudios ha habido numerosos informes de compuestos de Aloe que tienen
actividades biológicas diversas, incluidas las actividades anti-tumor, anti-úlceras gástricas, anti-diabetes, la actividad
anti-tirosinasa y la actividad antioxidante (International J. Toxicology (2007), 26 (supl. 2):1-50).

Se ha informado de que las cromonas aisladas de varias especies de *Aloe* tienen actividad biológica diversa. Se dice
30 que la aloesina inhibe la actividad de la tirosinasa (Jones et al., Journal of Pigment Cell Research, Acceptance, 10
de Feb., 2002) y regula al alza la actividad cinasa dependiente de la ciclina E (Lee et al. (1997) Biochem. Mol. Biol.
Int. 41:285-292). Una c-glucosilcromona aislada de *Aloe barbadensis* demuestra la actividad anti-inflamatoria (Hutter
et al. (1996) J. Nat. Prod. 59:541-543) y la actividad antioxidante similar a la de alfa-tocoferol basada en un modelo
de homogeneizado de cerebro de rata (Lee et al. Free Radic Biol. Med. 28:261-265).

35 Las hojas de *Aloe barbadensis* y sus principios amargos presentan efectos sobre el nivel de glucosa en sangre en
ratones normales y diabéticos por aloxano (Ajabnoor (1990) J. Ethnopharmacol. 28:215-220) y la savia seca de
varias especies de *Aloe* demuestran la actividad anti-diabetes en estudios clínicos (Ghannam, (1986) Horm Res.
24:288-294). Los efectos anti-diabetes del gel o extracto de aloe han sido demostrados en modelos animales con
diabetes inducida con bajos niveles de estreptozotocina (Beppu (2006) J. Ethnopharmacol. 103(3):468-77;
40 Rajasekaran (2006) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33(3):232-7). Los efectos anti-diabetes de este tipo eran
informados como protección de toxicidad selectiva inducida por bajas dosis de estreptozotocina a las células B de
los islotes por fenoles y otros compuestos con pesos moleculares menores que 10 kDa (kilodalton) (Rajasekaran
(2006) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33(3):232-7). Se ha informado de otros componentes como los minerales
inorgánicos (Rajasekaran (2005) Biol. Trace Elem. Res. 108 (1-3):185-195) y los antioxidantes del gel de Aloe Vera
45 en relación con sus efectos anti-diabetes (Rajasekaran (2005) Pharmacol. Rep. 57(1):90-96).

Recientemente, cinco fitosteroles del gel de *Aloe vera* eran identificados como componentes anti-diabetes (Tanaka
(2006) Biol. Pharm. Bull. 29(7):1418-1422). En el 2007, los componentes químicos del gel de la hoja de *Aloe ferox* se
50 analizaron a fondo y con el resultado de potentes propiedades antioxidantes y su potencial uso para aliviar síntomas
y/o impedir la diabetes especulada (Loots (2007) J. Agric. Food Chem. 55(17):6891-6896).

La patente de EE.UU. nº 6.780.440 describe composiciones de hierbas que incluyen aloe para el control de la
diabetes y del peso. Sin embargo, no se identificaron los componentes del principio activo ni el mecanismo de
actuación. En la patente de EE.UU. nº 5.88.984, los hidratos de carbono complejos de aloe se reivindicaron como
una de las composiciones para el tratamiento de la diabetes. También en la patente de EE.UU. nº 4.598.069, los
polisacáridos de aloe eran reivindicados para el tratamiento de la hipoglucemia. La patente de EE.UU. nº 5.627.204
55 describe derivados sintéticos de cromona con diferentes modelos de sustitución que actúan como inhibidores de
aldosa-reductasa para uso en la prevención y tratamiento de la diabetes. La patente de EE.UU. nº 6.133.305
reivindicó los compuestos sintéticos que tienen esqueleto de cromona para tratar una protein-cinasa relacionada con
trastornos que incluyen la diabetes.

60 Yagi et al. describen un grupo de compuestos aislados de Aloe, particularmente aloesina y uno de sus derivados, 2"-
O-feruloilaloesina, que son eficaces inhibidores de tirosinasa (Yagi et al. (1987) Plant. Medica. 515-517). 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 de la tirosinasa (Yagi et al. (1987) Planta Medica 515-517). La patente de EE.UU. n° 6.123.959, titulada "Aqueous Composition Comprising Active Ingredients for the Depigmentation of the Skin," describe composiciones acuosas que comprenden liposomas y fosfolípidos, y al menos un inhibidor competitivo de una enzima para la síntesis de melanina, en combinación con al menos un inhibidor no competitivo de una enzima para la síntesis de melanina. La patente de EE.UU. n° 6.884.783 describía 7-hidroxicromonas, incluidas aloesina y aloesinol como potentes antioxidantes para la prevención y tratamiento de enfermedades y estados asociados con el daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) y otro estrés oxidativo.

Hasta la fecha, métodos conocidos para purificar aloesina, así como otras cromonas involucran el uso de la cromatografía (*Véanse, 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 mediante análisis químicos y no son prácticos para la producción de aloesina a escala preparativa. En la patente de EE.UU. n° 6.451.357, titulada "Method of Purification of Aloesin," se ha descrito un método para la purificación de aloesina usando la cristalización.

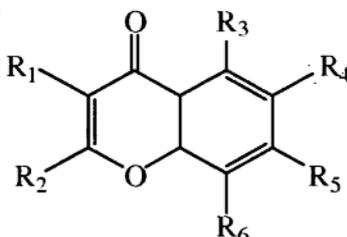
Sumario de la invención

La presente invención describe la identificación y aislamiento de cromonas y nuevas composiciones de cromonas de fuentes de plantas que presentan la regulación al alza de la producción de adiponectina por parte de los adipocitos y la normalización de virtualmente cientos de genes relacionados con las rutas metabólicas y de señalización de la glucosa y de los ácidos grasos. Las composiciones de cromonas son eficaces para mejorar la producción de adiponectina por adipocitos y regular los genes involucrados en la biosíntesis de los ácidos grasos, en la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, en la biosíntesis de esteroides, en la gluconeogénesis, en el transporte de grasas, en la señalización en el hígado con los PPAR α /RXR α y en el mecanismo de xenobióticos. Las composiciones de cromonas pueden ser usadas para aumentar la sensibilidad a la insulina, mejorar la tolerancia a la glucosa, disminuir los niveles de triglicéridos y equilibrar los niveles de glucosa en mamíferos. En la presente invención se incluyen métodos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades y estados, incluidos pero sin limitarse a resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndromes metabólicos, dislipidemia e hipertrigliceridemia.

La presente invención incluye métodos para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico y de enfermedades y estados mediados por la resistencia a la insulina en mamíferos. El método consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición farmacéutica o nutracéutica que comprenda una o más cromonas. La cromona o mezcla de cromonas puede ser aislada de una sola fuente o de múltiples fuentes, que incluye pero que no se limita a una obtenida sintéticamente, que esté presente en la naturaleza o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, la presente invención describe un método para aumentar la producción de adiponectina a partir de adipocitos que consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una cromona o mezcla de cromonas; en donde dicha cromona o una mezcla de cromonas. En otra realización, la presente invención describe un método para normalizar cambios inducidos por dietas de alto contenido en grasas de expresiones de genes en la biosíntesis de los ácidos grasos, en la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, en la biosíntesis de esteroides, en la gluconeogénesis, en el transporte de grasas, en la señalización en el hígado con PPAR α /RXR α y en el metabolismo de xenobióticos comprendiendo dicho método la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de una composición que comprende una cromona o una mezcla de cromonas. Todavía en otra realización, la presente invención incluye un método para la prevención y tratamiento de la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, dislipidemia e hipertrigliceridemia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende una cromona o una mezcla de cromonas.

Las cromonas que pueden ser usadas de acuerdo con lo siguiente incluyen los compuestos ilustrados por la siguiente estructura general:



en donde

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂,

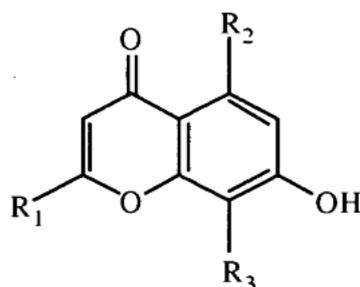
5 -NR₃⁺X⁻, un éster seleccionado del grupo que incluye pero que no se limita a galato, acetato, ésteres de cinnamoilo y de hidroxil-cinnamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; y una hexosa o pentosa, en donde dicha hexosa o pentosa está unida a la cromona mediante un carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno y en donde dicha hexosa o pentosa se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a aldopentosas, metil-aldopentosa, aldohexosas, cetohexosa y los derivados químicos de los mismos, incluidos un dímero, un trímero y otras cromonas polimerizadas;

10 en donde dicho grupo alquilo y/o alquenilo es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1-20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces y un grupo o grupos de sustitución seleccionados del grupo constituido por -OH, =O y -OR en diferentes posiciones;

X se selecciona del grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluye pero que no se limita a hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato; y

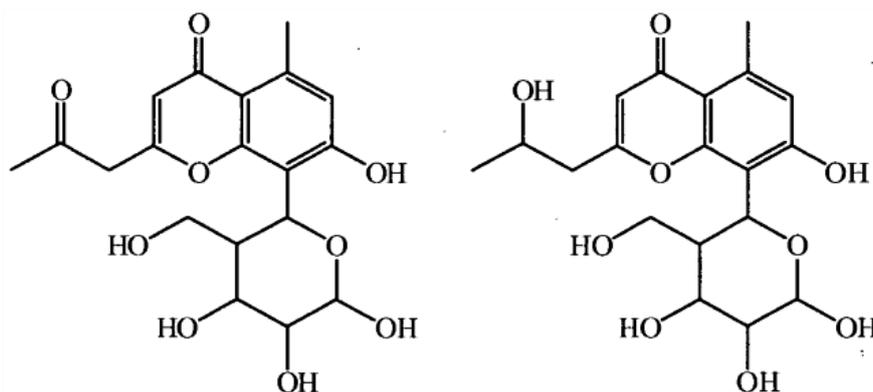
15 R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la cromona (o cromonas) es una benzopiran-4-ona (7-hidroxi-cromona) seleccionada del grupo de compuestos que tienen la siguiente estructura general:



en donde R₁, R₂, y R₃ son como las definidas anteriormente.

20 En otra realización de esta invención la cromona se selecciona de aloesina y/o aloesinol cuyas estructuras se representan a continuación.



Aloesina

Aloesinol

25 Las cromonas de esta invención pueden ser obtenidas por métodos sintéticos o pueden ser aisladas de los géneros de numerosas familias de plantas, que incluyen pero que no se limitan a *Acacia*, *Adina*, *Aloe*, *Alternarin*, *Amoora*, *Antidesma*, *Artemisia*, *Baekia*, *Cassia*, *Clusea*, *Cnidium*, *Convolvulus*, *Epimedium*, *Eriosema*, *Eriostemon*, *Eugenia*, *Garcinia*, *Hypericum*, *Lindenbergia*, *Pancratium*, *Penicillium*, *Polygonum*; *Ptaeroxylon*, *Rheum*, *Sophora*, *Stephanitis*, *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*. En realizaciones preferidas, la planta se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremnofila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera variedad chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baekia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygonum cuspidatum*, *Sophora*

tomentosa y *Stephanitis rhododendri*. En una realización, las cromonas son aisladas de las hojas enteras de *Aloe ferox*, *Aloe vera* o *Aloe barbadensis*.

Las cromonas pueden encontrarse en varias partes de la planta que incluyen pero que no se limitan a tallos, cortezas de tallos, troncos, cortezas de troncos, ramillas, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes tiernos, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas

La presente invención describe el aislamiento y purificación de las cromonas y de las plantas que contienen estos compuestos. El método de la presente invención comprende: a) extraer la biomasa terrestre de una planta que contiene una cromona, particularmente una cromona seleccionada de aloesina o aloesinol; b) neutralizar y concentrar dicho extracto; y c) purificar dicho extracto neutralizado y concentrado usando un método cromatográfico, que incluye pero que no se limita a poliamida, LH-20, resina XAD, resina CG-161, gel de sílice o cromatografía de fase inversa. En una realización de la invención el extracto es purificado usando un método seleccionado del grupo constituido por recristalización, precipitación, reparto con disolvente y/o separación cromatográfica. La presente invención proporciona un proceso comercialmente viable para el aislamiento y purificación de cromonas que tienen actividad fisiológicamente deseable.

La preparación de productos para administrar en preparaciones farmacéuticas puede ser realizada mediante diversos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cromonas pueden ser formuladas como un polvo de hierbas en la forma de su existencia natural; como extractos con disolvente y/o fluido supercrítico en diferentes concentraciones; como los compuestos enriquecidos y purificados a través de recristalización, separación en columna, reparto con disolvente, precipitación y otros medios, como puro y/o como una mezcla que contiene sustancialmente cromonas purificadas preparadas por métodos sintéticos.

Los autores de la invención han demostrado usando modelos animales aceptados que la administración de una cromona o mezclas de las mismas, tal como aloesina y/o aloesinol o extractos que comprenden mezclas de cromonas aisladas de diversas fuentes de plantas, por ejemplo, exudados de las hojas de *Aloe ferox*; junto con polvos y extractos de gel de *Aloe vera* o de gel de la hoja entera de *Aloe vera*, reducían la resistencia a la insulina, disminuían, simultáneamente, los niveles de insulina, mantenían bajos niveles de glucosa en ayunas y reducían significativamente los niveles de triglicéridos sin ningún impacto sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal. El nuevo uso de una o más cromonas y/o extractos estandarizados de cromona aislados de plantas que contienen estos compuestos, tal como *Aloe vera* y *Aloe ferox* y otras especies de plantas, no se ha descrito previamente en mejorar resistencia a la insulina y en disminuir los niveles de glucosa en sangre en ayunas. Las cromonas descritas pueden usarse como sensibilizadores de la insulina y en la profilaxis para la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos, que incluyen pero que no se limitan a resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, síndromes metabólicos, dislipidemia, hipertrigliceridemia e hipertrigliceridemia de mamíferos, que incluyen pero que no se limitan a los seres humanos.

Las composiciones de esta invención pueden ser administradas por cualquier método conocido por el experto normal en la técnica. Los modos de administración incluyen pero no se limitan a la administración enteral (oral), a la administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y a la aplicación tópica. El método de tratamiento según esta invención comprende administrar de forma interna o tópicamente a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la cromona individual y/o de una mezcla de cromonas aisladas de una sola fuente o de múltiples fuentes que incluye pero que no se limita a la obtenida sintéticamente, a la que está presente en la naturaleza o a cualquier combinación de las mismas. La pureza de la cromona individual y/o de una mezcla de cromonas oscila desde 0,01 % a 100 %, dependiendo de la metodología usada para obtener el compuesto o compuestos. La concentración de la composición de cromona en administraciones orales, inyectables, tópicas, en aerosoles, en supositorios e intradérmicas puede ser de 0,001 % a 99,99 % en peso de la cantidad total de una formulación apropiada. Las cromonas pueden ser usadas por cualquiera de las rutas de administración seleccionadas del grupo que consiste en la administración oral, tópica, en aerosol, supositorio, intradérmica, intramuscular e intravenosa con una dosificación diaria en un intervalo de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg de peso corporal del mamífero, particularmente los seres humanos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa gráficamente el efecto de la indometacina en los niveles de adiponectina secretada en el medio que usa protocolos previamente publicados (Figura 1A) y mejorados (Figura 1B). Las células 3T3-L1 de la Fig. 1A. eran inducidas a diferenciarse durante 7 días y tratadas con indometacina durante 24 horas. El más elevado incremento medio en veces en el nivel de adiponectina era de 1,6 veces por indometacina a 1 μ M. Las células 3T3-L1 de la Fig. 1B. eran inducidas a diferenciarse durante 2 días y tratadas con indometacina durante 2 días. El más elevado incremento medio de veces en el nivel de adiponectina era de 52 veces para indometacina a 100 μ M, mientras el más bajo incremento en veces era de 7 veces a 10 μ M.

La Figura 2 ilustra gráficamente el efecto de extracto de la planta *Aloe ferox* (P0017-OE) en los niveles de adiponectina secretada en el medio de células 3T3-L1 diferenciadas. En resumen, las células 3T3-L1 eran inducidas a diferenciarse y después tratadas con el extracto orgánico en bruto P0017-OE a concentraciones de 0,5, 0,166 y

0,055 mg/ml durante 48 horas. El extracto en bruto original era diluido 1:3, después 1:9 para el ensayo de dosis-respuesta.

La Figura 3 representa el perfil de HTP-UV y la combinación de fracciones de P0017-OE. Todas las 96 fracciones eran combinadas en 8 sub-fracciones. La P0017-OE-NP-F3 era la más activa de las 8 sub-fracciones en el ensayo de adiponectina.

La Figura 4 ilustra el fraccionamiento en columna C₁₈ de P0017-OE-NP-F3. El P0017-AC1 y el P0017-AC2 presentaron actividad en el ensayo de adiponectina y eran identificados como aloesina y aloesinol, respectivamente.

La Figura 5 representa la identificación de aloesina (UP394) mediante la elucidación de los espectros de UV y la comparación del tiempo de retención en HPLC con un patrón auténtico.

La Figura 6 representa la identificación de aloesinol (UP396) mediante la elucidación de los espectros de UV y la comparación del tiempo de retención en HPLC con un patrón auténtico

La Figura 7 ilustra gráficamente el efecto de UP394 (aloesina) y UP396 (aloesinol) en los niveles de adiponectina secretada en el medio de células 3T3-L1 diferenciadas. En resumen, las células 3T3-L1 eran inducidas a diferenciarse y después tratadas con UP394 (aloesina) y UP396 (aloesinol) a concentraciones de 30 μ M durante 48 horas. Las concentraciones de adiponectina en el medio de cultivo se determinaron con un kit de ELISA para adiponectina.

La Figura 8A ilustra los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa llevado a cabo en ratones C57BL/6J a una dosis de 2 g/kg en el día 18 después del tratamiento. En resumen, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de administrarles glucosa. Los ratones eran tratados con GW 1929 (5 mg/kg) (■), UP394 (100 mg/kg) (▲), UP396 (100 mg/kg) (x) y vehículo (◆) intraperitonealmente. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. A los animales se les proporcionó una dieta de alto contenido en grasas durante 12 semanas. El tratamiento comenzó en la semana 8. Los datos son medias \pm SD (desviación típica o estadística), n = 6. Se observó la utilización significativa de glucosa a los tiempos de 60, 90 y 120 minutos para GW 1929 y UP396 cuando se comparaba con el vehículo, p < 0,05 (*). Los valores de P para GW1929, UP394 y UP396 eran 0,00, 0,87 y 0,43 a T0; 0,07, 0,16 y 0,23 a T30, respectivamente, cuando se comparaban con el vehículo. Los valores de P para UP394 eran 0,15 a T60; 0,10 a T90 y 0,17 a T120, cuando se comparaban con el vehículo.

La Figura 8B ilustra los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina realizado sobre ratones C57BL/6J a una dosis de 0,5 unidades/kg en el día 24 de tratamiento activo. En resumen, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de la inyección de insulina. Los ratones eran tratados con GW 1929 (■), UP394 (▲), UP396 (x) y vehículo (◆) durante 24 días. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. A los animales se les proporcionó una dieta de alto contenido en grasas durante 12 semanas. El tratamiento comenzó en la semana 8. Los datos son medias \pm SD, n = 6. Se observó una significativa eliminación de la glucosa en los puntos temporales de T30, T60 y T90 para UP394 y UP396 así como para GW1929, cuando se comparaban con el vehículo, p < 0,05 (*). Los valores de P para GW1929, UP394 y UP396 eran 0,00, 0,14 y 0,67 a T0; 0,08, 0,00 y 0,04 a T120, respectivamente, cuando se comparaban con el vehículo.

La Figura 9 ilustra gráficamente el efecto de UP394 y UP396 en los niveles de insulina al usar el Modelo de Diabetes Inducida por dieta de Alto Contenido en Grasas. A los animales se les trató con GW 1929 (5 mg/kg), UP394 (100 mg/kg), UP396 (100 mg/kg) y vehículo intraperitonealmente durante 2 semanas después de la inducción de trastornos metabólicos con una dieta de alto contenido en grasas en la semana 8. La sangre se extrajo por la vena de la cola y después se centrifugó para lograr el plasma. Los niveles de insulina en plasma se midieron con un kit de ELISA para insulina (Crystal. Chem. Chicago, IL).

La Figura 10 ilustra gráficamente los niveles semanales de glucosa en ayunas en ratones machos db/db tratados con GW 1929 (■), N931 (▲) y vehículo (◆) durante 10 semanas. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de que se tomaran las medidas. Los valores indicados son medias \pm SD, n = 8, los niveles de glucosa en sangre en ayunas eran significativamente inferiores para GW 1929 y N-931 a las 6, 7, 9 y 10 semanas, cuando se comparaban con el vehículo P < 0,05 (*).

La Figura 11 A representa los resultados de una prueba oral de tolerancia a la glucosa llevado a cabo en ratones db/db a una dosis de 3g/kg después de 10 semanas de tratamiento. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de la carga de glucosa. Los ratones eran tratados con GW1929 (■), N931 (▲) y vehículo (◆) durante 10 semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. Los datos son medias \pm SD, n = 8. Se observó la utilización significativa de glucosa a los tiempos de 0 y 120 minutos tanto para GW 1929 como para N-931 cuando se comparaban con el vehículo, P < 0,05 (*). Los valores de P para GW1929 y N931 eran 0,15, y 0,05 a T30; 0,33 y 0,02 a T60; y 0,002 y 0,083, a T90 respectivamente, cuando se comparaban con el vehículo.

La Figura 11B representa los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina realizado en ratones db/db a una dosis de 0,5 unidades/kg después de seis semanas de tratamiento. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de la inyección de insulina. Los ratones eran tratados con GW1929 (■), N931 (▲) y vehículo (◆) durante 10 semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. Los datos son medias \pm SD, $n = 8$. Se observó una eliminación significativa de la glucosa a los tiempos de 0, 30 y 60 minutos tanto para GW1929 como para N-931 cuando se comparaban con el vehículo, $p < 0,05$ (*). Los valores de P para GW1929 y para N931 eran 0,00 y 0,14 a T90, y 0,00 y 0,09 a T120, respectivamente, cuando se comparaban con el vehículo.

La Figura 12 ilustra gráficamente los niveles semanales de triglicéridos en ayunas de ratones macho db/db tratados con GW1929, N-931 y vehículo durante 10 semanas. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de que se tomaran las medidas. Los valores indicados son niveles de triglicéridos del vehículo en tantos por ciento, $n = 8$. Se encontró una significativa reducción en los niveles de triglicéridos en los animales tratados con GW 1929 y N-931 cuando se comparaban con el vehículo después de 10 semanas de tratamiento, $P < 0,05$ (*).

Las Figuras 13A-13F ilustran los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa llevado a cabo en la semana 3 después del comienzo del tratamiento. El día del ensayo, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas y recibieron administración intraperitoneal de glucosa a una dosis de 2 mg/g. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos de 0 (antes de la inyección de glucosa), 30, 60, 90 y 120 minutos después del suministro de glucosa. La sangre se obtuvo a través de la vena de la cola. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. A. vehículo (◆) frente a (vs., *versus*) 400 mg/kg Qmatrix®, B. vehículo (◆) frente a GW1929 (■), C. vehículo (◆) frente a UP780 (100 mg/kg) (■), D. vehículo (◆) frente a UP780 (200 mg/kg) (■), E. vehículo (◆) frente a UP780 (400 mg/kg) (■) y F. vehículo (◆) frente a animales alimentados con dieta regular de roedor, $P < 0,05$ (*). La eficacia de UP780 se detectó a las tres semanas de tratamiento. Después de las tres semanas de tratamiento oral diario, se encontró una estadísticamente significativa eliminación de la glucosa a los tiempos de 30, 60 y 90 minutos después de la carga intraperitoneal de glucosa en animales tratados con 200 mg/kg de UP780 y de GW1929. De forma similar, los animales tratados con 400 mg/kg de UP780 mostraban una significativa utilización de la glucosa a los 30 minutos de tiempo, $P \leq 0,05$ (*).

La Figuras 14A-14E ilustran los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa llevado a cabo en la semana 9 después del comienzo del tratamiento. El día del ensayo, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas y recibieron administración intraperitoneal de glucosa a una dosis de 2 mg/g. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos de 0 (antes de la inyección de glucosa), 30, 60, 90 y 120 minutos después del suministro de glucosa. La sangre se obtuvo a través de la vena de la cola. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. A. vehículo (◆) frente a GW1929 (■), B. vehículo (◆) frente a Qmatrix® (400 mg/kg) (■), C. vehículo (◆) frente a UP780 (100 mg/kg) (■), D. vehículo (◆) frente a UP780 (200 mg/kg) (■) y E. vehículo (◆) frente a UP780 (400 mg/kg) (■), $P < 0,05$ (*). Comparado con el control vehículo, los animales tratados con 400 mg/kg de UP780 y Qmatrix® mostraban diferencias estadísticamente significativas en la utilización de la glucosa a los tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa en el PI, $P \leq 0,05$ (*), después de 9 semanas de tratamiento oral diario. Los animales tratados con 100 mg/kg de UP780 mostraban una diferencia significativa sólo a T30. El control positivo, GW1929, tiene valores de P menores que 0,05 en cada uno de los puntos temporales analizados.

La Figuras 15A-15E ilustran los resultados de una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina llevada a cabo en la semana 3 después del comienzo del tratamiento. El día del ensayo, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas y recibieron administración intraperitoneal de insulina a una dosis de 0,5 unidades/kg. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos de 0 (antes de la inyección de glucosa), 30, 60, 90 y 120 minutos después del suministro de glucosa. La sangre se obtuvo a través de la vena de la cola. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. A. vehículo (◆) frente a Qmatrix® (400 mg/kg) (■), B. vehículo (◆) frente a UP780 (100 mg/kg) (■), C. vehículo (◆) frente a UP780 (200 mg/kg) (■), D. vehículo (◆) frente a UP780 (400 mg/kg) (■) y E. vehículo (◆) frente a GW1929, $P < 0,05$ (*). El efecto de sensibilización a la insulina de UP780 se verificó en la prueba de tolerancia a la insulina después de 10 semanas de tratamiento oral diario. Se observó la sensibilización a la insulina estadísticamente significativa en los animales tratados con 400 mg/kg de UP780 en todos los puntos temporales considerados, $P \leq 0,05$ (*). No se observó ninguna otra diferencia significativa en el resto de grupos de tratamiento, excepto en el GW1929 1 hora después de la inyección de insulina, $P \leq 0,05$.

La Figura 16 ilustra gráficamente el efecto consistente de disminución de la glucosa del UP780 administrado a una dosis de 200 mg/kg. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas se midieron al inicio (línea base) y 2, 5, y 7 semanas después del comienzo del tratamiento usando 15-20 μ l de sangre obtenida a través de la vena de la cola. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y un control de vehículo. Se encontraron niveles disminuidos estadísticamente significativos de glucosa en sangre en ayunas a la semana 2 después del tratamiento, $P < 0,05$ (*)^(*). Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. Los animales tratados con 200 mg/kg de UP780 y GW1929 mostraban un nivel de glucosa en ayunas inferior estadísticamente significativo en ambas semanas (semanas 5 y 7) cuando se comparaban con el vehículo no tratado. Los ratones tratados con Qmatrix® y UP780 a 400 mg/kg presentaban un nivel inferior similar del nivel de glucosa en sangre en

ayunas en la semana 5. Por otra parte, los grupos tratados con 100 mg/kg de UP780 mantuvieron un nivel relativamente alto de glucosa en sangre en ayunas comparado con el vehículo no tratado en todas las semanas de ensayo, $P \leq 0,05$ (*).

5 La Figura 17 ilustra gráficamente la reducción del tanto por ciento de los niveles de glucosa en sangre en ayunas frente a un control de vehículo medidos a 2, 5, y 7 semanas después del comienzo del tratamiento. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y un control de vehículo. Niveles consistentemente bajos de los niveles de glucosa en sangre en ayunas se encontraron en el grupo de tratamiento con 200 mg/kg de UP780 a la semana 2. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. La reducción del tanto por ciento de nivel de glucosa en ayunas, animales tratados con 200 mg/kg de UP780, se determinaron y se encontró que eran 18 %, 20 % y 17 % para las semanas 2, 5, y 7, respectivamente, cuando se comparaban con el vehículo.

10 La Figura 18 representa gráficamente el efecto de GW 1929, Qmatrix®, UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y vehículo en niveles de triglicéridos en ayunas de ratones macho C57BL/6J. Las reducciones de los tantos por ciento de un control de vehículo en el nivel de triglicéridos en ayunas se determinaron a las 2, 5, y 7 semanas después del comienzo del tratamiento. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200, y 400 mg/kg) y un control de vehículo. Niveles consistentemente bajos de niveles de triglicéridos en ayunas se encontraron en el grupo de tratamiento con 200 mg/kg de UP780 a la semana 2. Los datos son medias \pm SD, $n=7$. Después de 7 semanas de tratamiento diario, la reducción del tanto por ciento de nivel de triglicéridos en ayunas frente a vehículo eran reducciones del 2 %, 22,1 %, 22 %, 21,7 %, y 22,7 % para 400 mg/kg de Qmatrix®, 200, 400 y 100 mg/kg de UP780 y GW 1929, respectivamente.

20 La Figura 19 ilustra gráficamente el efecto de GW 1929, de Qmatrix®, de UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y de vehículo sobre los niveles de colesterol. Los niveles de colesterol total en ayunas se midieron al inicio (línea de base) y 2, 5, y 7 semanas después del comienzo del tratamiento usando 15-20 μ ml de sangre obtenida a través de la vena de la cola. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y un control de vehículo. No se observaron cambios en el nivel de colesterol total en todos los grupos de tratamiento comparado con el un control de vehículo. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. No se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol en todos los grupos de tratamiento, cuando se comparaban con el vehículo a $P \leq 0,05$.

30 La Figura 20 ilustra el efecto de GW1929, Qmatrix®, UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y vehículo en el peso corporal de ratones macho C57BL/6J. Tres o cuatro ratones macho C57BL/6J eran medidos en una jaula para ratones que tenía secciones para la alimentación y para el agua. Se tomaron medidas del peso corporal una vez a la semana durante el período de inducción y las semanas de tratamiento. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y un control de vehículo. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la ganancia de peso corporal entre los grupos en ninguno de los ratones tratados con GW1929, Qmatrix®, UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y vehículo. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. Como se representa en la Figura 20, los animales en cada tratamiento, incluido vehículo y dieta normal de roedor, continuaron ganando peso a lo largo del período de estudio. La diferencia en ganancia de peso corporal observada entre el grupo I (400 mg/kg de Qmatrix® y 200 mg/kg de UP780) y el grupo II (GW1929, vehículo, y 100 y 400 mg/kg de UP780) no es estadísticamente significativa a $P \leq 0,05$.

40 La Figura 21 ilustra el efecto de GW1929, Qmatrix®, UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y vehículo en el consumo de alimentos de ratones macho C57BL/6J. Tres o cuatro ratones macho C57BL/6J eran medidos en una jaula para ratones que tenía secciones para alimentación y agua. La medida de la ingesta de alimentos se tomó una vez a la semana durante el período de inducción y las semanas de tratamiento. Se muestran los datos de consumo de alimentos en las semanas de tratamiento. A los animales se les trató con GW1929 (5 mg/kg), Qmatrix® (400 mg/kg), UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y un control de vehículo. Ninguna diferencia estadísticamente significativa en la ingesta de alimentos entre los grupos. Los datos son medias \pm SD, $n = 7$. De acuerdo con los datos de peso corporal, en todos los grupos se registró un modelo similar de consumo de alimentos.

45 La Figuras 22A y B representan los resultados de un estudio de toxicidad agua que mide el peso corporal medio de machos (Figura 22A) y hembras (Figura 22B). La proporción de ganancia de peso entre el control y los grupos de tratamiento fue consistente a lo largo del estudio. Los ratones eran tratados con 2 g/kg de UP780 y un control de vehículo durante 14 días. El análisis estadístico de diferencia en la ganancia de peso corporal entre el día de la necropsia y la línea base para animales tratados con UP780 y un control de vehículo mostraban que no había una diferencia significativa en la ganancia de peso tanto en machos como en hembras. De forma similar, no había una diferencia estadísticamente significativa en la ganancia media de peso corporal tanto en machos como en hembras de los animales tratados con UP780 y los animales con un control de vehículo en cada uno de los puntos de toma de datos comparados. Los datos son medias \pm SD, $n = 5$.

50 La Figura 23 ilustra gráficamente desde una perspectiva visual la regulación al alza general de la expresión del gen de LV frente a LC (Figura 23A) y la regulación a la baja de la expresión del gen de LUP frente a LC (Figura 23B). Los gráficos son generados mediante el programa informático SigmaPlot. Se usa un ANOVA sobre los datos de micromatrices normalizados para detectar genes expresados diferencialmente entre grupos de tratamiento (LV frente a LC y LUP frente a LC). Para cada comparación, los genes significativos expresados diferencialmente se obtienen a

partir de los resultados de los modelos del ANOVA y múltiples correcciones de comparación. El número de conjuntos de sondas estadísticamente significativas para la comparación mediante el procedimiento Bonferroni secuencial de Holm se resume en los gráficos, LV frente a LC (Figura 23A) y LUP frente a LC (Figura 23B).

5 La Figura 24 representa la validación de la QPCR de análisis de micromatrices para los niveles de las transcripciones de ACC2. La Figura 24A, cuantificación de los datos de micromatrices. La Figura 24B, cuantificación QPCR, registrada en un gráfico como nivel de expresión normalizada según el nivel de expresión de GAPDH. Las tres muestras de ARN de control improductivo se agruparon como LC para la QPCR; las muestras de ARN de tratamiento con dieta de alto contenido en grasas (LV) y con la dieta de alto contenido en grasas + UP780 (LUP) se usaron individualmente para la QPCR. Las mismas preparaciones de ARN se usaron tanto para micromatrices como para la QPCR. Aunque los valores de intensidad de PM+MM y de PM sólo se usaron independientemente para análisis de los datos de micromatrices (véase el Ejemplo 20), ambos se agruparon para comparación, y, donde estuviera disponible, para comparación de las variaciones de animal frente a animal.

La Figuras 25A y B representan la validación de la QPCR del análisis de micromatrices para los niveles de las transcripciones de FASN, en el mismo formato que el descrito en la Figura 24.

15 La Figuras 26A y B representan la validación de la QPCR del análisis de micromatrices para los niveles de las transcripciones de PEPCCK1, en el mismo formato que el descrito en la Figura 24.

La Figuras 27A y B representan la validación de la QPCR del análisis de micromatrices para los niveles de las transcripciones de FABP5, en el mismo formato que el descrito en la Figura 24.

20 La Figuras 28A y B representan la validación de la QPCR del análisis de micromatrices para los niveles de las transcripciones de AMPK α 2, en el mismo formato que el descrito en la Figura 24.

Detallada descripción de la realización preferida

25 La presente invención describe la identificación y aislamiento de cromonas y nuevas composiciones de cromonas de fuentes de plantas que presentan la regulación al alza de la producción de adiponectina por parte de los adipocitos y la normalización de virtualmente cientos de genes relacionados con las rutas metabólicas y de señalización de la glucosa y de los ácidos grasos. Las composiciones de cromonas son eficaces para mejorar la producción de adiponectina por adipocitos y regular los genes involucrados en la biosíntesis de los ácidos grasos, β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, biosíntesis de esteroides, gluconeogénesis, transporte de las grasas, señalización en el hígado con PPAR α /RXR α y mecanismo de xenobióticos. Las composiciones de cromonas pueden ser usadas para incrementar la sensibilidad a la insulina, mejorar la tolerancia a la glucosa, disminuir los niveles de triglicéridos y equilibrar los niveles de glucosa en mamíferos. En la presente invención se incluyen los métodos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades y estados que incluyen pero que no se limitan a resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, dislipidemia e hipertrigliceridemia.

35 También se incluyen en la presente invención nuevas composiciones comprendidas de una mezcla de una o más cromonas y gel en polvo de *Aloe* o gel en polvo de la hoja entera de *Aloe*. Estas nuevas composiciones son extremadamente eficaces en disminuir los niveles de glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina. Las composiciones se preparan mezclando gel en polvo de *Aloe* o gel en polvo de la hoja entera de *Aloe* con una mezcla sustancialmente pura de una o más cromonas, en donde dicha mezcla de una o más cromonas está esencialmente exenta de antraquinonas (típicamente Aloína A y B). Por "sustancialmente pura" se pretende indicar que la mezcla de cromonas es al menos un 70 % (en peso) pura, preferiblemente al menos 80 % pura y lo más preferiblemente 90 % pura o mayor. Por "esencialmente exenta de antraquinonas" se pretende indicar que la cantidad total de antraquinonas en la mezcla de cromonas es menor que o igual a 100 ppm, más preferiblemente menor o igual que 50 ppm. El gel en polvo o el gel de la hoja entera en polvo de *Aloe* (denominado en la presente memoria colectivamente como "gel de Aloe") puede ser preparado por cualquier método normalizado conocido de preparar estas composiciones. En una realización, el gel de Aloe se prepara a partir de *Aloe barbadensis* o de *Aloe vera*. La proporción de gel de Aloe frente a cromonas totales en estas composiciones puede estar en el intervalo de 0,1-99,9 %.

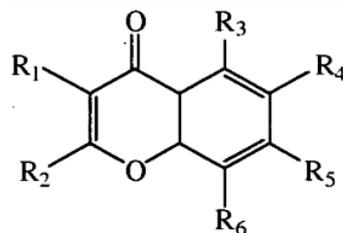
45 En algunas realizaciones, las composiciones están comprendidas de 90 % a 99 % (en peso) de gel de Aloe y 1 a 10 % (en peso) de cromonas totales. En otras realizaciones, las composiciones están comprendidas de 95 a 99 % (en peso) de gel de Aloe y 1-5 % (en peso) de cromonas totales. Todavía en otras realizaciones, las composiciones están comprendidas de 98 a 99 % (en peso) de gel de Aloe y 1-2 % (en peso) de cromonas totales. Las cromonas se aíslan como se describe en detalle más adelante. En algunas realizaciones, una o más cromonas se seleccionan del grupo constituido por aloesina, aloesinol, aloeresina A, aloeresina C, aloeresina D, aloeresina E, aloeresina F y derivados de aloesina. Las cromonas de la presente invención pueden ser semi-sintetizadas cambiando químicamente las estructuras de las cromonas que aparecen en la naturaleza o pueden ser completamente sintetizadas a partir de pequeños materiales de partida aromáticos.

55 Varios términos se usan en la presente memoria para referirse a los aspectos de la presente invención. Para ayudar en la clarificación de la descripción de los componentes de esta invención se proporcionan las siguientes definiciones.

A menos que se definan de otra manera todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado normalmente comprendido por el experto corriente en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Debe observarse que, tal como se usan en la presente memoria, los términos "un" o "una" entidad se refieren a una o más de esas entidades; por ejemplo, una cromona se refiere a una o más cromonas. Como tal, los términos "un" o "una", "una o más" y "al menos una" se usan en la presente memoria de forma intercambiable.

"Cromonas" son una clase específica de productos naturales que tienen una benzopiran-4-ona como principal esqueleto estructural como se ilustra mediante la siguiente estructura general:



- 10 en donde

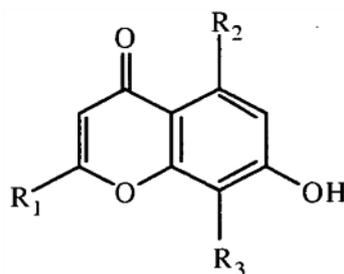
R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, un éster seleccionado del grupo que incluye pero que no se limita a galato, acetato, ésteres de cinnamoilo y de hidroxil-cinnamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; y una hexosa o pentosa, en donde dicha hexosa o pentosa está unida a la cromona mediante un carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno, y en donde dicha hexosa o pentosa se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a aldopentosas, metil-aldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa y los derivados químicos de los mismos, incluidos un dímero, un trímero y otras cromonas polimerizadas;

- 15 en donde dicho grupo alquilo y/o alquenilo es una cadena lineal o ramificada que tiene entre 1-20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces y un grupo o grupos de sustitución seleccionados del grupo constituido por -OH, =O y -OR en diferentes posiciones;

X se selecciona del grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluyen pero no se limitan a hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato; y

R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y un soporte farmacéuticamente aceptable.

- 25 En una realización, la cromona o cromonas es una benzopiran-4-ona (7-hidroxi-cromona) seleccionada del grupo de compuestos que tienen la siguiente estructura general:



en donde R₁, R₂, y R₃ son como se han definido anteriormente. En otra realización de esta invención la cromona se selecciona de aloesina o aloesinol.

- 30 Las cromonas de esta invención pueden ser obtenidas por métodos sintéticos o pueden ser aisladas de los géneros de numerosas familias de plantas, que incluyen pero que no se limitan a *Acacia*, *Adina*, *Aloe*, *Alternaria*, *Amoora*, *Antidesma*, *Artemisia*, *Baeckia*, *Cassia*, *Clusea*, *Cnidium*, *Convolvulus*, *Epimedium*, *Eriosema*, *Eriostemon*, *Eugenia*, *Garcinia*, *Hypericum*, *Lindenbergia*, *Pancreatium*, *Penicillium*, *Polygonum*, *Ptaeroxylon*, *Rheum*, *Sophora*, *Stephanitis*, *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*. En realizaciones preferidas, la planta se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a *Acacia catechu*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremnophila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera variedad chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baeckia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygonum cuspidatum*, *Sophora*

tomentosa y *Stephanitis rhododendri*. En una realización, las cromonas son aisladas de las hojas enteras de *Aloe ferox*, *Aloe vera*, o *Aloe barbadensis*.

5 Las cromonas pueden encontrarse en varias partes de la planta, que incluyen pero que no se limitan a los tallos, cortezas de tallos, troncos, cortezas de troncos, ramillas, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes tiernos, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas.

El término "**Aloe**" se refiere al género de plantas sudafricanas de la familia de las liliáceas de las cuales la *Aloe vera*/*Aloe barbadensis* (obsérvese que *Aloe barbadensis* es el nombre en latín de la especie *Aloe vera*) o *Aloe ferox* son especies. Las cromonas de Aloe están presentes principalmente en las cortezas de la hoja de numerosas especies diferentes de Aloe.

10 El término "**extracto de Aloe**" es definido como el jugo desecado de la hoja entera de varias especies de la planta de Aloe. El "**extracto de Aloe**" usado en los ejemplos de esta invención incluye pero no se limita a gel de Aloe reciente y concentrado, gel de hoja entera, exudados de extractos de hoja, que se preparó mediante "procesado de hoja entera" de la hoja entera de varias especies de Aloe. En un ejemplo, las hojas enteras obtenidas a través de la planta de *Aloe barbadensis* se trituraron, se filtraron, se trataron con celulasa (opcional) y carbón activado y se
15 liofilizaron. El liofilizado en polvo se reconstituyó con el disolvente de cromatografía antes de usar. En otro ejemplo, el exudado de las hojas de *Aloe ferox* se suspendió en agua, después se dejó en contacto con un disolvente de cromatografía apropiado antes de usar.

"**Terapéutico**" como se usa aquí, incluye el tratamiento y/o profilaxis. Cuando se utiliza, terapéutico se refiere a humanos así como a otros mamíferos.

20 "**Dosis o cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz**" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser un alivio de las señales, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración de un sistema biológico que se desee. La dosis precisa variará según diversos factores que incluyen pero que no se limitan a la edad y tamaño del sujeto, la enfermedad y el tratamiento que se realizará.

25 Un "**anfitrión**" o "**paciente**" o "**sujeto**" es un mamífero vivo, humano o animal, para quien se desea la terapia. El "anfitrión" "paciente" o "sujeto" se refiere, en general, al receptor de la terapia que se practicará según el método de la invención. Debe observarse que la invención descrita en la presente memoria puede ser usada en aplicaciones en veterinarias así como humanas y que el término "anfitrión" no debe entenderse en una forma limitante. En el caso de aplicaciones veterinarias, los intervalos de dosis pueden ser determinados como se describe más adelante, teniendo
30 en cuenta el peso corporal del animal.

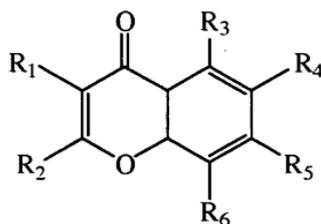
Como se usa en la presente memoria un "**soporte farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un vehículo que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el anfitrión al que es administrado. Ejemplos de "soportes farmacéuticamente aceptables" incluyen pero no se limitan a cualquiera de los soportes farmacéuticos patrón tal como una solución salina, es decir, la solución de Ringer, una solución salina
35 tampón, agua, una solución de dextrosa, seroalbúmina, y otros excipientes y preservantes para formulaciones en comprimidos y cápsulas.

Obsérvese que a lo largo de esta aplicación se proporcionan varias citas. Cada cita se incorpora específicamente en la presente memoria en su totalidad como referencia.

40 La presente invención incluye métodos para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico y enfermedades y estados mediados por resistencia a la insulina en mamíferos. El método está comprendido por administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición farmacéutica o nutracéutica que comprenda una o más cromonas. La cromona o mezcla de cromonas pueden aislarse de una sola fuente o de múltiples fuentes que incluyen pero que no se limitan a la obtenida sintéticamente, a la que esté presente en la naturaleza o a cualquier combinación de las mismas.

45 En una realización, la presente invención describe un método para aumentar la producción de adiponectina a partir de adipocitos que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una cromona o una mezcla de cromonas; en donde dicha cromona o mezcla de cromonas. En otra realización, la presente invención describe un método para normalizar cambios inducidos por la dieta de alto contenido en grasas en las expresiones de genes de la biosíntesis de los ácidos grasos, de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, biosíntesis de
50 esteroides, gluconeogénesis, transporte de las grasas, señalización en el hígado con PPAR α /RXR α , y mecanismo de xenobióticos comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende una cromona o mezcla de cromonas. Todavía en otra realización, la presente invención incluye un método para prevenir y tratar la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico, dislipidemia e hipertrigliceridemia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo
55 necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende una cromona o una mezcla de cromonas.

Las cromonas que pueden ser usadas de acuerdo con lo siguiente incluyen compuestos ilustrados por la siguiente estructura general:



en donde

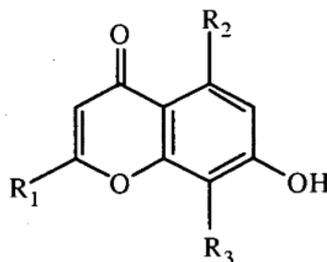
5 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenoilo, oxoalquilo, oxoalquenoilo, hidroxialquilo, hidroxialquenoilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, un éster seleccionado del grupo que incluye pero que no se limita a galato, acetato, ésteres de cinnamoilo y de hidroxil-cinnamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; y una hexosa o pentosa, en donde dicha hexosa o pentosa está unida a la cromona mediante un carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno y en donde dicha hexosa o pentosa se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a aldopentosas, metil-aldopentosa, aldohexosas, cetohexosa y los derivados químicos de los mismos, incluidos un dímero, un trímero y otras cromonas polimerizadas;

10 en donde dicho grupo alquilo y/o alquenoilo es una cadena lineal o ramificada que tiene entre 1-20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces y un grupo o grupos de sustitución seleccionados del grupo constituido por -OH, =O y -OR en diferentes posiciones;

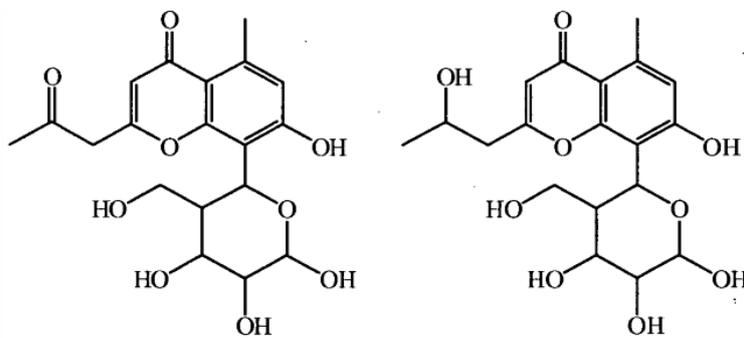
15 X se selecciona del grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluye pero que no se limita a hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato; y

R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una realización la cromona(s) es una benzopiran-4-ona (7-hidroxi-cromona) seleccionada del grupo de compuestos que tienen la siguiente estructura general:



20 en donde R₁, R₂, y R₃ son como se han definido anteriormente. En otra realización de esta invención la cromona se selecciona de aloesina y/o aloesinol cuyas estructuras se representan a continuación.



Aloesina

Aloesinol

25 Las cromonas de esta invención pueden ser obtenidas por métodos sintéticos o pueden ser aisladas de los géneros de numerosas familias de plantas, que incluyen pero que no se limitan a *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*,

5 *Syzygium*, *Talaromyces* y *Zonaria*. En realizaciones preferidas, la planta se selecciona del grupo que incluye pero que no se limita a *Acacia catechar*, *Acacia concinna*, *Aloe arborescens*, *Aloe barbadensis*, *Aloe cremnofila*, *Aloe ferox*, *Aloe saponaria*, *Aloe vera*, *Aloe vera variedad chinensis*, *Antidesma membranaceum*, *Artemisia capillaries*, *Baeckia frutescens*, *Epimedium sagittatum*, *Garcinia dulcis*, *Hypericum japonicum*, *Polygortum cuspidatum*, *Sophora tomentosa* y *Stephanitis rhododendri*. En una realización, las cromonas son aisladas de las hojas enteras de *Aloe ferox*, *Aloe vera* o *Aloe barbadensis*.

Las cromonas pueden encontrarse en varias partes de la planta que incluyen pero que no se limitan a los tallos, cortezas de tallos, troncos, cortezas de troncos, ramillas, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes tiernos, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas.

10 Los compuestos y composiciones de cromona de la presente invención, así como su actividad bioquímica y biológica eran identificados a partir de un cribado aleatorio de 2059 extractos de plantas como se describe a continuación. El cribado primario se diseñó en base a la capacidad de los extractos de plantas o los compuestos para realzar la producción de adiponectina a partir de adipocitos cultivados. Los adipocitos eran diferenciados a partir de fibroblastos de ratón (3T3 L1). Se creía que la medida de una proteína marcadora clave de adipocina - nivel de adiponectina en el medio de cultivo de adipocitos permitiría la identificación de compuestos que aparecen en la naturaleza que actuarían como reguladores para cribar PPAR, o modularía otras rutas metabólicas clave de glucosa y ácidos grasos para uso en la prevención y tratamiento de trastornos metabólicos que incluyen pero que no se limitan a resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndromes metabólicos, dislipidemia e hipertrigliceridemia de mamíferos particularmente los humanos.

20 Para crear una biblioteca de extractos de plantas, los materiales de plantas desecados eran triturados hasta polvos finos y extraídos en el seno de metanol:diclorometano (1:1) usando un extractor automático ASE 300 como se describe en el Ejemplo 1. Los extractos eran desecados por evaporación rotatoria y al vacío con alta velocidad. Cada extracto de planta (aproximadamente 75 mg) se disolvió en 1,5 ml de DMSO (1,5 ml) para elaborar una solución con una concentración de 50 mg/ml.

25 Se ha demostrado que las células 3T3-L1 producen y secretan adiponectina en el medio en respuesta a los activadores PPAR γ . Sin embargo, sólo se lograba un aumento de dos veces en la secreción de adiponectina en respuesta al tratamiento de activadores PPAR γ en la bibliografía. Cuando este experimento se repetía, la mejor relación señal-ruido de fondo del ensayo era de 1,6 con indometacina a concentraciones entre 0,1-300 μ M bajo las condiciones experimentales publicadas (Figura 1 A). Los autores de la invención mejoraron drásticamente la relación señal-ruido cambiando las condiciones de inducción y cultivo como se muestra en los Ejemplos 2 y 3. Las células 3T3-L1 eran inducidas para diferenciarse durante 2 días y después se trataron con indometacina durante 2 días. El más elevado incremento medio en veces de adiponectina era de 52 veces con 100 μ M de indometacina (Figura 1B). Este sistema de ensayo se usaba para cribar los 2059 extractos orgánicos.

35 El cribado inicial produjo 139 resultados positivos usando un valor de umbral límite de inducción de adiponectina que eran equivalentes a los conferidos por una indometacina como compuesto de referencia a 10 μ M. Como resultado de los posteriores ensayos de verificación y de cribado secundarios, un extracto activo de exudados de hoja de *Aloe ferox*, designado como P0017, mostró una consistente modulación al alza del nivel de adiponectina en el medio (Figura 2).

40 Este extracto de planta activo (P0017-OE) fue sometido posteriormente a un fraccionamiento con HTP guiado por la actividad y purificación del compuesto. Como se muestra en el Ejemplo 5, un extracto orgánico de P0017 fue fraccionado usando una columna instantánea de fase normal. Las fracciones con absorción en el UV y tiempos de retención similares eran combinadas en sub-fracciones y desecadas a bajo vacío y centrifugación y se nombraron P0017-OE-HTPF1-8 (Figura 3). Se usó DMSO para disolver cada sub-fracción (50 μ g/ μ l) y una parte (2 μ l) se usó en el ensayo de adiponectina. La P0017-OE-HTPF3 mostraba la mayor actividad entre las 8 sub-fracciones en el bioensayo. La repetida extracción a gran escala y el aislamiento de fracciones activas y los compuestos se ilustran en el Ejemplo 7 y en la Figura 4. Las fracciones bioactivas eran identificadas como P0017-AC1 y P0017-AC2.

45 La de-duplicación de las sub-fracciones activas se llevó a cabo usando LC-MS/PDA. Los picos únicos del compuesto eran identificados correspondiendo a la más elevada actividad de mejora de la adiponectina. Los compuestos más activos aloesinol (PM = 396) y aloesina (PM = 394) en P0017-OE-HTPF3 y P0017AC1/2 eran identificados como se describe en el Ejemplo 8 como compuestos de tipo cromona codificados como UP394 para aloesina (Figura 5) y UP396 para aloesinol (Figura 6), respectivamente. Específicamente, aloesina y aloesinol eran aislados e identificados como compuestos de cromona activos que mejoraban la secreción de adiponectina por parte de los adipocitos. Los UP394 y UP396 purificados eran ensayados como se describe en el Ejemplo 10 y los dos compuestos de cromona eran activos en incrementar la producción de adiponectina a partir de los adipocitos en el ensayo *in vitro* como se muestra en la Figura 7.

55 El Ejemplo 9 describe un método para purificar cromonas a partir de exudados de aloe en bruto para retirar contaminantes antraquinonas (específicamente, aloína A y B) por separación cromatográfica preparativa en columna y recristalización. Las antraquinonas son indeseables porque causan efectos secundarios adversos significativos tal como la inducción de diarrea y genotoxicidad, y por tanto impiden el uso directo de extractos de cromona en bruto.

La pureza de las cromonas aisladas después de la purificación mediante este método es tan alta como 70 %, preferiblemente 80 % y lo más preferiblemente 90 % o mayor en peso, que está "esencialmente exenta de antraquinonas" cuantificado mediante HPLC. Por esencialmente exenta de antraquinonas se pretende indicar que la cantidad total de antraquinonas en las composiciones purificadas es menor que 100 ppm, preferiblemente menor que 50 ppm (de aloína A y B). En el exudado en bruto de *Aloe ferox*, la cantidad de aloesina (UP394) es aproximadamente del 25 % en peso y la cantidad de antraquinonas es aproximadamente del 22 % (Zahn, (2007) Phytochem. Anal. (10);1002-1024). Por ello, *Aloe ferox* es una fuente vegetal excelente y preferida para el aislamiento de composiciones de cromona La aloesina aislada y purificada (UP39) (Lote A-2705 y Lote I1506AW) aislada de exudados de hoja de *Aloe ferox*, como se describe en el Ejemplo 9, tenía una pureza de 93 % y de 100,6 %, respectivamente con antraquinona total menor que 50 ppm. La aloesina exenta de antraquinonas (<50 ppm de antraquinonas totales) (UP394) se utilizó para producir las composiciones N931 y UP780 enriquecidas en cromona como se ilustra en el Ejemplo 11 y 18.

La cantidad de cromonas, en otra especie de Aloe, tal como *Aloe barbadensis* (que es una fuente preferida del gel de Aloe), sin embargo, se ha informado muy inferior (0,32 mg/g; 0,032 % con cromonas totales a 0,10 %) y antraquinonas (Aloína A y B) casi cuatro veces mayor (1,14 mg/g o 0,114 %) (Park (1998) Phytochem. Anal. 9:186-191). Además, las cromonas se almacenan sólo en las cortezas o en la capa externa de las hojas de las plantas de aloe. En el proceso estándar para obtener productos gel de aloe, a partir de plantas de Aloe tal como las cortezas de las hojas de aloe de *Aloe vera/Aloe barbadensis* se retiran típicamente y sólo el gel transparente se filtra y se concentra. Incluso en la producción del gel en polvo de la hoja entera de aloe, en la que las hojas enteras de las plantas de aloe se trituran y el gel se recoge y se filtra, un proceso de descolonización que usa carbón activo y otras etapas del proceso retiran esencialmente todas las cromonas así como las antraquinonas. Por tanto, no se encuentran cantidades significativas de cromonas o antraquinonas en productos estándar de gel de aloe verificado mediante HPLC (Dell'Agli (2007) J. Agric. Food Che. 55(9):3363-3367; Zonta (1995) Journal of Chromatography A 718(1): 99-106).

Los autores de la invención concluyeron que enriquecer las cromonas en un extracto de la planta estandarizado proporcionaría composiciones con una actividad mejorada y más consistente para mejorar la sensibilidad a la insulina, mejorar la tolerancia a la glucosa y disminuir los niveles de triglicéridos. Para ensayar la hipótesis, se produjo una única composición de la cromona del asunto como se demuestra en el Ejemplo 11 combinando una cromona aloesina (UP394) aislada de los exudados de hoja de *Aloe ferox* con un gel en polvo de la hoja entera preparado a partir de *Aloe vera*. La composición de cromona estandarizada de estas dos especies de Aloe contenían no menos que 1,4 % de cromonas - es decir, aloesina (UP394) sin contaminación de antraquinonas (<50 ppm de Aloína A y B). La aloesina (UP394) se extrajo de los exudados de la hoja de *Aloe ferox*, aislados mediante cromatografía preparativa en columna y después se purificó adicionalmente mediante recristalización como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.451.357 con el título "Method of Purification of Aloesin," que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Esta composición única de cromona estandarizada se codificó como N931 y se ensayó su efecto sobre los niveles de glucosa en sangre, sobre la resistencia a la insulina y sobre el metabolismo de las grasas en un modelo diferente de resistencia a la insulina, el modelo de ratón db/db.

Ya que se ha informado que la adiponectina mejora la resistencia a la insulina, lo que se considera una causa raíz del síndrome metabólico, se concluye que la reducción de la resistencia a la insulina por las cromonas UP394 y UP396 debería llevar a la mejora de varios trastornos metabólicos. Para probar esta teoría, deficientes sensibilidad a la insulina, tolerancia a la glucosa y trastornos metabólicos se indujeron en ratones C57BL/6J alimentando a los animales con una dieta de alto contenido en grasas durante 8 semanas como se ilustra en el Ejemplo 12 (Surwit et al. (1988) Diabetes 37:1163-1167; Laakso et al. (2004). Diabetes Care 27:2253-2259; Kahn et al. (2004) Diabetes 53:3274-3285; Scheurink et al. (1998) European J. Endo. 139:461-467). Los ratones se trataron después (con inyección u oralmente) con cromonas UP394, UP396 y un compuesto de referencia GW1929 (N-(2-benzoilfenil)-O-[2-(metil-2-piridinilamino)etil]-L-tirosina) durante cuatro semanas.

El efecto terapéutico de las cromonas descritas sobre la resistencia a la insulina en ratones con dieta de alto contenido en grasas se demostró usando dos ensayos: un ensayo de tolerancia a la glucosa (Ejemplo 13) y un ensayo de tolerancia a la insulina (Ejemplo 14). Un ensayo intraperitoneal de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo el día 18 del tratamiento con las cromonas descritas aloesina (UP394) y aloesinol (UP396). A los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de la administración de la glucosa (2 g/kg). Los niveles de glucosa en sangre se midieron a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de la glucosa. Como se muestra en el Ejemplo 13 y en la Figura 8A, los animales tratados con UP396 mostraban una mejora significativa de eliminación de glucosa de la circulación comparada con los animales tratados con vehículo. Los animales tratados con UP394, mostraban una clara tendencia de mejora comparada con los animales tratados con vehículo (Figura 8A).

El ensayo intraperitoneal de tolerancia a la insulina se realizó el día 24 del tratamiento como se muestra en el Ejemplo 14. A los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de la inyección de insulina. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de insulina (0,5 unidades/kg). Como se muestra en la Figura 8B y en el Ejemplo 14, una significativa eliminación de la glucosa se observó en animales tratados tanto con UP394 como con UP396 comparado con animales tratados con vehículo, $p < 0,05$ (Figura 8B).

La actividad de sensibilización a la insulina de las cromonas descritas se demostró adicionalmente por la capacidad de los compuestos para disminuir los niveles de insulina en plasma en los animales tratados. Los niveles de insulina en plasma en los ratones se determinaron usando un kit de ELISA (Figura 9). El compuesto de referencia GW1929, un agonista selectivo de PPAR γ , disminuían significativamente el nivel de insulina como se esperaba. De forma similar, UP394 y UP396 también disminuía significativamente los niveles de insulina comparado con ratones tratados con vehículo (Figura 9), lo que indica que los compuestos de cromona descritos incrementaban la sensibilidad a la insulina en ratones con trastorno metabólico inducido por dieta de alto contenido en grasas.

Ratones homocigóticos para la mutación espontánea de la diabetes (*Lepr^{db}*) se volvieron obesos de forma identificable a aproximadamente las 3 a 4 semanas de edad. Las subidas de insulina en plasma comenzaron a los 10 a 14 días y de azúcar en sangre a las 4 a 8 semanas. Los ratones mutantes homocigóticos son polifágicos, polidípicos y poliúricos. El curso de la enfermedad se ve marcadamente influenciado por los antecedentes genéticos. En los ratones db/db se observan numerosas características, incluida una elevación descontrolada de azúcar en sangre, una seria disminución de las células beta de los islotes pancreáticos que producen insulina, y la muerte a los 10 meses de edad. Los ratones macho db/db (8 en cada grupo) eran tratados (con inyección u oralmente) con GW 1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo durante 10 semanas y se midieron los niveles de glucosa en ayunas de los ratones semanalmente como se muestra en el Ejemplo 15. Como resultado, el N931 fue muy eficaz al disminuir el nivel de glucosa en sangre en los ratones db/db. Como se muestra en la Figura 10, el nivel de glucosa en ratones tratados con vehículo se incrementó a lo largo del tiempo durante el tratamiento de 10 semanas. GW1929, el compuesto de referencia era capaz de mantener la glucosa en el nivel de la línea base como se esperaba. Similar a GW 1929, el N931 redujo los niveles de glucosa sustancialmente, empezando desde la semana 5 del tratamiento. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas eran significativamente menores en el grupo tratado con N931 a las semanas 6, 7, 9 y 10, si se compara con el grupo tratado con vehículo, $P < 0,05$. Después de 10 semanas de tratamiento, el nivel de glucosa en los animales tratados con N931 era del 54 % del de los animales tratados con vehículo.

El efecto de N931 sobre la resistencia a la insulina se demostró en una prueba oral de tolerancia a la glucosa como se describe en el Ejemplo 16. Los ratones db/db (8 ratones en cada grupo) eran tratados con GW 1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo durante 10 semanas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de la carga de glucosa. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa. La significativa eliminación de glucosa de la circulación se observó a los tiempos de 0 y 120 minutos en el grupo tratado con GW 1929 o N-931 si se compara con el grupo del vehículo, $P < 0,05$ (Figura 11A). Los resultados indican que N931 tiene la capacidad de incrementar la tolerancia a la glucosa, por tanto mejora la sensibilidad a la insulina de los ratones db/db.

El efecto de N931 sobre la resistencia a la insulina se demostró adicionalmente en una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina. Los ratones db/db (8 en cada grupo) eran tratados con GW 1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo durante 6 semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección de insulina. De nuevo, la sensibilidad mejorada a la insulina era evidente en los ratones tratados con GW 1929 y N931. La eliminación significativa de glucosa se observó a 0, 30 y 60 minutos tanto para GW 1929 como para N931 cuando se comparaban con el vehículo, $P < 0,05$ (Figura 11B).

Además, el N931 redujo los niveles de triglicéridos significativamente comparado con el grupo del vehículo ($P < 0,05$) después del tratamiento durante 10 semanas. Los niveles de triglicéridos en ayunas en ratones machos db/db tratados con GW1929, N931 y vehículo se midieron semanalmente como se muestra en el Ejemplo 17. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaba en ayunas. Después de 10 semanas de tratamiento, se observó una reducción del 34 % de los triglicéridos en animales tratados con N931 ($P < 0,05$), y se observó una reducción del 43 % en el grupo del compuesto de referencia ($P < 0,05$) (Figura 12).

Para demostrar la superior e inesperada eficacia terapéutica de una composición enriquecida en cromonas, una segunda composición única del asunto que se producía combinando la cromona aloesina (UP394) aislada de los exudados de la hoja de *Aloe ferox* con un gel en polvo de la hoja (Qmatrix codificado como QM400) elaborado a partir de *Aloe vera*. Esta composición de cromona estandarizada (UP780) de estas dos especies de *Aloe* contenían no menos de un 2 % de cromonas, es decir, aloesina (UP394) y no más de 50 ppm de antraquinonas totales mediante cuantificación por HPLC. La cromona aloesina (UP394) se extrajo de los exudados de la hoja de *Aloe ferox*, se aisló mediante cromatografía preparativa en columna y después se purificó adicionalmente mediante recristalización como se describe en el Ejemplo 9 y además como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.451.357, con el título "Method of Purification of Aloesin", que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Esta nueva composición de cromona estandarizada se codificó como UP780 y se administró oralmente en un estudio de determinación del intervalo de la dosis en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta de alto contenido en grasas. En este estudio, la actividad de sensibilización a la insulina de UP780 se comparó con un fármaco farmacéutico - GW1929 y también con los polvos originales de gel de *Aloe vera* (Qmatrix QM400), que no contiene cantidades significativas de cromonas cuantificadas mediante HPLC en el Ejemplo 9.

Después de tres semanas del tratamiento oral diario del Ejemplo 19, se encontró una eliminación estadísticamente significativa de la glucosa a los tiempos de 30, 60 y 90 minutos después de la carga intraperitoneal de glucosa en animales tratados con 200 mg/kg de UP780 (Figura 13D) y GW1929 (Figura 13B). De forma similar, los animales

5 tratados con 400 mg/kg de UP780 mostraban una significativa utilización de la glucosa a un tiempo de 30 minutos, $P \leq 0,05$ (*) (Figura 13E). Del mismo modo, después de 9 semanas del tratamiento oral, los animales tratados con 400 mg/kg de UP780 mostraban diferencias estadísticamente significativas en la utilización de la glucosa a los tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos después del PI de la administración de glucosa, $P \leq 0,05$ (*) (Figura 14E), cuando se comparaban con un control de vehículo. Los animales tratados con 100 mg/kg de UP780 mostraban una diferencia significativa a T30 (Figura 14C). El control positivo, GW1929, tiene valores de P menores que 0,05 en cada momento temporal analizado. Mientras, los polvos originales de gel de *Aloe vera* (Qmatrix QM400), que no contienen cantidades significativas de cromonas, no mostraban ninguna eficacia después de tres semanas de consumo oral (Figura 13A). Este experimento mostró claramente una inesperada y superior eficacia de sensibilización a la insulina de una composición enriquecida en cromonas comparada con la composición sin cromonas.

10 Además, el efecto de sensibilización a la insulina de UP780 se verificó en una prueba de tolerancia a la insulina después de 10 semanas de tratamiento oral diario (Figura 15A-15E). Coincidiendo con los datos de tolerancia a la glucosa, se observó una sensibilización a la insulina estadísticamente significativa en los animales tratados con 400 mg/kg de UP780 en todos los puntos temporales considerados, $P \leq 0,05$ (*) (Figura 15D). En comparación, los polvos de gel *Aloe vera* (Qmatrix QM400) sin cromonas mostró sólo una mejora moderada y significativa sólo en un único momento (Figura 15A) después de diez semanas de consumo oral.

15 El gel en polvo de *Aloe vera* enriquecido con Aloesina también mantenía niveles consistentemente bajos de los niveles de glucosa en sangre en ayunas. Los niveles de glucosa en ayunas se controlaron separadamente a las 2, 5 y 7 semanas de tratamiento. Como se ve en la Figura 16, los animales tratados con 200 mg/kg de UP780 y GW 1929 mostraban unos niveles inferiores de glucosa en ayunas estadísticamente significativos en ambas semanas (semanas 5 y 7) cuando se comparaban con el vehículo no tratado. Los ratones tratados con Qmatrix® y UP780 a 400 mg/kg presentaban niveles inferiores similares de los niveles de glucosa en sangre en ayunas en la semana 5. Por otra parte, los grupos tratados con 100 mg/kg de UP780 mantenían niveles relativamente altos de glucosa en sangre en ayunas frente a vehículo no tratado en todas las semanas controladas, $P \leq 0,05$ (*). El análisis de datos similares mostró que la reducción del tanto por ciento de los niveles de glucosa en ayunas en animales tratados con 200 mg/kg de UP780, se encontró que eran 18 %, 20 % y 17 % durante las semanas 2, 5 y 7, respectivamente cuando se comparaban con el vehículo (Figura 17).

20 En este estudio de investigación del intervalo de la dosis del Ejemplo 19, se observaron los consiguientes bajos niveles de los niveles de triglicéridos en ayunas para los animales tratados con UP780 y GW 1929. Después de 7 semanas de tratamiento oral diario, la reducción del tanto por ciento de los niveles de triglicéridos en ayunas frente a vehículo eran 22,1 %, 22 %, 21,7 % y 22,7 % para 200, 400 y 100 mg/kg de UP780 y GW1929, respectivamente (Figura 18). Sin embargo, el gel en polvo de *Aloe vera* (Qmatrix QM400), que no contienen cantidades significativas de cromonas, mostró sólo un 2 % de mejora del nivel de triglicéridos después de 2 semanas de tratamiento, además este efecto desapareció en las dos medidas posteriores. La inesperada y superior eficacia en disminuir los niveles de triglicéridos mediante un extracto de planta enriquecida con cromona se demostró claramente mediante este experimento.

25 Como se muestra en la Figura 19, no se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol en todos los grupos de tratamiento, cuando se comparaban con el vehículo, $P \leq 0,05$. Además, en todos los momentos observados, no había diferencias significativas en la ganancia de peso corporal o en el consumo de alimentación entre los grupos en todos los ratones tratados con GW1929, Qmatrix®, UP780 (100, 200 y 400 mg/kg) y vehículo. Aunque los animales en cada tratamiento incluyendo vehículo y dieta normal de roedor continuaron ganando peso a lo largo del período de estudio, las diferencias en ganancia de peso corporal observada entre grupos de tratamiento eran estadísticamente significativas a $P \leq 0,05$ (Figura 20). De acuerdo con los datos de peso corporal, se registraron en todos los grupos modelos similares de consumo de alimentación (Figura 21).

30 Los estudios genómicos, por definición, son estudios de la escala completa del genoma, usando frecuentemente microprocesadores de micromatrices de ADN que contienen conjuntos de sondas que cubren todos los genes expresados. Para un sistema mamífero, se cree que 25.000 genes son funcionales y están expresados. Después de que un microprocesador de una micromatriz se hibrida a un ARNc/ADNc preparado a partir de ARNm, las señales detectadas del microprocesador de una micromatriz debería reflejar el espectro de la expresión del gen de la fuente de tejido/célula del ARNm. Los genes con variación de la expresión, típicamente en miles, son analizados mediante la base de datos del genoma para sus participaciones en rutas biológicas.

35 Los autores de la invención han llevado a cabo estudios de micromatrices para el UP780 descrito en el Ejemplo 20. Los microprocesadores de micromatrices usados eran 430 2.0 del genoma de ratón de Affymetrix, que contienen 45.000 conjuntos de sondas. Los datos de micromatrices de las variaciones en la expresión de los genes eran analizados mediante un robusto método estadístico de ANOVA para la validez de las variaciones en la expresión de genes. Los genes clave con variaciones de expresión eran además validados por transcripción inversa cuantitativa de PCR (QPCR) como se describe en el Ejemplo 21. Los efectos de tratamiento, detectados por las variaciones en la expresión de genes que afectan a las rutas metabólicas y de señalización eran analizados por el programa informático y la base de datos del Ingenuity Pathway Analysis (IPA5).

Con altos niveles de glucosa en sangre, las células β pancreáticas secretan insulina que causa que los transportadores de glucosa al hígado y a los músculos se desplazan a la membrana plasmática para la ingesta de glucosa y el almacenamiento de glucosa como glucógeno. La insulina también incrementa la síntesis de los ácidos grasos y de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo y el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo. La resistencia a la insulina surge de la cascada de señalización del receptor de insulina equivocado, causando una disminución en el desplazamiento de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática, la disminución del almacenamiento de grasa, y el aumento de la glucosa en sangre y de los ácidos grasos libres. El alto contenido de ácidos grasos libres en sangre desactiva el sustrato del receptor de insulina (IRS), y es un factor que induce la resistencia a la insulina.

Un modelo de ratón pre-diabético C57BL6 usado para el estudio de la eficacia del UP780 era la fuente de los tejidos de ratón para la micromatriz. Los tejidos de ratón se extrajeron del control improductivo, de la dieta de alto contenido en grasas (también llamada vehículo), y del tratamiento con dieta de alto contenido en grasas mas UP780 de 200 mg/Kg para la extracción de ARN, cada uno por triplicado. Los tejidos importantes para la absorción de energía, metabolismo, resistencia a la insulina, obesidad y diabetes son los de hígado, los de los músculos y los de grasas. Se completaba un conjunto de datos de micromatrices del hígado. En general, la dieta de alto contenido en grasas (LV) incrementaba la expresión de los genes comparado con el control improductivo (LC), pero muchos de los niveles de expresión de los genes eran disminuidos mediante la dieta de alto contenido en grasas + UP780 (LUP, Figura 23).

El descubrimiento más significativo del estudio de la micromatriz y de la QPCR era la reducción en la biosíntesis de los ácidos grasos por el UP780 ilustrado en los Ejemplos 20 y 21. Las transcripciones de la enzima que limita la proporción, la acetil-CoA carboxinasa (ACC2), y la sintasa de los ácidos grasos (FASN) eran disminuidas por 3 veces y 3,5 veces de UP780, respectivamente, comparado con la dieta de alto contenido en grasas (Tabla 1 y en las Figuras 24 y 25). Con una dieta de alto contenido en grasas, el exceso de energía de la glucosa es transformada en grasas, con la inevitable consecuencia del incremento de ácidos grasos libres en plasma que causa resistencia a la insulina en los músculos. Una consecuencia directa del UP780 en la biosíntesis disminuida de los ácidos grasos debería ser una mejora en la sensibilidad a la insulina y en la tolerancia a la glucosa, como se observa en los modelos de animales.

Además, los ratones deficientes en esteroil-CoA desaturasa (SCD1), la enzima comprometida en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, mantienen la improducción con una dieta de alto contenido en grasas. La UP780 disminuía las transcripciones de SCD1 4,44 veces comparada con la dieta de alto contenido en grasas.

El análisis de micromatrices también mostraban que UP780 disminuía los niveles de transcripción de las enzimas involucradas en la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos comparado tanto con el control improductivo como con la dieta de alto contenido en grasas (Tabla 1). Una β -oxidación disminuida normalizaría el nivel total de oxidación mitocondrial bajo la alta absorción de energía, con una posible consecuencia de generación normalizada de radicales de oxígeno libre mitocondrial.

Se sabe que un alto nivel de esteroides para retroalimentar y disminuir la biosíntesis de esteroides, tal como se observó en los dos tratamientos de dieta de alto contenido en grasas y de UP780, especialmente para la enzima HMG-CoA reductasa que limita la proporción (Tabla 1). El UP780 aumentó el CYP7A1 comparado con la dieta de alto contenido en grasas, con una posible consecuencia beneficiosa de una incrementada biosíntesis de ácidos biliares.

Las variaciones globales de la expresión de genes en la ruta glicólisis/gluconeogénesis indicaba un pequeño cambio global porque la mayor parte de las enzimas son bi-direccionales. La enzima que limita la proporción de la gluconeogénesis del hígado es fosfoenolpiruvato-carboxinasa (PEPCK) dentro de una ruta en el metabolismo de piruvato (Tabla 1). La micromatriz y la QPCR mostraban una tendencia de transcripción de PEPCK incrementada por UP780, comparado con el control improductivo, pero era equivalente a la dieta de alto contenido en grasas (Figura 26). Esto podía incrementar la glucosa en sangre, que era evitada en el tratamiento anti-obesidad y anti-diabético. Sin embargo, si el músculo muestra una absorción de glucosa y uso de UP780 intensificados, el efecto neto podía estar en el equilibrio global como se muestra en los estudios anteriores sobre animales.

En el hígado, la transcripción de la proteína vinculadora de ácidos grasos FABP5 se incrementó 1,74 veces mediante UP780 comparado con la dieta de alto contenido en grasas como se observó por micromatriz y QPCR (Tabla 1 y en la Figura 27). Un aumento en la FABP5 facilitaría el transporte de ácidos grasos y disminuía los ácidos grasos libres en plasma que causan resistencia a la insulina. El receptor LDL de la membrana plasmática era disminuido por el UP780, que podía disminuir la captación de LDL a través de la sangre y que podía disminuir el contenido de triglicéridos en el hígado. Además, CD36, para el HDL de la membrana plasmática, el LDL oxidado y la ingesta de ácidos grasos, era disminuida también por el UP780 comparado con la dieta de alto contenido en grasas, que podía disminuir además el contenido en grasas del hígado (Tabla 1).

La dieta de alto contenido en grasas incrementaba las transcripciones de genes involucrados en la ruta de señalización en el hígado con PPAR α /RXR α , que era disminuida por UP780, especialmente por PPAR α , CD36, y c-Jun. La activación del PPAR α en el hígado normaliza el perfil de lípidos en plasma por una elevación del HDL y una

disminución del LDL. Sin embargo, los niveles de las transcripciones de ApoA1 y ApoA2, ambas lipoproteínas para HDL, no eran cambiados apreciablemente por la dieta de alto contenido en grasas o por UP780. El efecto de UP780 en PPAR α se merece una atención más profunda.

5 El UP780 reducía muchas transcripciones de enzimas involucradas en el metabolismo y detoxificación del fármaco, incluyendo CYP7B1, CYP2B9, CYP2C18, glutatión S-transferasa, y SOD3, un efecto que también merece un estudio más profundo (Tabla 1).

10 La AMPK se considera como el sensor celular para el equilibrio energético. Las células sanas mantienen una alta concentración de ATP en todo momento. La AMPK es activada cuando se incrementa la proporción celular de AMP/ATP, una señal de estrés energético (Hardie (2004) J. Cell Sci. 117: 5479). La activación de AMPK inhibe la síntesis de glucosa y de ácidos grasos, incrementa la captación de glucosa y de grasas, incrementa la glicólisis y la β -oxidación de ácidos grasos, y disminuye la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Hardie (2004) Rev. Endocrine & Metabolics Disorders 5:119). UP780 invertía la depresión de los niveles de transcripciones de la AMPK causados por la dieta de alto contenido en grasas (Figura 28).

15 Un perfil de seguridad del UP780 del extracto de planta enriquecido en cromonas UP780 se llevó a cabo en ratones CD-1 y esta composición se determinó que era bien tolerada. Como se muestra en el Ejemplo 22, la administración diaria de UP780 a 2,0 g/kg durante 14 días en ratones CD-1 no causó señal de morbilidad ni mortalidad a lo largo de la duración del estudio. El examen diario sistemático de los ratones, en su estado físico y bienestar, no mostraban ninguna señal que sugiriera que el compuesto de ensayo estaba relacionado con toxicidad o anomalía a lo largo del estudio. En este estudio de toxicidad aguda, todos los ratones continuaron ganando peso en el transcurso del estudio (Figuras 22A y B). Todas las principales lecturas bioquímicas de la sangre estaban dentro de los intervalos normales, con la excepción de que se observaron lecturas menores fuera de intervalo en electrolitos del intervalo de referencia en el día 14 de este estudio de toxicidad. Había diferencias estadísticamente significativas en aspartato aminotransferasa (AST), sodio, potasio y concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC) en las hembras y proteínas totales y nitrógeno de urea en sangre (BUN) en los machos tratados con UP780, cuando se comparaban con el un control de vehículo. $P \leq 0,05$ (datos no mostrados). Los valores medios observados para MCHC, proteínas totales, y BUN estaban todavía dentro del intervalo normal de referencia; sin embargo, los valores medios de AST, sodio y potasio estaban fuera del intervalo normal.

30 Los resultados del examen general de todos los ratones post-mortem eran generalmente normales tanto para los animales tratados con el vehículo de control como para los tratados con UP780 (datos no mostrados). No se observó ningún cambio microscópico relacionado con el artículo en estudio en ninguno de los tejidos especificados en el examen microscópico de los ratones a los que se administró UP780 durante 14 días. Unos cuantos cambios microscópicos misceláneos observados en los órganos y tejidos examinados eran del tipo de los que se observan frecuentemente como cambios que aparecen de forma espontánea en ratones de laboratorio de esta edad y raza. Los desequilibrios observados en el electrolito podían ser causados por muchas condiciones, incluidos trastornos de riñón y de las glándulas suprarrenales, y cualquier enfermedad que dé como resultado vómitos y/o diarrea. Un bajo valor de AST no tiene un significado clínico. Debido a la falta de la evidencia correspondiente en las observaciones clínicas, en los valores de hematología y en los resultados de histopatología, los autores de la invención creen que estas desviaciones de los valores normales podían ser debidas a las condiciones del alojamiento y del laboratorio. Además, incidencias como la pérdida de células como resultado de la hemólisis y la contracción esplénica debida al estrés psicológico podían dar como resultado un falso incremento o disminución en las lecturas del analito. Por tanto, basado en los descubrimientos clínicos y en los informes de laboratorio sobre hematología, química de la sangre e histopatología, se concluyó que no había evidencia de ninguna toxicidad sistémica en ninguno de los ratones de este estudio a esta dosis. El vehículo o artículo en estudio no ejercía ningún efecto sobre el tipo, incidencia o gravedad de estos descubrimientos incidentales.

45 Los compuestos de la presente invención, así como la plantas que contienen los compuestos pueden ser distribuidos como suplementos dietéticos formulados en pastillas, cápsulas, geles blandos y también en dietas regulares y/o alimentos funcionales, barras energéticas, zumos de frutas y bebidas carbonatadas o normales para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades y estados mediados por resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, altos niveles de triglicéridos y niveles de glucosa no equilibrados en mamíferos, que incluyen pero que no se limitan a humanos.

55 La preparación de compuestos para la administración en composiciones farmacéuticas puede ser realizada por diversos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cromonas pueden ser formuladas como un polvo de hierbas en la forma de su existencia natural; como disolvente y/o extractos de fluido supercrítico en diferentes concentraciones; compuestos enriquecidos y purificados a través de la recristalización, separación en columna, reparto con disolvente, precipitación y otros medios, como puro y/o como una mezcla conteniendo cromonas sustancialmente purificadas preparadas por métodos sintéticos.

60 Varios sistemas de entrega se conocen en la técnica y pueden ser usados para administrar las composiciones terapéuticas de la invención, incluyendo polvos, cápsulas, pastillas, tintes, sistemas de entrega sublinguales, barras de alimentación y varias soluciones que incluyen agua, zumos de frutas, y bebidas carbonatadas sin alcohol, cremas y emulsiones para administración oral. Las composiciones pueden ser distribuidas en forma de soluciones acuosas,

encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden ser administradas parenteralmente por inyección, aunque también se contemplan otras eficaces formas de administración, tal como inyección intraarticular, aerosoles inhalantes, formulaciones activas de forma oral y tópica, iontoforesis transdérmica o supositorios. Un soporte preferido es una solución salina fisiológica, pero se contempla que también pueden usarse otros soportes farmacéuticamente aceptables. En una realización, se contempla que el soporte y la cromona o cromonas constituyen una formulación de liberación lenta fisiológicamente compatible. El disolvente primario en un soporte de este tipo puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Además, el soporte puede contener otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución u olor de la formulación. De forma similar, el soporte puede contener aún otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener la estabilidad, velocidad de disolución, liberación o absorción del ligando. Tales excipientes son esas sustancias empleadas de forma usual y habitual para formular dosis para la administración parenteral en forma de dosis unitaria o de dosis múltiple.

Una vez se ha formulado la composición terapéutica, puede almacenarse en viales estériles en forma de solución, suspensión, crema, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden ser almacenadas en una forma lista para usar o que requiriera la reconstitución de forma inmediata antes de la administración. La manera de administrar formulaciones que contienen las composiciones para la distribución sistémica puede ser vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, intranasal, o mediante supositorio vaginal o rectal.

La cantidad de la composición que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o estado particular dependerá de la naturaleza del trastorno o estado, que puede ser determinada por técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación dependerá de la vía de administración, y de la gravedad o avance de la enfermedad o estado, y debería decidirse según el profesional técnico y las circunstancias de cada paciente. Animillas dosis eficaces pueden ser extrapoladas a partir de las curvas dosis-respuesta derivadas de los sistemas de ensayo del modelo *in vitro* o animal. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición de la invención se determina fácilmente mediante la administración de dosis graduadas de la composición y observando el efecto deseado.

El método de tratamiento según esta invención comprende administrar de forma interna o tópicamente a un mamífero, que incluye pero que no se limita a un ser humano que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más cromonas a partir de una sola fuente o de múltiples fuentes. La pureza de la cromona o mezclas de las mismas puede estar en el intervalo de 0,01 % a 100 %, dependiendo de la metodología usada para obtener el compuesto o compuestos. La concentración de la composición de cromona en administraciones orales, inyectables, tópicas, aerosoles, supositorios e intradérmicas puede ser 0,001 % a 99,99 % en peso de la cantidad total en una formulación apropiada. Las cromonas pueden ser usadas por vías estándar de administración seleccionadas del grupo constituido para administración oral, tópica, en aerosol, en supositorio, intradérmica, intramuscular e intravenosa con una dosis diaria en un intervalo de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg de peso corporal de los mamíferos, especialmente los seres humanos.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Preparación de extractos orgánicos y acuosos a partir de plantas desecadas

Materiales de plantas desecados eran triturados hasta un tamaño de partícula no mayor que 2 mm, y una parte de 20 g se extrajo tres veces con 100 ml de metanol:diclorometano (1:1) usando un extractor automático ASE 300. El extracto orgánico (EO) se obtuvo usando evaporación rotatoria y vacío con alta velocidad desecando para eliminar el disolvente. Cada extracto de planta se pesó (aproximadamente 75 mg) y se disolvió en 1,5 ml de DMSO para elaborar una solución con una concentración de 50 mg/ml.

Ejemplo 2. Estirpes de células 3T3-L1 de ratón y condiciones de cultivo

3T3-L1, una estirpe de células embrionarias de ratón (American Type Culture Collection, Manassas, VA), es una sub-estirpe de la estirpe albina suiza 3T3 que puede diferenciarse desde un estado pre-adiposo al adiposo. Estos pre-adipocitos se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Mediatech, Inc., Herndon, VA).

Ejemplo 3. Ensayo ELISA de adiponectina

Para establecer un protocolo de diferenciación, las células 3T3-L1 eran incubadas en placas de 96 pocillos y cultivadas durante la noche hasta confluencia. Las células confluentes se indujeron hasta diferenciación 2 días después de la confluencia. La inducción se llevó a cabo suplementada con 0,5 mM de isobutilmetilxantina, 1,0 μ M de dexametasona y 1,7 μ M de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en el medio de cultivo. En el 7^o día, los adipocitos eran tratados con los compuestos de control o los extractos de plantas durante 24 horas. Todos los controles y

extractos de plantas se solubilizaron en DMSO y al medio de cultivo se añadió a 1 % del volumen total. El medio de las células se recogió para medir los niveles de adiponectina y se ensayó mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA) según el protocolo del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilidad del ensayo oscilaba desde 31,25-2.000 pg/ml. Los controles positivos eran ensayados en un intervalo desde 0,01 a 300 μM (Figura 1). El mayor incremento en veces del nivel de adiponectina se observó a 1 mM tanto para indometacina como para troglitazona con un incremento de 1,6 y 1,7 veces en el nivel de adiponectina, respectivamente.

Debido a la pobre relación señal-ruido del ensayo (menor que 2), el protocolo previamente mencionado necesitaba mejorarse. Los adipocitos eran incubados y diferenciados como se ha descrito previamente. Las células eran diferenciadas en el medio de diferenciación durante 48 horas con o sin la adición de insulina. Después, las células eran tratadas con los compuestos de control o los extractos de plantas durante sólo 48 horas después de la diferenciación. Todos los otros parámetros eran el mismo que el previamente mencionado. Los controles de indometacina (Figura 1) y troglitazona (datos no mostrados) eran ensayados a 10-100 μM y 3-30 μM respectivamente. El mayor incremento en el nivel de adiponectina era 52 veces superior a la señal de la línea de base que se lograba mediante el tratamiento de indometacina a 100 μM , mientras el incremento más bajo fue de 7 veces con indometacina a 10 μM (Figura 1 B). El mayor incremento de adiponectina mediante el tratamiento con troglitazona se logró a 30 μM con un incremento de 49 veces, mientras el menor incremento de veces del nivel de adiponectina se observaba a 3 μM con 24 veces (datos no mostrados). Ambos de estos compuestos presentaban incrementos en los niveles de adiponectinas que eran sustancialmente superiores a los datos publicados.

Ejemplo 4. Cribado de extractos de plantas para la mejora de la producción de adiponectina en adipocitos

La biblioteca de extractos de plantas se cribó usando el ensayo de ELISA para adiponectina descrito en el Ejemplo 3. Los extractos orgánicos aislados como se describe en el Ejemplo 1, se cribaron por triplicado usando indometacina y troglitazona como controles. Después de los 2.059 extractos en bruto, el 14,9 % de ellos (139 extractos) indujeron producciones de adiponectina superiores a los niveles de control. De los extractos positivos, 37 extractos (1,8 % del total) eran más activos que la concentración más baja (3 μM) del control de troglitazona. Estos 37 extractos en bruto se volvieron a ensayar con diluciones de las series. Los extractos orgánicos de exudados de hojas de *Aloe ferox*, P0017-OE, mostraban una buena curva dosis-respuesta de inducción de adiponectina (Figura 2) y eran seleccionados para una evaluación adicional.

Ejemplo 5. Purificación de alto rendimiento (HTP) de extractos orgánicos activos de *Aloe ferox*

P0017-OE se seleccionó para el fraccionamiento del compuesto activo guiado por bioensayo. El P0017-OE (400 mg) se cargó en una columna de cromatografía instantánea de fase normal previamente empaquetada (2 cm de DI x 8,2 cm, 10 g de gel de sílice). La columna se eluyó usando un sistema de purificación de alto rendimiento (HTP) Hitachi con un gradiente de fase móvil de (A) 50:50 EtOAc:hexano y (B) metanol desde 100 % A hasta 100 % B en 30 minutos a un caudal de 5 ml/min. La separación se controló usando un detector UV de longitud de onda de banda ancha y las fracciones se recogieron en una placa de 96 pocillos profundos a 1,9 ml/pocillo usando un colector de fracciones Gilson. Las fracciones con absorción en el UV y tiempos de retención similares se combinaron en 8 sub-fracciones y se desecaron a bajo vacío y con centrifugación y se les llamó P0017-OE -NP-F1, F2, F3, F4, F6, F6, F7 y F8 (Figura 3). El DMSO se usó para disolver cada sub-fracción (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y una parte (2 μl) se tomó para el ensayo de la adiponectina. P0017-OE-NP-F3 es la más activa de las 8 sub-fracciones.

Ejemplo 6. De-duplicación mediante LC-MS/PDA de subfracciones de P0017-OE-NP

Debido a que se probó que P0017-OE-NP-F3 era la sub-fracción más activa en el ensayo de adiponectina, se utilizó LC-MS/PDA para analizar cada sub-fracción P0017-OE-NP obtenida a través del fraccionamiento y la HTP, y se compararon entre sí para encontrar los picos únicos del compuesto de la P0017-OE-NP-F3. Los compuestos más activos posibles con peso molecular de 394 (aloesina) y 396 (aloesinol) en P0017-OE-NP-F3 se propusieron basados en los pesos moleculares y en la búsqueda en la bibliografía.

Ejemplo 7. Extracción y purificación de Aloesina y Aloesinol a partir de *Aloe ferox*

Los exudados de hojas de *Aloe ferox* (P0017) (200 g) eran extraídos en metanol (3 veces). La solución de metanol combinada se evaporó a bajo vacío para producir un extracto en metanol. El extracto en metanol (5 g) del P0017 se fraccionó usando el método descrito en el P0017-OE-NP-F3 del Ejemplo 6. La fracción activa (equivalente a la fracción P0017-OE-NP-F3 del Ejemplo 6) (150 mg) se cargó en una columna C_{18} Phenomenex Luna (250 mm x 30 mm, 10 μm) y se eluyó en un sistema de purificación de alto rendimiento Hitachi (HTP) con un gradiente de la fase móvil de agua (A) y metanol (B) desde 90 % A a 100 % B en 40 minutos a un caudal de 5 ml/min y después se lavó con metanol 100 % durante 10 minutos. La separación se controló usando un detector UV con una longitud de onda de banda ancha y las fracciones se recogieron en tubos usando un colector de fracciones Gilson. Diez picos del compuesto principal se recogieron manualmente de 4 pasadas en columna de C_{18} . Las 10 fracciones eran desecadas y purificadas mediante recristalización y se nombraron P0017-AC1, P0017-AC2, P0017-AC3, P0017-AC4, P0017-AC5, P0017-AC6, P0017-AC7, P0017-AC8, P0017-AC9 y P0017-AC10 (Figura 4). P0017-AC1 y P0017-AC2 presentaban actividad en el ensayo de adiponectina y eran identificadas como aloesina y aloesinol, respectivamente. Los 8 compuestos que quedaban eran o no activos o menos activos.

Ejemplo 8. Identificación detallada de de Aloesina y Aloesinol

Aloesina (UP394): Rendimiento, 2,4 % de P0017-OE-NP-F3 (Pureza > 98 %, HPLC); UV (Max): 248,4, y 295,9 nm; MS (ESI, detección de ión negativo): m/z 393 (M-1, 100 %). La muestra se enriqueció con una aloesina estándar, que mostraban el mismo tiempo de retención en un cromatograma de HPLC (Figura 5).

- 5 Aloesinol (UP396): Rendimiento, 1,4 % de P0017-OE-NP-F3 (Pureza > 97 %, HPLC); UV (Max): 248,4, y 295,9 nm; MS (ESI, detección de ión negativo): m/z 395 (M-1, 100 %). La muestra se enriqueció con una aloesinol estándar, que mostraban el mismo tiempo de retención en un cromatograma de HPLC (Figura 6).

Ejemplo 9. Preparación y cuantificación de aloesina a partir de extracto de *Aloe ferox*

- 10 Aloesina (UP394) se extrajo de los extractos de la hoja entera de *Aloe ferox*, aislados mediante una columna de cromatografía preparativa y después se purificó adicionalmente mediante recristalización como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.451.357 con el título "Method of Purification of Aloesin", que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. En resumen, los extractos desecados se obtuvieron de la hoja entera de *Aloe ferox* que se había disuelto previamente en agua caliente y se había filtrado para retirar las partículas insolubles. El extracto se cargó después en una columna de fase inversa rellena con resinas CG-161 y la aloesina (UP394) se eluyó de la columna con metanol 20-30 %, después la columna se lavó con agua DI (desionizada). El eluyente en metanol del 20-30 % se combinó y se evaporó. El sólido se recristalizó en disolvente alcohol/agua hasta que se alcanzó >90 % de pureza sin contaminación con antraquinona (contenido de aloína A y B no mayor de 100 ppm) según el método de HPLC siguiente.

- 20 Cromonas, tal como aloesina (UP394), aloesinol (UP396), y aloeresina A eran cuantificadas frente a contaminantes de antraquinona (es decir, Aloína A y B) usando el método por HPLC publicado (Zahn (2007) Phytochem. Anal. 10:1002-1024). Los análisis analíticos eran realizados en un sistema de HPLC Hitachi L-7000 con bombas L-7100, muestreador automático L-7200 y horno de columna L7300. El método usó una columna C 18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) Phenomenex IB SIL acoplada con un cartucho de protección de C18. La fase móvil consistía en un gradiente de: agua/metanol empezando con una relación 66 %: 34 % en los primeros 5 minutos. La relación se cambiaba a 24 % de agua frente a 76 % de metanol en volumen en 15 minutos y después se mantuvo a esta relación durante otros 2 minutos. La columna se equilibró a 66 % de agua y 34 % de metanol durante 5 minutos antes de la siguiente inyección de muestra. El caudal era de 1,0 ml/min. Las cromonas y antraquinonas eran detectadas con un detector de UV L-7400 a una longitud de onda de 297 nm. Las cromonas y antraquinonas eran identificadas basadas en los tiempos de retención en HPLC y se cuantificaron basándose en las áreas de picos frente a los patrones individuales de cromona y antraquinona.

- 25 En el extracto en bruto de *Aloe ferox*, el contenido de aloesina (UP394) se informó como 24,8 % en peso con antraquinonas en un 22 % (Zahn, (2007) Phytochem. Anal. 10:1002-1024). El contenido de aloesina en diferentes hojas de *Aloe barbadensis* se había informado como 0,32 mg/g (es decir, 0,032 %) con cromonas totales de 0,1037 %. El contenido de antraquinona (Aloína A y B) contenido por la otra parte es casi cuatro veces mayor (1,14 mg/g o 0,114 %) que el contenido de aloesina (Park (1998) Phytochem. Anal. 9:186-191).

- 35 Con el método de des-colorización y otros procesos de producción, aloesina y antraquinonas son totalmente eliminadas (ambas estaban por debajo de 50 ppm según el análisis de HPLC) del gel en polvo desecado en aerosol de la hoja entera de *Aloe vera* (Lotes RM040805-02 y RM040805-05) y gel en polvo de *Aloe vera* Qmatrix deshidratado (Lote RM120806-01). Aloesina (UP394) aislada y purificada (Lote A-2705 y Lote I1506AW) de extracto de hoja de *Aloe ferox* tenían una pureza de 93 % y 100,6 %, respectivamente, con antraquinonas totales menores que 50 ppm. La aloesina (UP394) libre de antraquinonas (<50 ppm antraquinonas totales - Aloína A y B) se utilizó para producir la composición enriquecida en cromonas - N931 y UP780 como se ilustra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 10. Mejora de la producción de adiponectina mediante Aloesina (UP394) y Aloesinol (UP396)

- 45 Dos cromonas puras, UP394 (aloesina) y UP396 (aloesinol), se ensayaron para aumentar la producción de adiponectina de adipocitos a 30 µM como se describe en el Ejemplo 3. Aloesina y aloesinol mostraban un incremento de 2 y 3,2 veces en la producción de adiponectina por adipocitos, respectivamente (Figura 7).

Ejemplo 11. Detallada preparación de N931 (Lote D1205-01)

- 50 Esta composición única del asunto (N931) fue producida combinando la aloesina de cromona pura (UP394) aislada de los exudados de la hoja de *Aloe ferox* con un gel en polvo de la hoja entera hecha de *Aloe vera*. La composición de cromona estandarizada a partir de dos especies de *Aloe* contenía no menos que 1,4 % cromonas - es decir, aloesina (UP394). La aloesina (UP394) se extrajo de los exudados de hoja entera de *Aloe ferox*, aislados mediante columna de cromatografía preparativa y después se purificó adicionalmente mediante la recristalización mostrada en el Ejemplo 9 y descrita adicionalmente en la patente de EE.UU. n° 6.451.357 con el título "Method of Purification of Aloesin," que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Esta composición única de cromona normalizadas fue identificada como N931.

Después, se añadieron 0,811 kg de aloesina (Lote A-2705 con una pureza de 93 % y un contenido de humedad del de 5 %) a 50 kg de gel en polvo desecado en aerosol de la hoja entera de *Aloe vera* (Número de referencia: 5020 de Aloecorp, Lotes RM-040805-02 y RM-040805-05) y la mezcla se mezcló con un mezclador en V. Se puso en marcha la barra intensificadora y se hizo funcionar tanto la barra intensificadora como la cubierta durante un tiempo de
 5 mezclado no menor que 5 min y no mayor que 7 min. Se desconectó sólo la barra intensificadora y continuó la mezcla durante no menos que 5 min y no más que 10 min. Se conectó de nuevo la barra intensificadora y el mezclado durante no menos que 5 min y no más que 7 min. Se detuvo el mezclado, se recogió el material mezclado y se cuantificó el contenido de Aloesina en UP780 por un método de HPLC como de 1,5 % con un contenido total de antraquinona menor que 50 ppm cuantificado por un método de HPLC como se ilustra en el Ejemplo 9.

10 Ejemplo 12. Modelo pre-diabético inducido con una dieta de alto contenido en grasas

Un modelo de animal inducido con dieta de alto contenido en grasas se desarrolló y se usó para evaluación de los efectos terapéuticos potenciales de los extractos de cromona. El C57BL/6J es un modelo de animal clínicamente relevante que puede usarse en estudios de trastornos metabólicos, patofisiología tolerancia a la glucosa deficiente y para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Ahren et al. (2004) *Diabetes* 53 (suplemento 3):S215-S219; Laakso et al. (2004) *Diabetes Care* 27:2253-2259; Kahn et al. (2004) *Diabetes* 53:3274-3285; Scheurink et al. (1998) *European J. Endo.* 139:461-467; Yuan et al. (2002) *Diabetes* 51:1851-1858; Reitman et al. (2005) *Endocrinology* 145:3258-3264; Vlassara et al. (2005) *Diabetes* 54:2314-2319; Cawthorne et al. (2002) *Molecular and Cellular Proteomics* 1:509-516). La metodología de la inducción del modelo fue explicada por primera vez por Surwit et al. en 1988 (*Diabetes*, 37:1163-1167). En resumen, los síntomas como deficiente tolerancia a la glucosa y trastorno metabólico se infligieron con éxito en ratones C57BL/6J cuando eran alimentados con dieta de alto contenido en grasas durante 8 semanas. Los ratones C57BL/6J macho se compraron a Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) con 6 semanas de edad. Una semana después del período de aclimatación, los animales se dividieron en grupos (n=5 ó 6) y se les proporcionaron gránulos con alto contenido en grasas (45 % kcal) para roedores (Research diets, Inc., New Brunswick, NJ) y agua a voluntad durante 12 semanas excepto en los momentos de los ensayos de tolerancia a la glucosa y a la insulina en los que la alimentación se les retuvo durante tres horas. Los animales se mantuvieron en una sala con temperatura controlada (22,2 °C) con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Glucosa en sangre, colesterol y triglicéridos se controlaron cada semana durante 12 semanas como se ha descrito previamente. La medida del peso corporal se tomaba una vez a la semana durante las 12 semanas.

Una vez se confirmó la inducción de los trastornos metabólicos al controlar semanalmente los parámetros seleccionados (glucosa, triglicéridos y colesterol) es decir, en la 8ª semana, se inició el tratamiento intraperitoneal diario y se mantuvo durante 4 semanas. En cada día del estudio, los compuestos de ensayo y el control positivo GW 1929 (Tocris Bioscience, Ellisville MO, lote 2A/58705) se disolvieron en 0,5 % metilcelulosa (Sigma, St. Louise MO, Lote 116H0857) y se distribuyó en dosis intraperitoneales de 100 y 5 mg/kg, respectivamente. Como GW1929 no se solubilizaba completamente en metilcelulosa, primero se disolvió en DMSO (Sigma, St. Louise MO, lote 064K0067).
 35 La concentración de cada compuesto, incluido el vehículo, se ajustó entonces para contener 5 % de DMSO antes de la administración del fármaco. Los animales tratados con vehículo recibieron sólo 0,5 % metilcelulosa. No se observó ningún signo detectable de irritación después de la administración de cada compuesto o vehículo.

El control positivo usado, GW 1929, N-(2-benzoilfenil)-O-[2-(metil-2-piridinilamino)etil]-L-tirosina, es un sólido en polvo de color amarillo con peso molecular del lote de 504,59 (Tocris Bioscience, Ellisville MO, lote 2A/58705). El compuesto es selectivo, agonista de PPAR γ oralmente activo. Administrado oralmente disminuye los niveles de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos en modelos de animales diabéticos (Brown et al. (1999), *Diabetes* 48:1415; Way et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 25651-25653). A los animales se les proporcionó una dieta de alto contenido en grasas durante 12 semanas. El tratamiento se comenzó en la semana 8 y continuó durante 4 semanas.

45 Ejemplo 13. El efecto de UP394 y UP396 sobre la resistencia a la insulina

Una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo usando ratones C57BL/6J como se describe en el Ejemplo 12 a una dosis de 2 g/kg el día 18 de tratamiento con administración intraperitoneal de GW 1929 (5 mg/kg), UP394 (100 mg/kg), UP396 (100 mg/kg) y vehículo. A los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de la administración de la glucosa. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los datos son medias \pm SD, n = 6. Una significativa utilización de la glucosa se observó a los
 50 tiempos de 60, 90 y 120 minutos para GW1929 y UP396 cuando se comparaban con el vehículo, p < 0.05. Los valores de P para GW1929, UP394 y UP396 eran 0,00, 0,87 y 0,43 a T0; 0,07, 0,16 y 0,23 a T30, respectivamente cuando se comparaban con el vehículo. Los valores de P para UP394 eran 0,15 a T60; 0,10 a T90 y 0,17 a T120, cuando se comparan con el vehículo (Figura 8A).

Tanto UP394 como UP396 presentaron un efecto sobre la sensibilización a la insulina en el ensayo de tolerancia a la insulina. Una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina se realizó en ratones C57BL/6J como se muestra en el Ejemplo 13 a una dosis de 0,5 unidades/kg el día 24 del tratamiento con administración oral de GW 1929 (5 mg/kg), UP394 (100 mg/kg), UP396 (100 mg/kg) y vehículo. A los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas antes de la inyección de insulina. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los datos son medias \pm SD, n = 6. Se observó una eliminación significativa de la glucosa en los puntos temporales de T30, T60 y T90 for UP394 y UP396 así como GW 1929 cuando se comparaban con el vehículo, p <
 60

0,05. Los valores de P para GW1929, UP394 y UP396 eran 0,00, 0,14 y 0,67 a T0; y 0,08, 0,00 y 0,04 a T120, respectivamente, cuando se comparan con el vehículo (Figura 8B).

Ejemplo 14. Efecto de UP394 y UP396 en las sensibilidades a la insulina en el modelo de resistencia a la insulina inducida por dieta de alto contenido en grasas

- 5 El efecto de la administración oral de UP394 (100 mg/kg) y UP396 (100 mg/kg) sobre la resistencia a la insulina se demostró adicionalmente en animales tratados con los compuestos UP394 y UP396. Los niveles de insulina en esos animales disminuía significativamente. Los niveles de insulina en plasma se midieron con un kit de ELISA para insulina (Crystal Chem - Chicago, IL). A los animales se les trató con GW1929, UP394 y UP396 y vehículo durante 2 semanas después de las 8 semanas con una dieta de alto contenido en grasas (Figura 9). La sangre se extrajo por la vena de la cola y se centrifugó para obtener el plasma. Se observaron las disminuciones significativas en los niveles de insulina en plasma el día 14 en los grupos de tratamiento GW 1929, UP394 y UP396, cuando se comparaban con el grupo vehículo, $P < 0,05$.

Ejemplo 15. Efecto del N931 sobre los niveles de glucosa en ayunas en ratones db/db

- 15 Los niveles de glucosa en ayunas de ratones machos db/db (8 ratones en cada grupo) tratados con GW1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo se midieron semanalmente. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de que se tomaran las medidas. Como se muestra en la Figura 10, el nivel de glucosa en ratones tratados con vehículo se incrementó a lo largo del tiempo durante el tratamiento de 10 semanas. GW 1929, el compuesto de referencia, podía mantener los niveles de glucosa al nivel de la línea de base, como se esperaba. Similar a GW1929, el N931 reducía sustancialmente los niveles de glucosa, empezando desde la semana 5 de tratamiento. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas eran significativamente menores para N-931 a las 6, 7, 9 y 10 semanas, cuando se comparaban con el vehículo $P < 0,05$. A la semana 10 de tratamiento, en el grupo tratado con N931 se observó un 46 % de reducción del nivel de glucosa.

Ejemplo 16. Efecto de N931 sobre la resistencia a la insulina en el modelo de ratón db/db

- 25 Una prueba oral de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo en ratones db/db a una dosis de 3 g/kg después de 10 semanas de tratamiento. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de la carga de glucosa. Los ratones (8 ratones en cada grupo) eran tratados con GW 1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo durante 10 semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la carga de glucosa. La significativa eliminación de glucosa de la circulación se observó a 0 y 120 minutos en ratones tratados bien con GW1929 o con N-931 cuando se comparaban con el vehículo, $P < 0,05$ (Figura 11A). Los resultados indican que N931 tiene la capacidad de incrementar la tolerancia a la glucosa, por tanto mejora la sensibilidad a la insulina de ratones db/db.

- 35 Una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina se realizó en ratones db/db a una dosis de 0,5 unidades/kg después de seis semanas de tratamiento. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de la inyección de insulina. Los ratones db/db (8 en cada grupo) eran tratados con GW1929 (5 mg/kg), N931 (375 mg/kg) y vehículo durante 6 semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección de insulina. De nuevo, la sensibilidad mejorada a la insulina era evidente en los ratones tratados con GW 1929 y N931. La significativa eliminación de glucosa se observó a los tiempos de 0, 30 y 40 60 minutos tanto para GW1929 como para N-931 cuando se comparaban con el vehículo, $p < 0,05$ (Figura 11B).

Ejemplo 17. Efecto de N-931 sobre el nivel de triglicéridos en modelo de ratón db/db

- 45 Semanalmente los niveles de triglicéridos en ayunas de ratones machos db/db tratados con GW1929 (5 mg/kg), N-931 (375 mg/kg) y vehículo se tomaron durante 10 semanas. A los animales se les proporcionó dieta de roedor T2018 a voluntad excepto cuando estaban en ayunas. A los animales se les dejó en ayunas durante la noche antes de que se tomaran las medidas. Los valores indicados son niveles en tanto por ciento de triglicéridos en el vehículo, $n = 8$. Se encontró una significativa reducción en los niveles de triglicéridos en los animales tratados con GW 1929 y N-931 cuando se comparaban con el vehículo después de 10 semanas de tratamiento, $P < 0,05$ (Figura 12).

Ejemplo 18. Preparación y administración de una composición enriquecida en cromona (UP780)

- 50 Esta composición única del asunto (UP780) fue producida combinando una cromona pura aloesina de (UP394) aislada de los exudados de la hoja de *Aloe ferox* con gel en polvo de la hoja elaborado a partir de Aloe vera. La composición de cromona estandarizada a partir de dos especies de *Aloe* contenían no menos de 2 % cromonas - es decir, aloesina (UP394) con menos que 50 ppm de antraquinonas totales. La cromona, aloesina (UP394), se extrajo de los exudados de hoja entera de *Aloe ferox*, aislados mediante cromatografía preparativa en columna y se purificó adicionalmente por recristalización como se demuestra en el Ejemplo 9 y se describe en la patente de EE.UU. nº 55 6.451.357 con el título "Method of Purification of Aloesin," que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Esta composición única de cromona estandarizada se identificó como UP780.

Los procedimientos se describen más adelante para la preparación de un lote de 5 kg de Aloe, gel en polvo de *Aloe vera* enriquecido con cromona de *Aloe*, UP780. Esta es una composición de gel de Aloe estandarizado comprendida por no menos que 2 % aloesina en gel en polvo de *Aloe vera*. 0,11 g de aloesina (Lote I1506AW) purificada de exudados de hoja entera de *Aloe ferox* con una pureza de 100,6 %, se añadió a 4,90 kg de gel en polvo de Aloe vera (Qmatrix® deshidratado) (número de referencia AA8010XQ80 de Aloecorp, Lote RM-120806-01). La mezcla se combinó para producir una composición UP780 de Aloe normalizada con cromona de Aloe (Lote L1806QMAW-01). El contenido de aloesina (UP394) en la composición (UP780) se confirmó por HPLC como 2,2 % sin contaminación con antraquinona.

Una vez se había confirmado una inducción de la enfermedad en los animales después de 8 semanas de dieta de alto contenido en grasas mediante el control de los parámetros seleccionados, se inició el tratamiento oral diario. Cada día, los artículos de ensayo y el control positivo GW 1929 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, Lote 2A/58705) eran disueltos en 0,5 % metilcelulosa (Sigma, St. Louise MO, Lote 116H0857) y se distribuyeron en dosis orales de 100, 200 y 400 mg/kg de UP780 (Lote L1806QMAW-01); 400 mg/kg de gel en polvo de *Aloe vera* Qmatrix® (QM400, Lote G6319103-L3) así como 5 mg/kg de GW1929. Como GW1929 no se había solubilizado completamente en metilcelulosa, primero se disolvió en DMSO (Sigma, St. Louis, MO, Lote 064K0067). La concentración final de los compuestos de ensayo, incluido el vehículo, se ajustó después para contener 5 % de DMSO antes de la administración del fármaco. Los animales tratados con vehículo soporte recibieron sólo 0,5 % de metilcelulosa. No se observó ningún signo detectable de irritación después de cada administración de fármaco o vehículo.

Ejemplo 19. Eficacia y estudio dosis-intervalo de UP780 sobre dieta de alto contenido en grasas inducida en ratones C57BL/6J

Como se describe en el Ejemplo 12, los ratones C57BL/6J macho se compraron a Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) con 6 semanas de edad. Una semana después del período de aclimatación, los animales se dividieron en seis grupos (n=7) y se les proporcionaron de gránulos de roedor (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) de alto contenido en grasas (45 % kcal) y agua a voluntad excepto en los momentos de las pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina en los que la alimentación era retenida durante tres horas. A los animales se les mantenía en una sala con temperatura controlada (22,2 °C) con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Tres o cuatro ratones C57BL/6J machos eran metidos en una jaula para ratones que tenía secciones para alimentación y agua. La ingesta de alimentación se determinó diariamente midiendo la diferencia entre el valor de los gránulos de alto contenido en grasa previamente pesados y los que quedaban en ese día. La medida del peso corporal se tomaba una vez a la semana a lo largo del estudio.

Los niveles de glucosa en sangre en ayunas, colesterol total y triglicéridos se midieron usando 15-20 µl de sangre obtenida a través de la vena de la cola. El sistema IQ de control de glucosa en sangre con tiras de prueba "Prestige" (Walgreen, Home Diagnostics, Inc., Ft. Lauderdale, FL) para la glucosa en sangre y el analizador CardioChek con tiras de prueba de paneles PTS (Polymer Technology System, Inc, Indianapolis, IN) para colesterol y triglicéridos se usaron para determinar los valores de colesterol y triglicéridos en la sangre completa.

Una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo el día 0 (línea de base), y en las semanas 3, y 9 después del comienzo del tratamiento. El día del ensayo, a los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas y recibieron administración intraperitoneal de glucosa a una dosis de 2 mg/g. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos de 0 (antes de la inyección de glucosa), 30, 60, 90 y 120 minutos después del suministro de glucosa. La sangre se obtuvo a través de la vena de la cola. Una prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina se realizó en la semana 10. A los animales se les dejó en ayunas durante 3 horas y recibieron administración intraperitoneal de insulina (recombinante humano expresado en levadura, Sigma, St. Louis, MO, Lote 055K1321) a una dosis de 0,5 UI/kg. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos de 0 (antes de la inyección de insulina), 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de insulina. La sangre se obtuvo a través de la vena de la cola.

Ejemplo 20. Materiales y métodos de micromatrices de ADN

Los ratones eran divididos en 7 grupos de tratamiento, y se seleccionaron 3 animales por grupo para recoger tejido. Después de 10 semanas de tratamiento, los ratones eran anestesiados con gas CO₂ y se recogieron hígado, pared muscular del cuerpo, y grasa a los 5 minutos de la eutanasia. Los tejidos eran cortados en trozos menores que 5 mm y se almacenaron sumergidos en solución de RNALater (Ambion) durante la recogida del tejido, y más tarde se llevaron a un congelador a -80°C para almacenamiento de larga duración. Para el aislamiento del ARN, los tejidos de ratón se descongelaron y se retiraron de la solución de almacenamiento RNALater. Se usó un kit de RNEasy para el aislamiento del ARN total para la extracción de ARN total en el hígado y se usó un kit RNEasy (Qiagen) para tejido fibroso para la extracción de ARN total del músculo. Los tejidos eran homogeneizados con un homogeneizador Dounce de vidrio en una solución RLT suministrada en los kits RNEasy que contenía tiocianato de guanidina y β-mercaptoetanol que contenía solución RLT suministrada en kits RNEasy. Los ARN extraídos eran cuantificados por absorción UV a longitudes de onda de 260/280 nm. La calidad de ARN se determinó usando electroforesis desnaturizante en gel de gioxal-agarosa (1 %) para la integridad de las bandas de ARNr 28S y 18S y para la

ausencia del ADN genómico. Cuando el ADN genómico se observó a partir del gel, se llevó a cabo una segunda ronda de extracción con el kit RNEasy para la particular muestra de ARN.

Se seleccionó una matriz 430 2.0 de Affymetrix de genoma de ratón para estudios de micromatriz de ADN. Cada matriz contiene 45.000 conjuntos de sondas de 34.000 genes de ratón y las secuencias de control para hibridación, poly-A, 100 conjuntos de sondas de normalización, y genes domésticos. CoGenics fue seleccionada de una lista de doce proveedores de servicio autorizado para llevar a cabo el proceso de síntesis de ARNc, hibridación/lavado, exploración, y análisis de los datos usando el programa informático GCOS de Affymetrix. CoGenics llevó a cabo su propio control de calidad interno de ARN después de recibir las muestras de ARN usando un espectrofotómetro NanoDrop y un bioanalizador Agilent 2100. Durante el procesamiento de la micromatriz, Cogenics también llevó a cabo el control de calidad de los ARNc y del conjunto de los datos de micromatrices. Para los hígados de ratón, los grupos de tratamiento de control improductivo (LC), la dieta de alto contenido en grasas (LV), y la dieta de alto contenido en grasas + UP780 de 200 mg/Kg (LUP) se seleccionaron para el experimento de las micromatrices, en total 9 matrices. Todos los ARN, los ARNc y los conjuntos de datos de la micromatriz final pasaron el control de calidad.

La matriz 430 2.0 del genoma de ratón sigue el diseño de la matriz patrón de Affymetrix: 11 pares de sonda por conjunto de sonda, cada par de sondas contiene un oligonucleótido de 25 bases de coincidencia perfecta (PM) y de no coincidencia (MM). El análisis de los datos mediante GCOS utilizó tanto los valores de intensidad PM como de MM sustrayéndole el ruido de fondo. Para cada conjunto de sondas, todos los valores de 11 PM y de 11 MM eran resumidos en un valor de intensidad. El conjunto de datos de una matriz se escalaba después globalmente basado en el valor medio de la intensidad y el valor diana de la intensidad para la comparación matriz frente a matriz. El análisis de los datos de la micromatriz independientes se llevaron a cabo también usando el programa informático "Expression Console" de Affymetrix. Además del algoritmo MAS5 usado en GOCS para la integración de la intensidad, también se usaron los algoritmos RMA y PLIER en el Expression Console, para integraciones de la intensidad.

La utilidad de las sondas MM ha sido un asunto de debate. Los autores de la invención han llevado a cabo, por tanto, un análisis adicional de los datos de una micromatriz usando sólo los valores PM, ruido de fondo corregido, con el programa informático Bioconductor. Cada grupo de tratamiento tenía 3 matrices. Los registros gráficos de MA se usaron para la diagnosis de la consistencia de la matriz dentro de los grupos de tratamiento. La inconsistencia se normalizó usando la función *loess* del paquete de la micromatriz Bioconductor en lenguaje de programación R. Para cada conjunto de sondas de un grupo de tratamiento, los valores de 33 PM eran integrados en un valor de intensidad, transformado en \log_2 . Además, entre los grupos de tratamiento, se llevaron a cabo ensayos estadísticos de ANOVA para cada conjunto de sonda usando los valores 33 frente a 33 PM. En total 3 x 45.000 ensayos ANOVA eran realizados entre grupos de tratamiento LUP frente a LV, LUP frente a LC y LV frente a LC. El significado de las variaciones en la expresión de los genes se ensayó mediante los métodos de tasa de falso descubrimiento (FDR) y la corrección secuencial Bonferroni de Holm, a un nivel significativo $\alpha = 0,05$.

Los conjuntos de datos de las micromatrices, típicamente en intervalo de miles de genes con variaciones en la expresión, requieren la ayuda de un programa informático de análisis de rutas para que tenga el sentido de significado biológico. Los conjuntos de datos de hígado de ratón de cada 3 matrices resumidas LC, LV y LUP de los valores de PM eran analizados con el programa informático IPA5, Ingenuity Pathway Analysis, y la base de datos del genoma asociado. Se aplicaron tres criterios de corte del ANOVA como $p \leq 0,0001$, \log_2 de la intensidad $\geq 2,5$, y \log_2 de la proporción $\geq 0,9$. El IPA5 produjo 40 rutas canónicas y 70 Funciones, cada una con al menos uno de tres conjuntos de datos pasaron el valor umbral de p de 0,05 (las rutas canónicas se tomaron de las bases de datos de rutas de señalización y de rutas metabólicas familiares tal como Science STKE y KEGG. Las Funciones se basaron en la base de datos de Gene Ontology (Ontología de Genes, GO). Las rutas canónicas bien establecidas se analizaron en detalle, especialmente las rutas metabólicas superiores que mostraban una clara influencia de UP780 en el metabolismo de nutrientes. Los datos de análisis de la ruta generados por el IPA5 se exponen en la Tabla 1.

Ejemplo 21. Análisis de la QPCR de la expresión de los genes regulada mediante UP780

El ARN total extraído de tejido de ratón estaba normalmente en exceso de lo que se necesitaba para el experimento de la micromatriz. Las mismas muestras de ARN total usadas para la micromatriz, por tanto, eran guardadas para la validación de la QPCR de los resultados de la micromatriz, normalmente llevada a cabo unos meses más tarde. Los ARN totales se almacenaron rutinariamente a -80°C en un congelador y no se observó ninguna degradación después de almacenamiento de larga duración. Para la reacción de transcripción inversa de la síntesis de ADNc a partir de ARN total, se usó la transcriptasa inversa modificada, Superscript III, junto con el tampón, nucleótidos, cebador oligo(dT)₇, y ADNasa I, libre de ARNasa, suministrados como reactivos del Superscript III por Invitrogen. Para cada reacción, se usaron 5 μg de ARN total en un volumen de reacción de 50 μl . La primera cadena de ADNc se diluyó con agua a 2,5 x volumen y se usaron 2 μl de ADNc para una reacción de 50 μl de QPCR. Los cebadores ABI y el conjunto de sonda del ensayo de expresión de genes TagMan para cada gen se confirmó mediante un análisis de la secuencia de ADN antes de su uso. Todas las sondas eran sondas MGB marcadas con colorante FAM. Una mezcla maestra de PCR 2x TagMan Universal PCR de ABI se usó en la reacción de QPCR. Los ciclos térmicos y la detección era mediante un detector de secuencias 7700 de ABI, con el control del instrumento y la adquisición de datos de QPCR llevados a cabo a través del programa informático SDS de ABI. Se usó el método de

cuantificación relativo de $\Delta\Delta Ct$ y cada placa de 96 pocillos en la QPCR contenía un ADNc de control (LC) y un conjunto de control de cebadores y sonda del gen doméstico GAPDH.

Ejemplo 22. Evaluación de la seguridad de UP780

5 Ratonos CD-1 con fines reproductores se compraron al vendedor de animales de laboratorio, aprobado por la USDA (Departamento de Agricultura de los EE.UU.), Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). Los animales eran aclimatados después de su llegada durante una semana y se usaron para el estudio a la edad de 8 semanas. Los ratones se pusieron en una sala con temperatura controlada (22,2 °C) con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se les proporcionó alimentación y agua a voluntad.

10 La medida del peso corporal de la línea de base se tomó el primer día del tratamiento antes de dosificar y dos veces a la semana después hasta el día de la necropsia. A todos los ratones del grupo de tratamiento (n=10; 5 machos y 5 hembras) se les administró oralmente durante 14 días consecutivos con una dosis de 2,0 g/kg de UP780 (Lote L1806QMAW-01) en 200 μ l de agua como vehículo, usando una jeringa y agujas de alimentación con bola en la punta de calibre 18. El grupo de control (n=10; 5 machos y 5 hembras) recibieron 200 μ l de sólo agua.

15 Las observaciones clínicas sistemáticas se hicieron antes de la prueba y diariamente durante el período de estudio. Los animales eran controlados en cuanto a señales de toxicidad que incluían cambios en el color del pelaje, la piel, ojos, membrana de la mucosa, locomoción, respiración, postura y otros signos excéntricos. Las observaciones clínicas se hicieron para cualquier signo farmacotóxico tal como temblores, convulsiones, diarrea, letargia, morbidez, fasciculación, excrementos, salivación, descargas y deshidratación. En el último día del ensayo, todos los animales eran anestesiados con 2 % isoflurano a un caudal de oxígeno de 2 l/min y la sangre se recogió y se expidió a Antech
20 Diagnostics, Inc. (Portland, OR) para un perfil completo de mamíferos. Las muestras de sangre completa (en un microtubos, Microtainer, con tapón de color lavanda) se usaron para evaluaciones hematológicas y plasma para las evaluaciones de química clínica (microtubo, Microtainer, con tapón de color verde, con separador de gel). A todos los animales se les extrajo toda su sangre y se les examinó en cuanto a su patología macroscópica. Una vez se abrió la cavidad abdominal, los órganos se sometieron a examen macroscópico y se recogieron muestras de tejidos
25 del esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleo, ciego, colon, hígado, recto, cerebro (múltiples secciones), pituitaria, nervio periférico con músculo (ciático), médula espinal (3 niveles), ojos, glándulas suprarrenales, tiroide/paratiroide, páncreas, pulmones y tráquea, laringe, aorta (torácica), corazón, nodos linfáticos (cervical y mesentérico), bazo, timo, riñones, vejiga urinaria, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, cervix, ovarios, útero, vesícula biliar, fémur con articulación, piel, glándulas salivales y lengua, se fijaron con formalina neutra tamponada al 10 % y se enviaron al Research Pathology Services Inc. (New Britain, PA) para la preparación histopatológica y
30 evaluaciones microscópicas.

Todos los datos no discretos de química clínica, hematología, pesos corporales y consumo de alimentos eran recogidos en tablas con las medias y con las desviaciones estándar. La interpretación de los resultados se hizo basada en los descubrimientos de patología, signos físicos anormales y evaluaciones estadísticas de los datos.

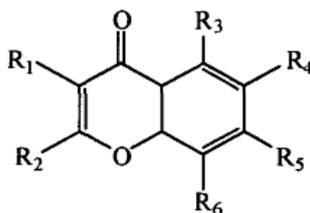
35 Tabla 1. Variaciones en la expresión de los genes a partir de micromatrices en hígado de genes involucrados en las rutas del metabolismo. Las variaciones en la expresión de genes del hígado con $p < 0,0001$ mediante ANOVA se designan con (\uparrow) para regulación al alza y (\downarrow) para regulación a la baja.

Genes	Descripción	Hígado (veces de variación de la expresión del gen)		
		LUP/LV	LUP/LC	LV/LC
<u>Biosíntesis de ácidos grasos</u>				
ACC2	Acetil-CoA carboxilasa 2	\downarrow 3,01	\downarrow 2,54	\leftrightarrow
FASN	Sintasa de ácidos grasos	\downarrow 3,50	\downarrow 2,33	\uparrow 1,5
ASCL3	Acil-CoA sintetasa, de 3 cadenas largas	\downarrow 2,07	\downarrow 1,49	\uparrow 1,39
ACSS2	Acil-CoA sintetasa, de 2 cadenas cortas	\downarrow 1,63	\downarrow 2,63	\uparrow 1,62
SCD1	Estearoil-CoA desaturasa	\downarrow 4,44	\downarrow 3,94	\leftrightarrow
FADS2	Desaturasa 2 de ácidos grasos	\downarrow 3,24	\downarrow 1,39	\uparrow 2,34
ME1	Enzima málica 1	\downarrow 2,27	\downarrow 2,03	\leftrightarrow

Genes	Descripción	Hígado (veces de variación de la expresión del gen)		
		LUP/LV	LUP/LC	LV/LC
ACYL	ATP citrato-liasa	↓ 1,85	↓ 1,57	↔
<u>β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos</u>				
ALDH1B1	Aldehído deshidrogenasa 1B1	↓ 2,82	↓ 1,75	↑ 1,61
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa 1A	↓ 1,86	↔	↑ 1,98
LCHAD	Proteína trifuncional para la β-oxidación, subunidad alfa	↓ 1,57	↔	↑ 1,49
ACOT1	Acil-CoA tioesterasa 1	↓ 5,87	↓ 3,04	↑ 1,93
<u>Biosíntesis de esteroides</u>				
SREBF1	Elemento regulador de esteroles que liga el factor de transcripción 1	↓ 2,38	↓ 1,60	↑ 1,49
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	↓ 1,54	↓ 2,37	↓ 1,54
MVD	Mevalonato defosfodecarboxilasa	↓ 2,36	↓ 2,06	↔
CYP26A1	Citocromo P450, ácido retinoico, metabolismo del fármaco	↓ 2,88	↓ 6,53	1 2,27
CYP7B1	Citocromo P450, síntesis biliar	↑ 1,94	↑ 1,91	↔
<u>Gluconeogénesis</u>				
PEPCK1	Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1	↔	↑ 1,89	↑ 2,06
<u>Transporte de grasas</u>				
CD36	Receptor de la trombospondina, transporte de ácido graso de cadena larga	↓ 2,67	↓ 1,25	↑ 2,14
FABP5	Proteína 5 enlazante de ácidos grasos	↑ 1,74	↓ 1,67	↓ 2,89
FABP4	Proteína 4 enlazante de ácidos grasos	↔	↑ 2, 1	↑ 2,43
LDLR	Receptor de LDL	1 2,89	↓ 1,60	↑ 1,80
PPAR α	Receptor α activado por el proliferador peroxisomal	↓ 2,48	↔	↑ 2,11
<u>Metabolismo de xenobióticos</u>				
CYP2B9	Citocromo P450	↓ 20,83	↓ 1,68	↑ 11,88
CYP2C18	Citocromo P450	↔	↓ 2,98	↓ 2,60
GSTA5	Glutatión-S-transferasa A5	↓ 1,67	↓ 4,08	↓ 2,10
SOD3	Superóxido dismutasa 3, extracelular	↓ 2,05	↓ 1,37	↑ 1,50

REIVINDICACIONES

1. Una cromona o una mezcla de cromonas para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndromes metabólicos, dislipidemia e hipertrigliceridemia, en donde dicha cromona o una mezcla de cromonas se selecciona del grupo de compuestos que tienen la estructura:



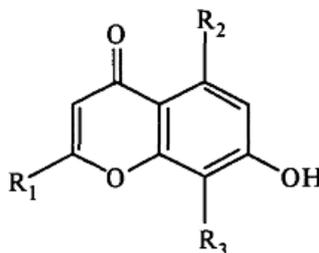
en donde

- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -H, -OH, -CH₃, -SH, alquilo, alquenilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, -OCH₃, -SCH₃, -OR, -SR, -NH₂, -NRH, -NR₂, -NR₃⁺X⁻, un éster seleccionado del grupo constituido por galato, acetato, ésteres de cinnamoilo y de hidroxilcinnamoilo, ésteres de trihidroxibenzoilo y ésteres de cafeoilo; y una hexosa o pentosa, en donde dicha hexosa o pentosa está unida a la cromona mediante un carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno y en donde dicha hexosa o pentosa se selecciona del grupo constituido por aldopentosas, metil-aldopentosa, aldohexosas, cetohehexosa y los derivados químicos de los mismos, incluidos un dímero, un trímero y otras cromonas polimerizadas; en donde dicho grupo alquilo y/o alquenilo es una cadena lineal y/o ramificada que tiene entre 1-20 átomos de carbono con y/o sin dobles enlaces y un grupo o grupos de sustitución seleccionados del grupo constituido por -OH, =O y -OR en diferentes posiciones;

X se selecciona del grupo de contraaniones farmacéuticamente aceptables que incluye hidroxilo, cloruro, yoduro, sulfato, fosfato, acetato, fluoruro, carbonato; y

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

2. La cromona o mezcla de cromonas para uso según la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende aumentar la producción de adiponectina por parte de los adipocitos.
3. La cromona o mezcla de cromonas para uso según la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende normalizar los cambios inducidos por la dieta de alto contenido en grasas en las expresiones de los genes de la biosíntesis de los ácidos grasos, β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, biosíntesis de esteroides, gluconeogénesis, transporte de grasas y señalización en el hígado con PPAR α /RXR α y mecanismo de xenobióticos
4. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cromona o mezcla de cromonas se selecciona del grupo de los compuestos que tienen la siguiente estructura general:



en donde R₁, R₂ y R₃ son como se ha definido en la reivindicación 1.

5. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha cromona se selecciona de aloesina o aloesinol.
6. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha cromona o mezcla de cromonas se aísla de una parte de la planta o se obtiene por métodos sintéticos.
7. La cromona o mezcla de cromonas para uso según la reivindicación 6 en donde dicha planta se selecciona del grupo constituido por el género de *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.

8. La cromona o mezcla de cromonas para uso según la reivindicación 6, en donde dicha planta se selecciona del grupo constituido por *Acacia catechu, Acacia concinna, Aloe arborescens, Aloe barbadensis, Aloe cremnophila, Aloe ferox, Aloe saponaria, Aloe vera, Aloe vera variedad chinensis, Antidesma membranaceum, Artemisia capillaries, Baeckia frutescens, Epimedium sagittatum, Garcinia dulcis, Hypericum japonicum, Polygonum cuspidatum, Sophora tomen- tosa, y Stephanitis rhododendri.*
9. La cromona o mezcla de cromonas para uso según la reivindicación 6, en donde dicha planta se selecciona del grupo constituido por tallos, cortezas de tallos, troncos, cortezas de troncos, ramillas, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes tiernos, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas.
10. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición de la cromona está comprendida de 0,01 % a 100 % de cromona.
11. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición es administrada en una dosis seleccionada de 0,01 a 500 mg/kg de peso corporal.
12. La cromona o mezcla de cromonas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las rutas de administración se seleccionan del grupo constituido por administración oral, tópica, en supositorios, intravenosa, intradérmica, intragástrica, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa en una fórmula farmacéutica apropiada.
13. Una composición que comprende gel en polvo de Aloe o gel en polvo de la hoja entera de Aloe y 1-10 % (en peso) de una o más cromonas; en donde dicha composición está esencialmente exenta de antraquinonas y en donde dicho gel de Aloe se aísla de una planta seleccionada de *Aloe barbadensis* o *Aloe vera*; y en donde dichas una o más cromonas se aíslan de *Aloe ferox*.
14. Un método para preparar una composición constituida por gel en polvo de Aloe o por gel en polvo de la hoja entera de Aloe y una mezcla de una o más cromonas, comprendiendo dicho método:
- preparar una composición comprendida de una mezcla de una o más cromonas, en donde dicha composición de una o más cromonas es sustancialmente pura y está esencialmente exenta de antraquinonas; y
 - combinar dicha composición de la etapa a) con gel en polvo de Aloe o gel en polvo de la hoja entera de Aloe en una proporción de 1-10 % (en peso) de dicha mezcla de cromonas y 90-99 % (en peso) de gel en polvo de Aloe o gel en polvo de la hoja entera de Aloe.

30

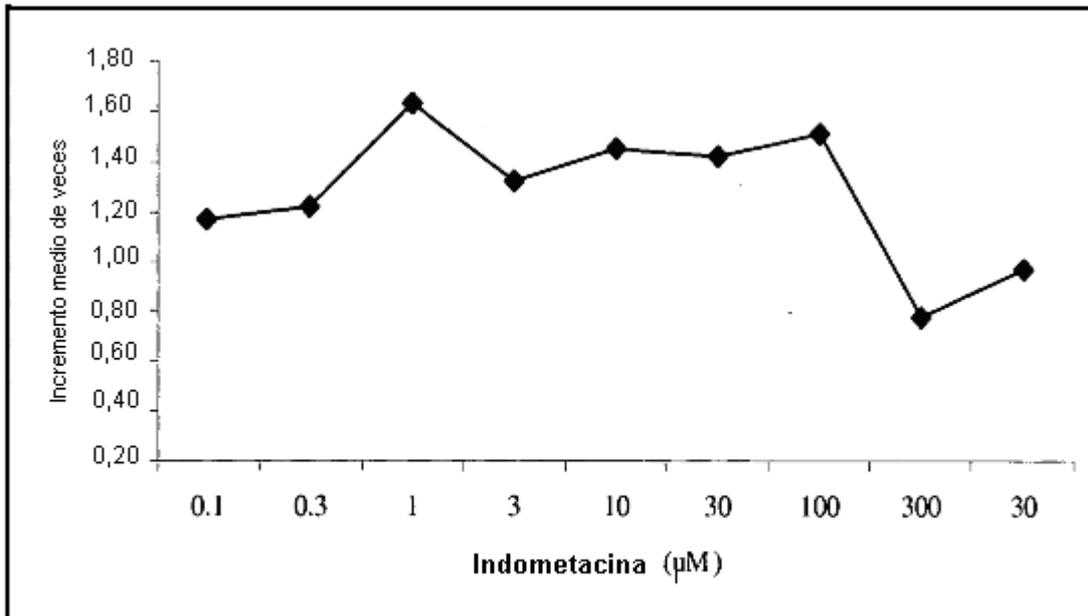


Figura 1

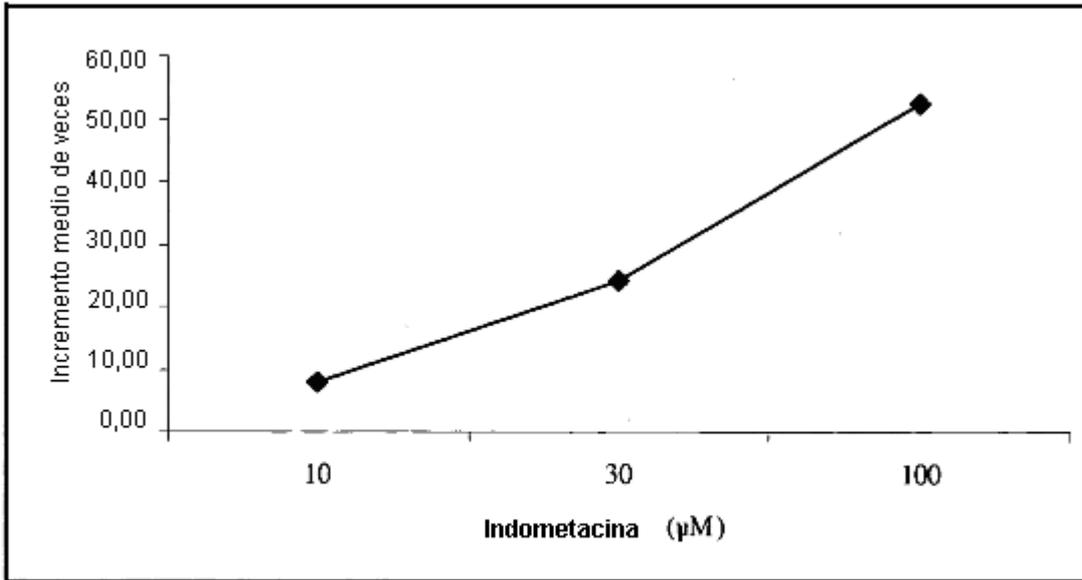


Figura 1B

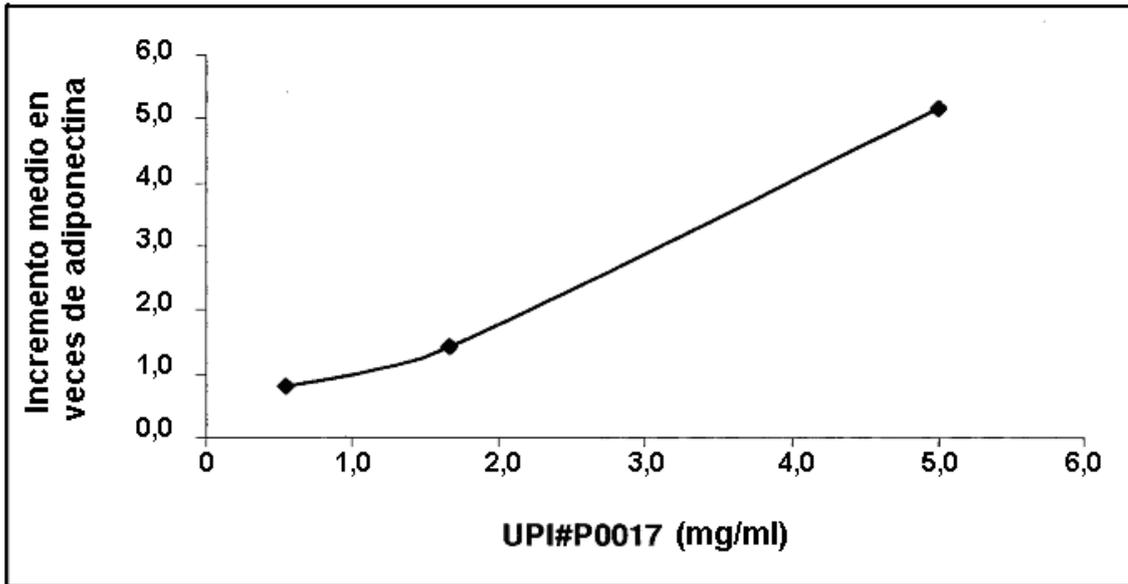


Figura 2

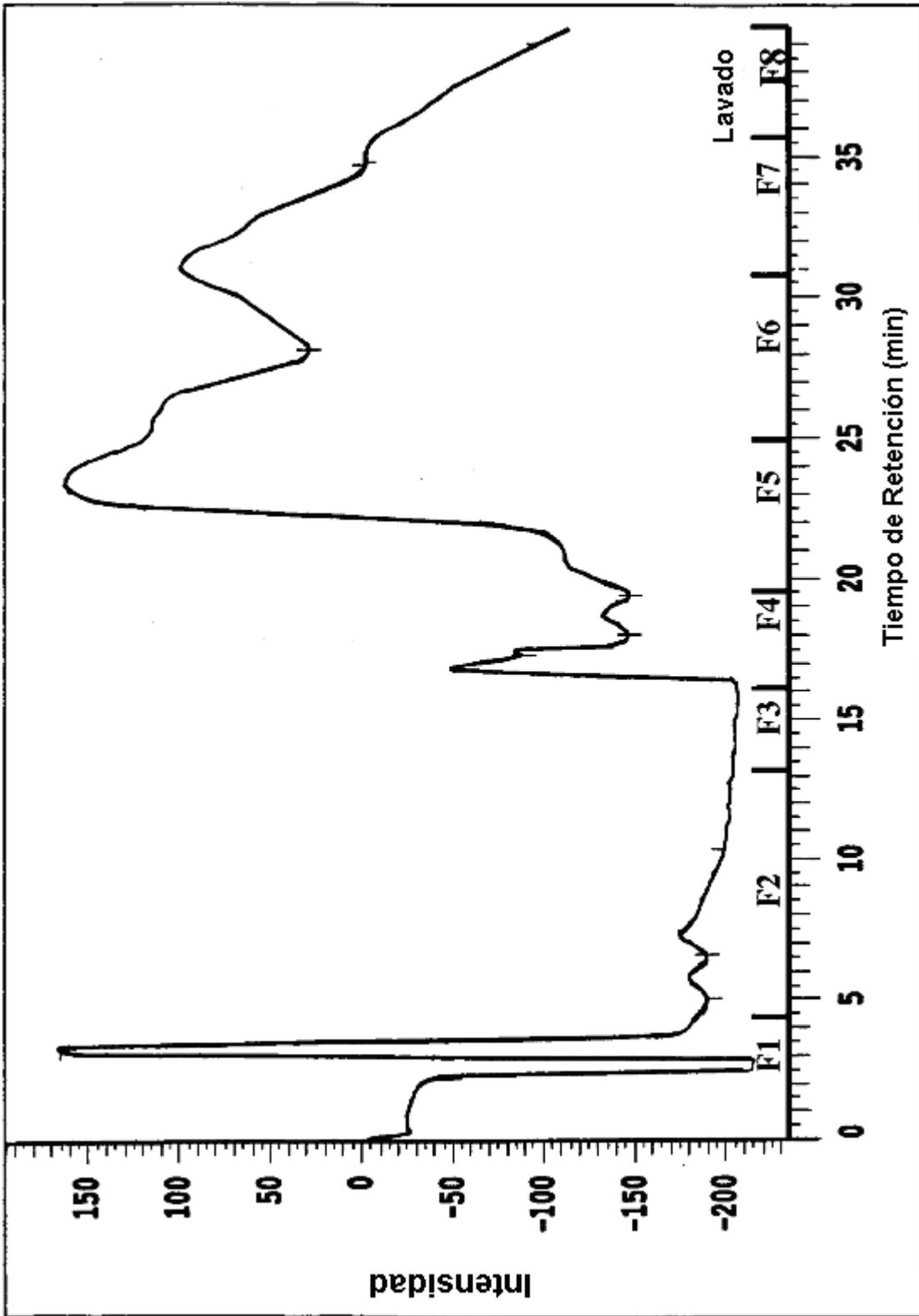


Figura 3

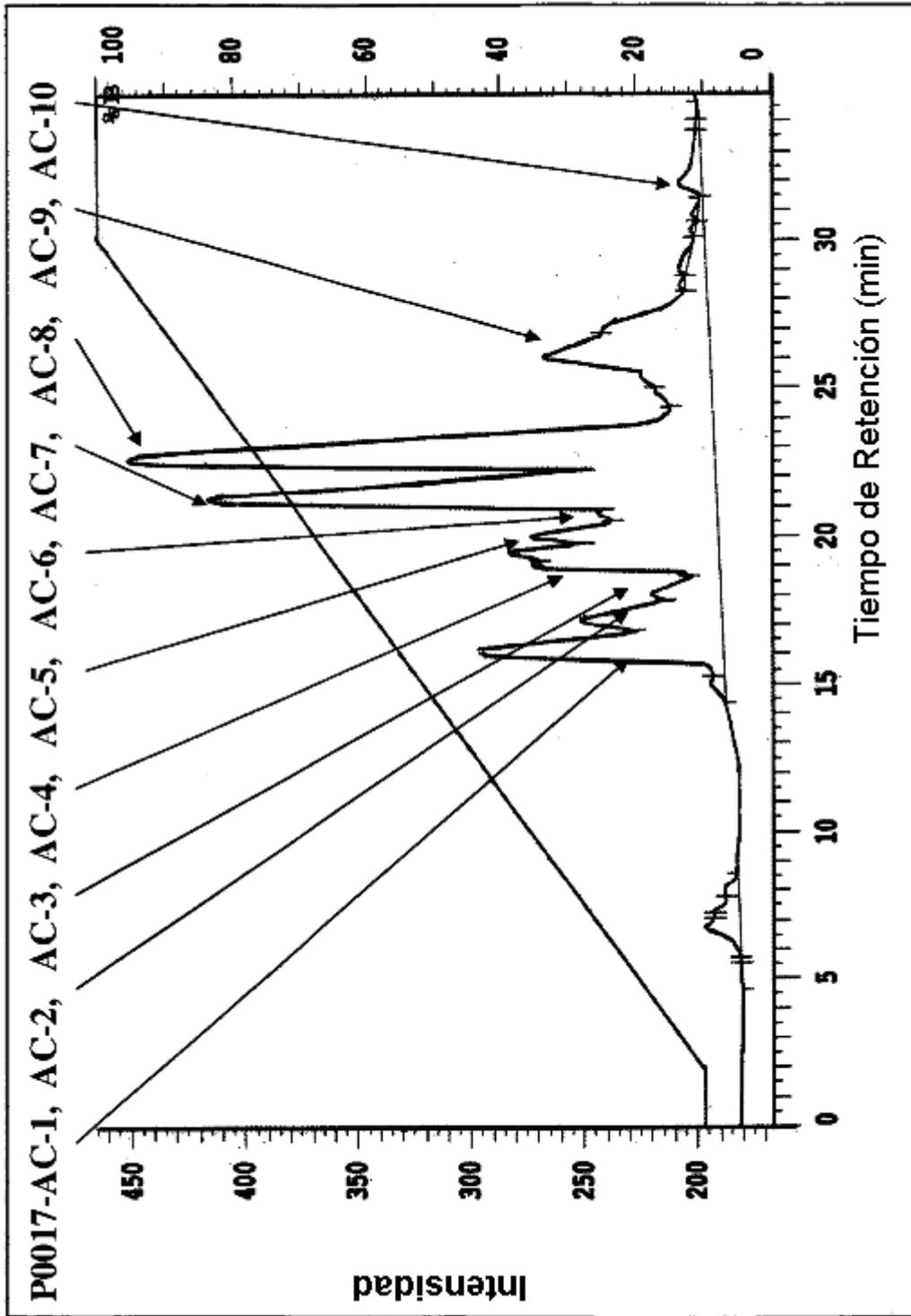


Figura 4

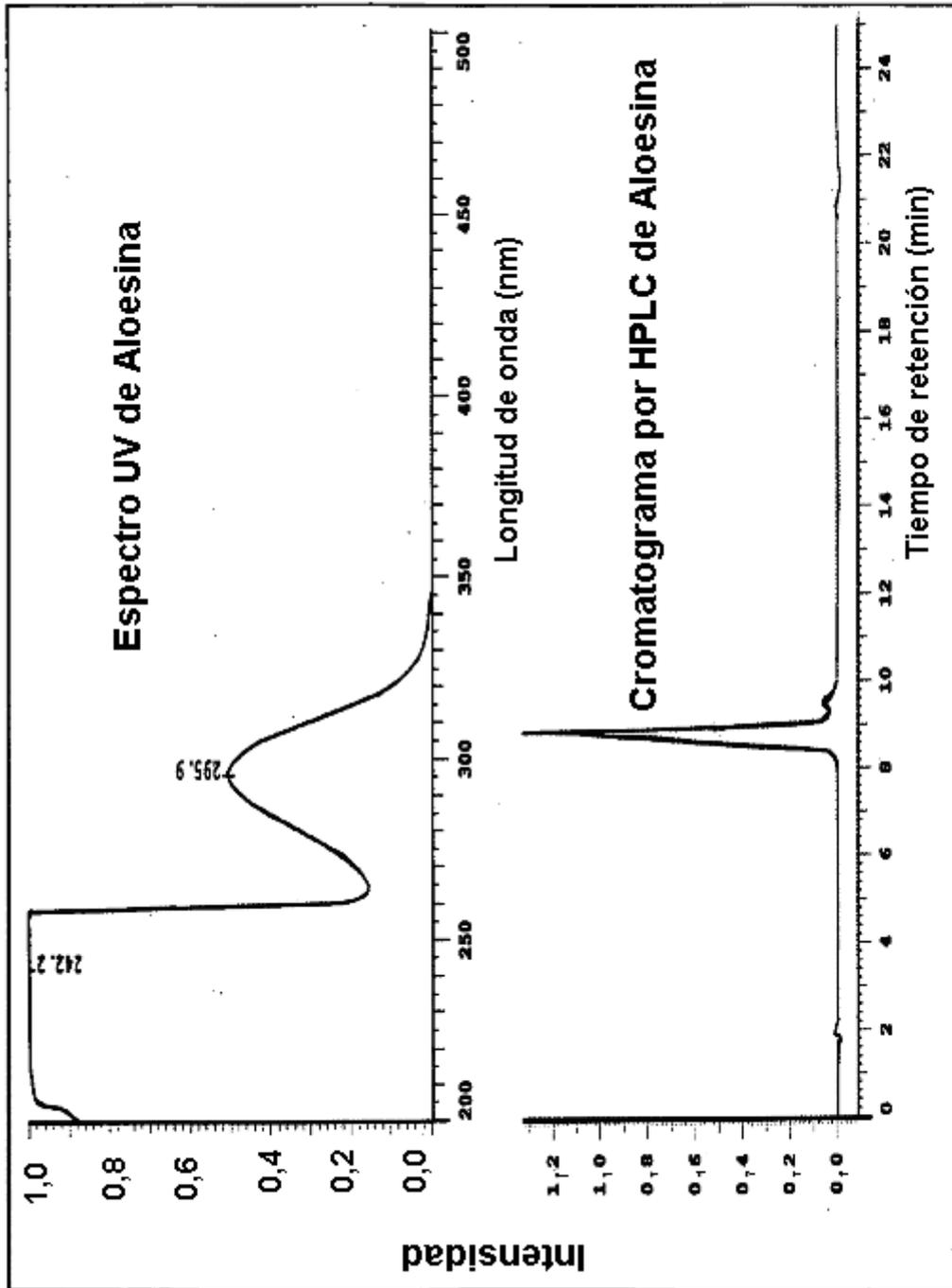


Figura 5

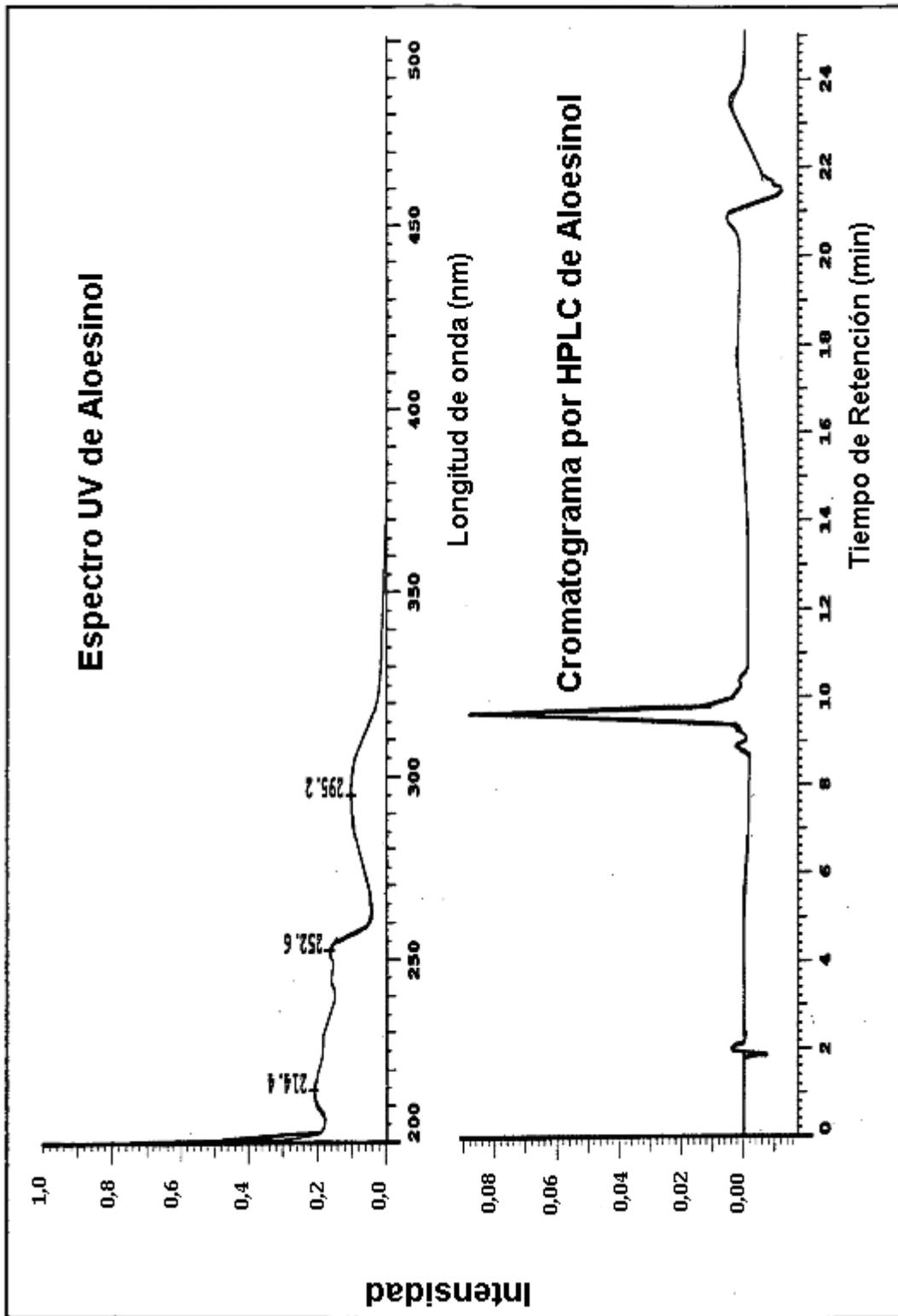


Figura 6

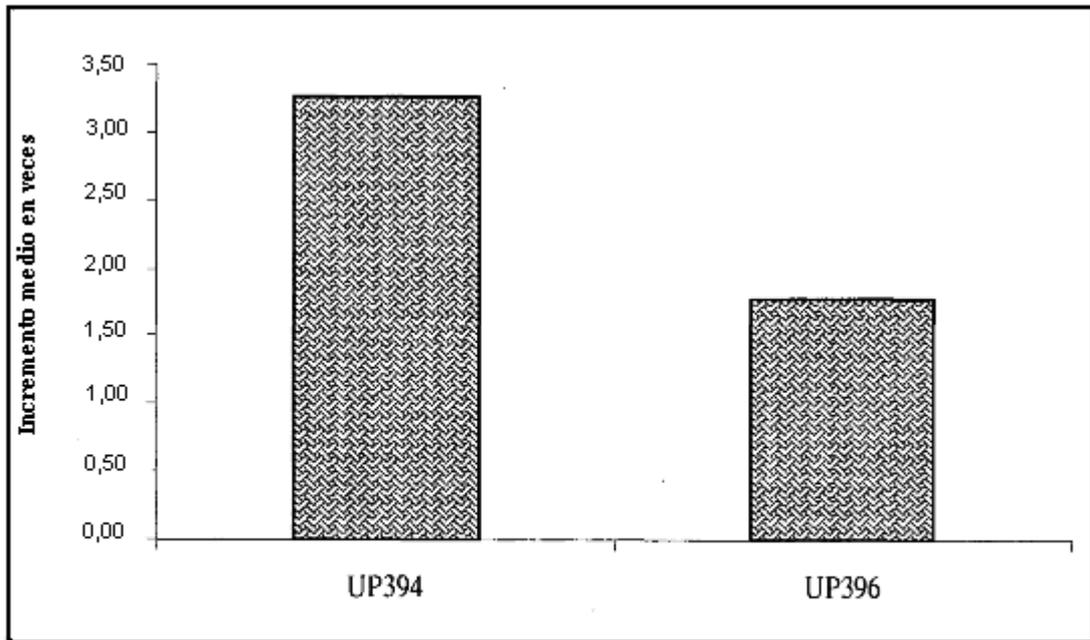


Figura 7

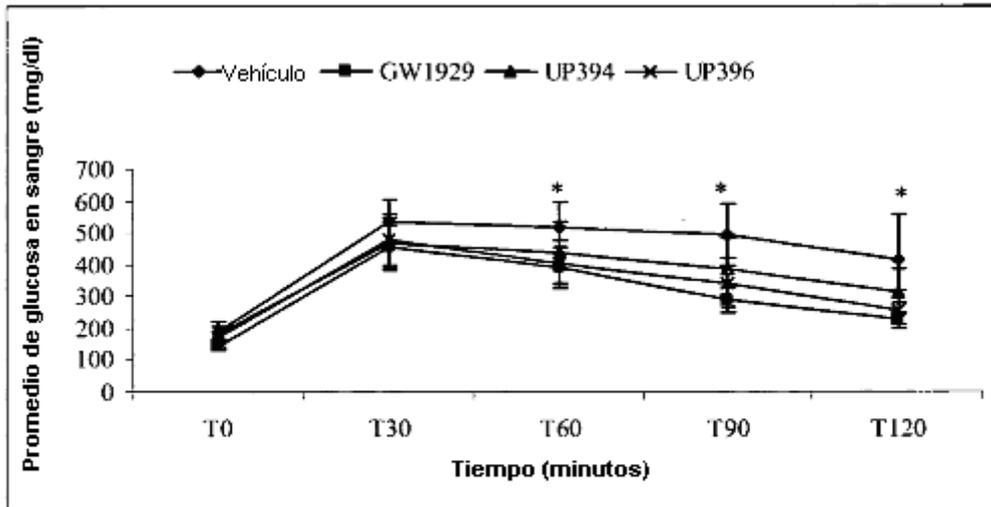


Figura 8A

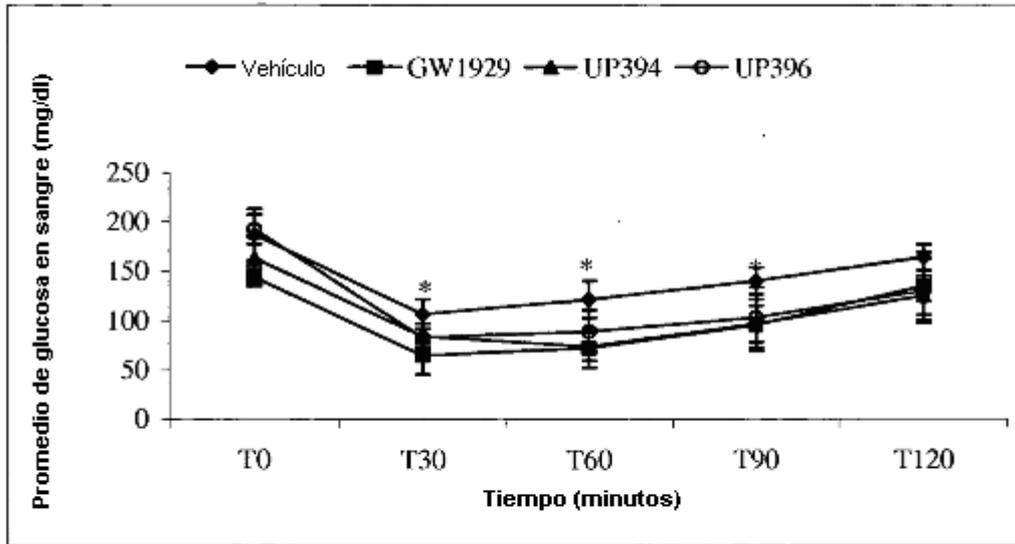


Figura 8B

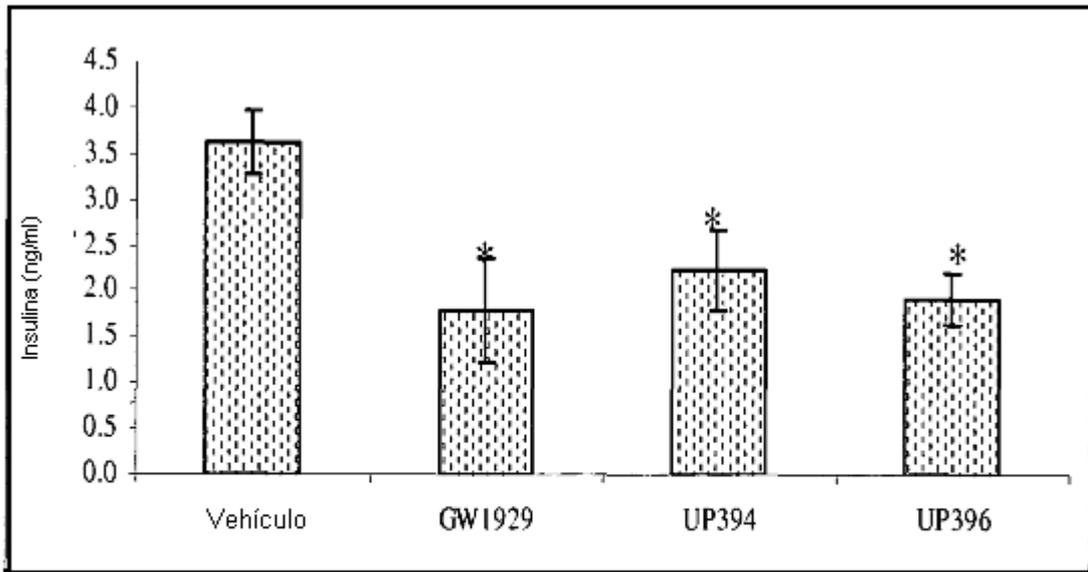


Figura 9

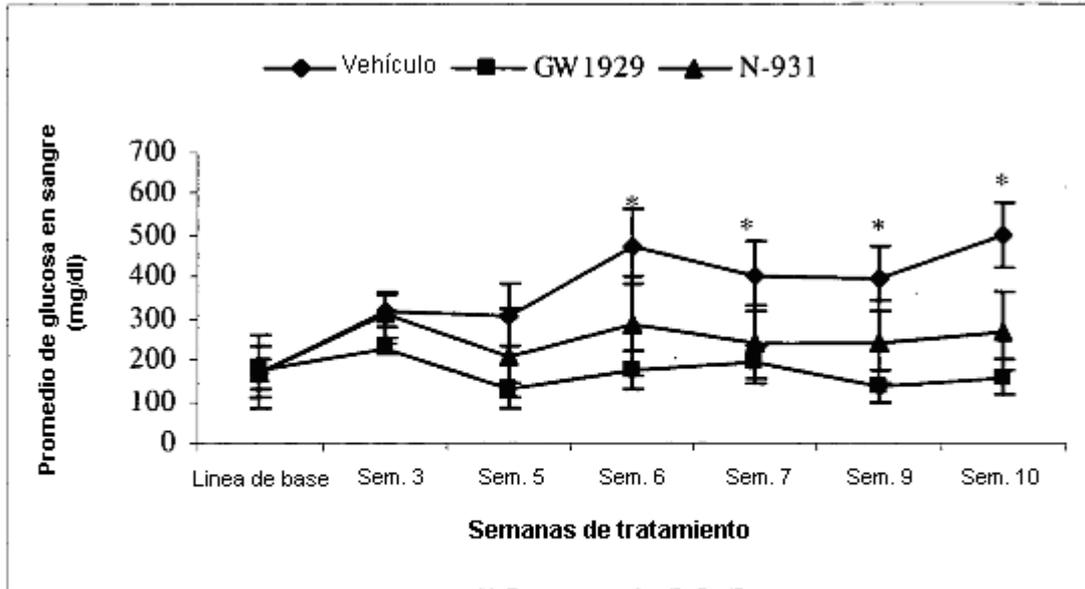


Figura 10

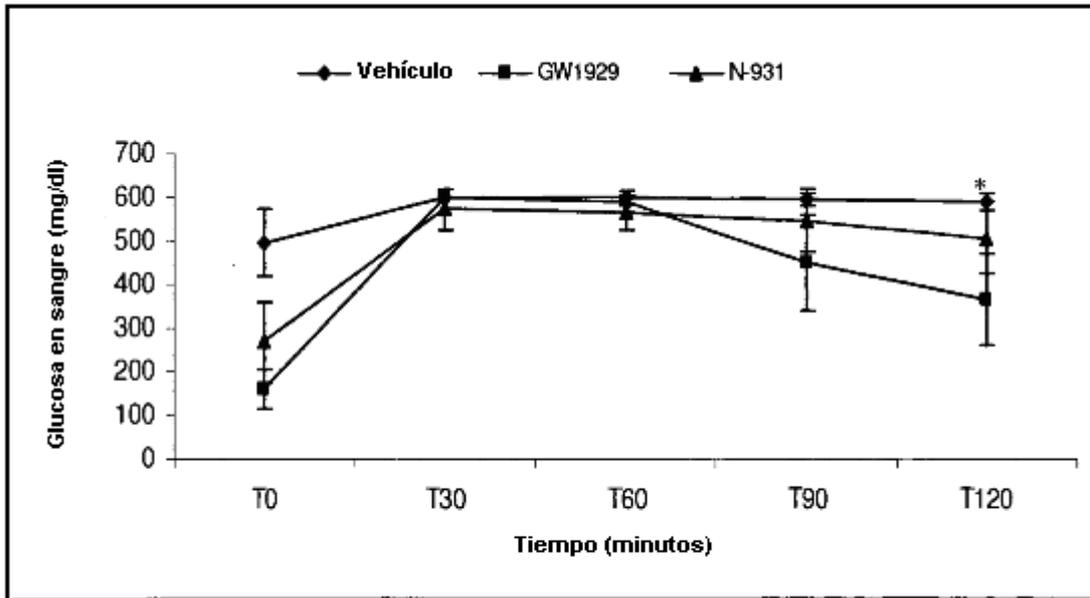


Figura 11A

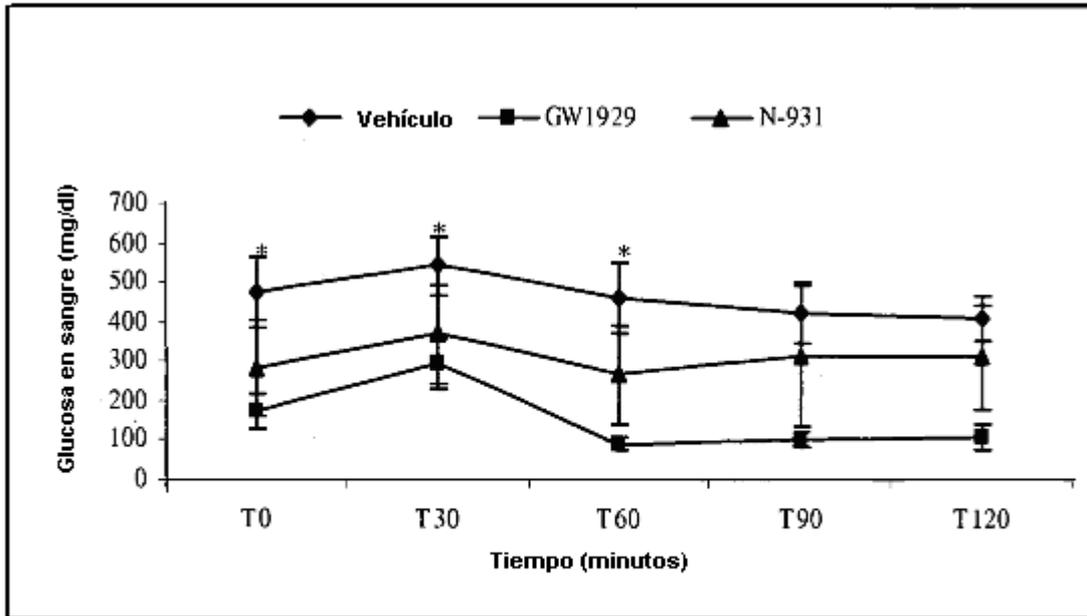


Figura 11B

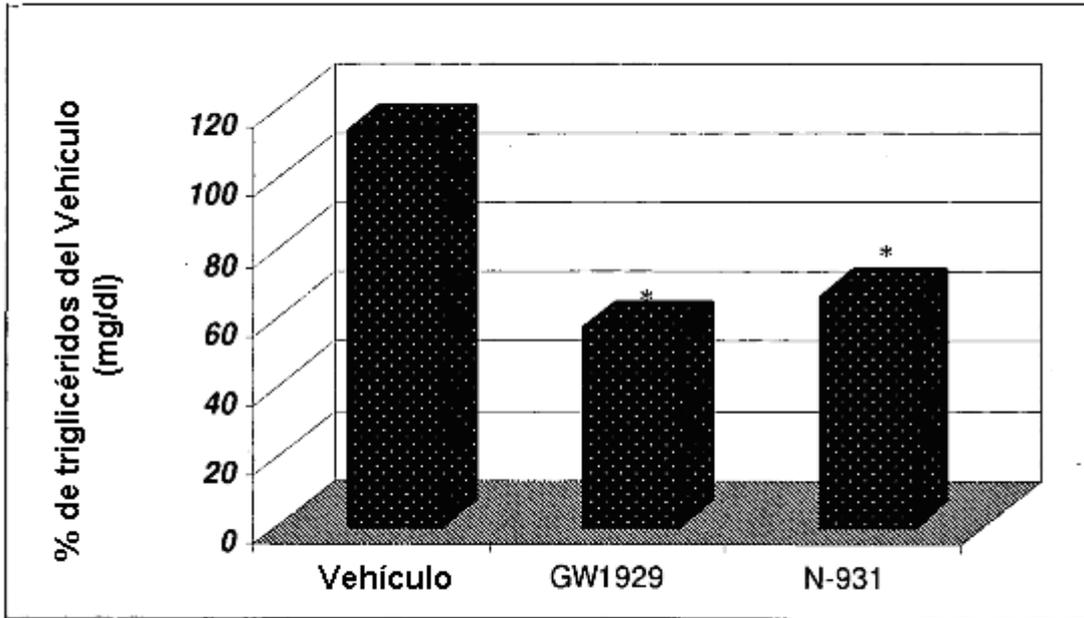


Figura 12

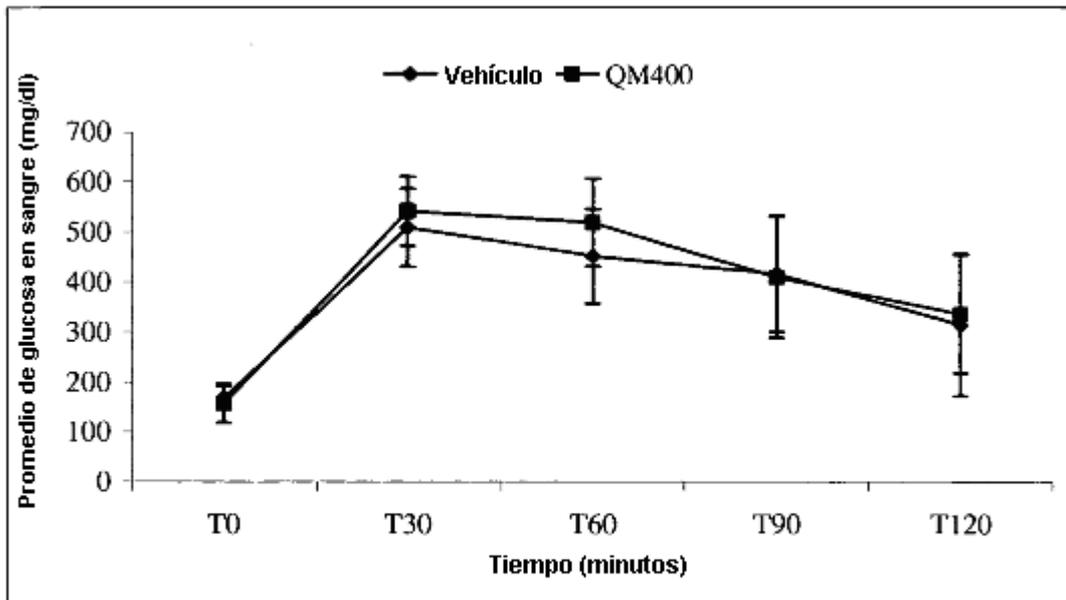


Figura 13A

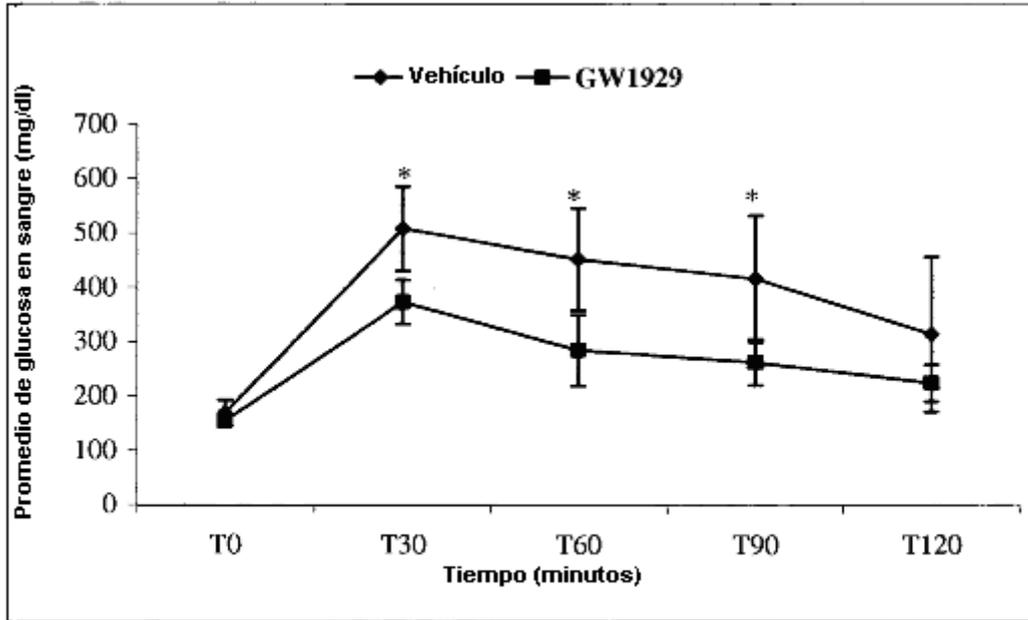


Figura 13B

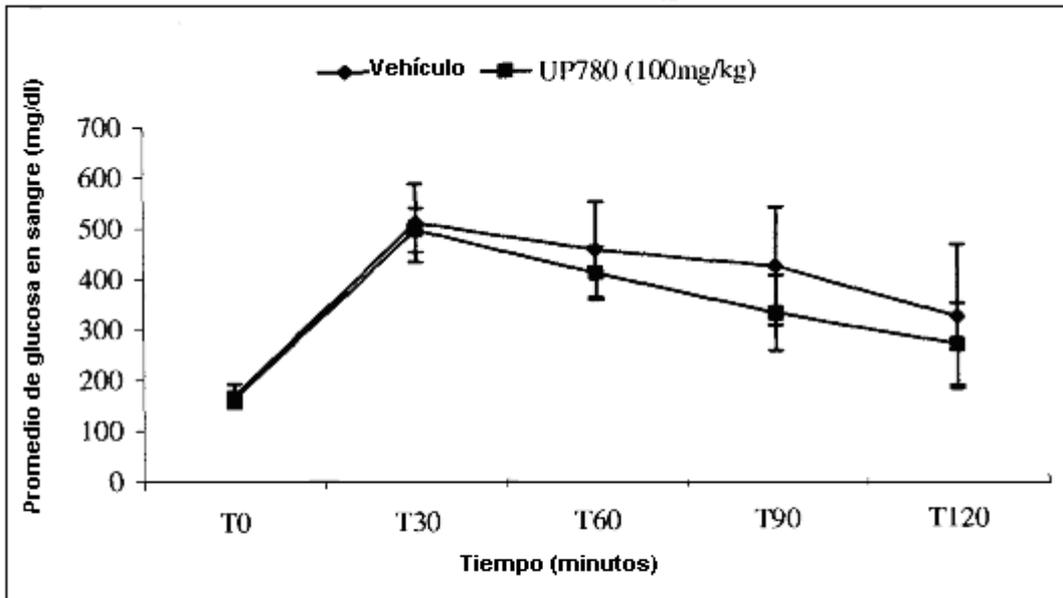


Figura 13C

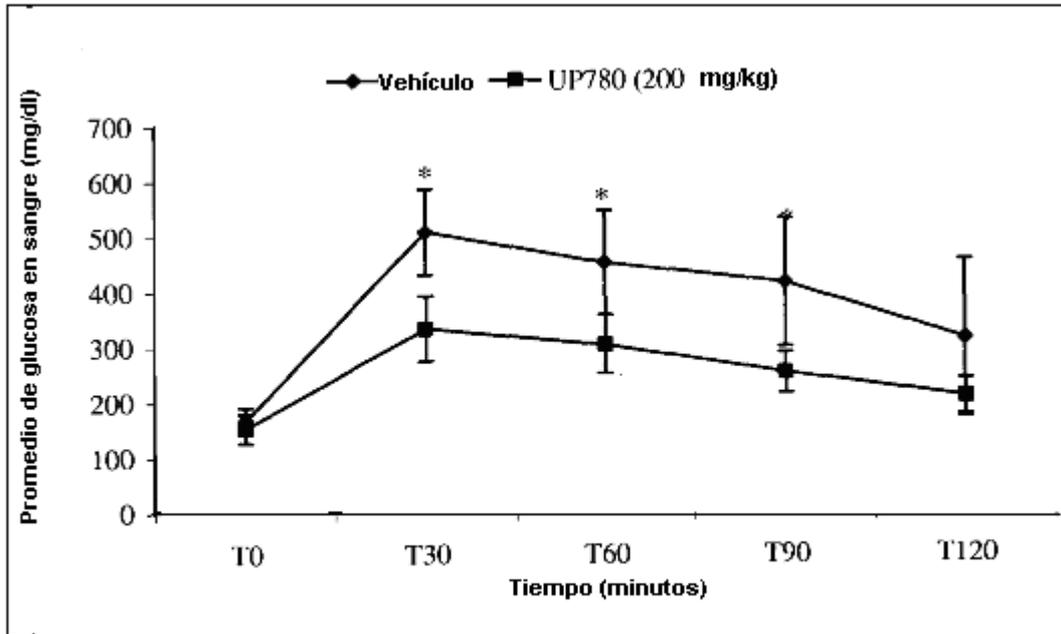


Figura 13D

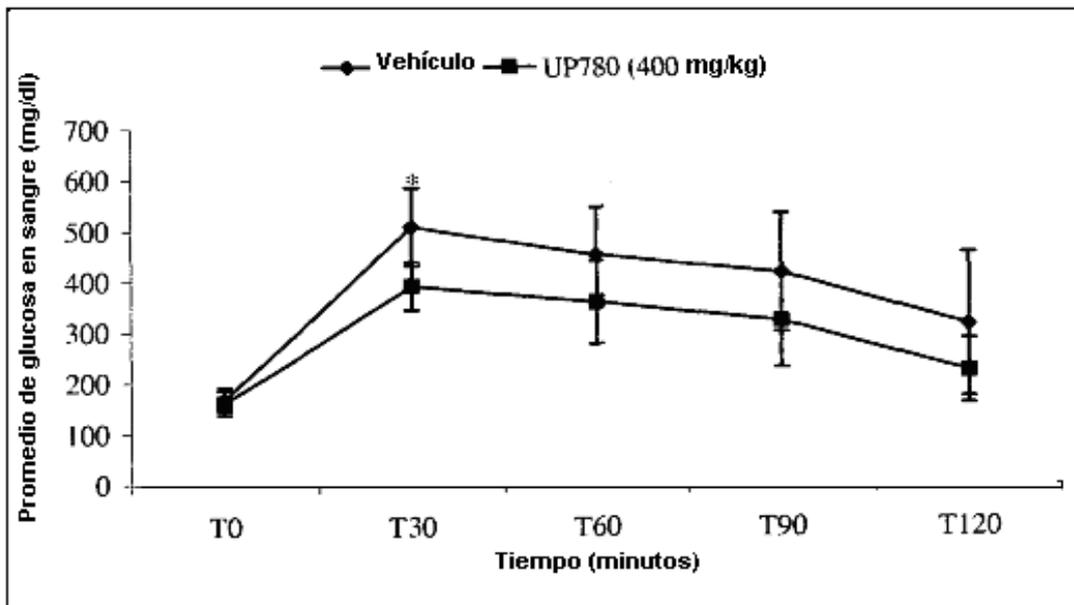


Figura 13E

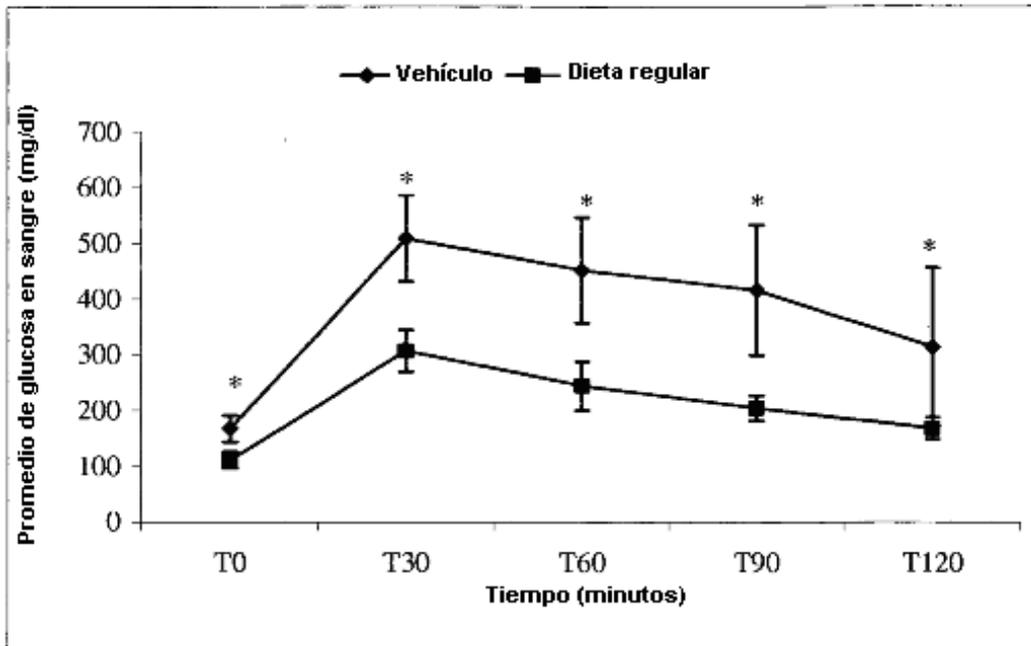


Figura 13F

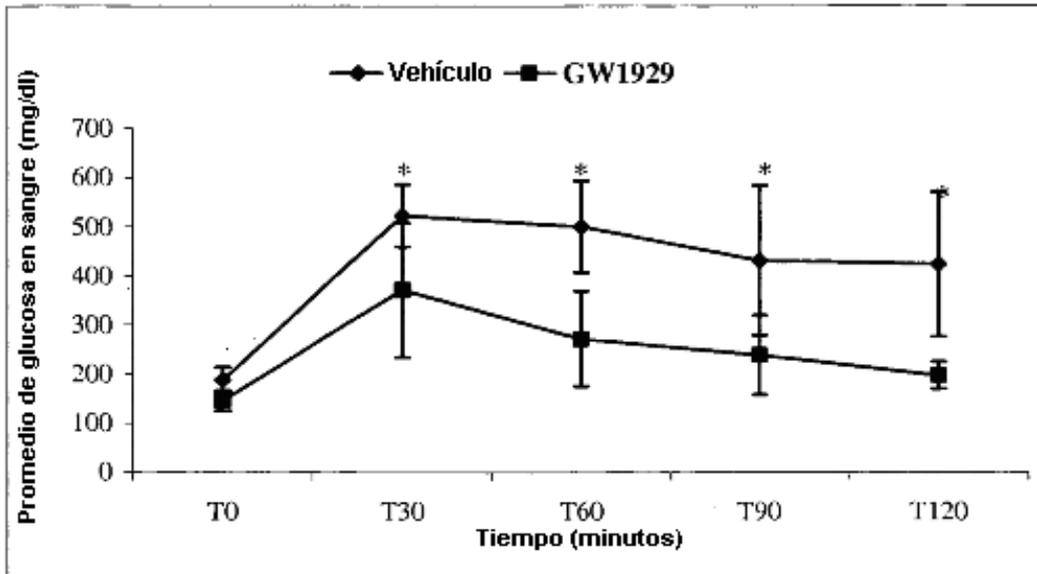


Figura 14A

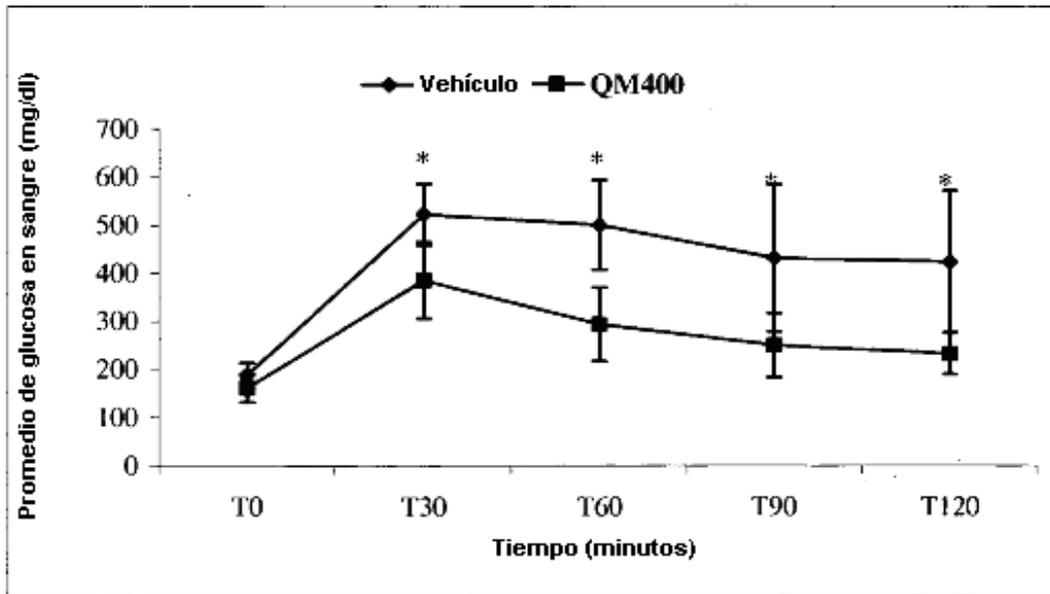


Figura 14B

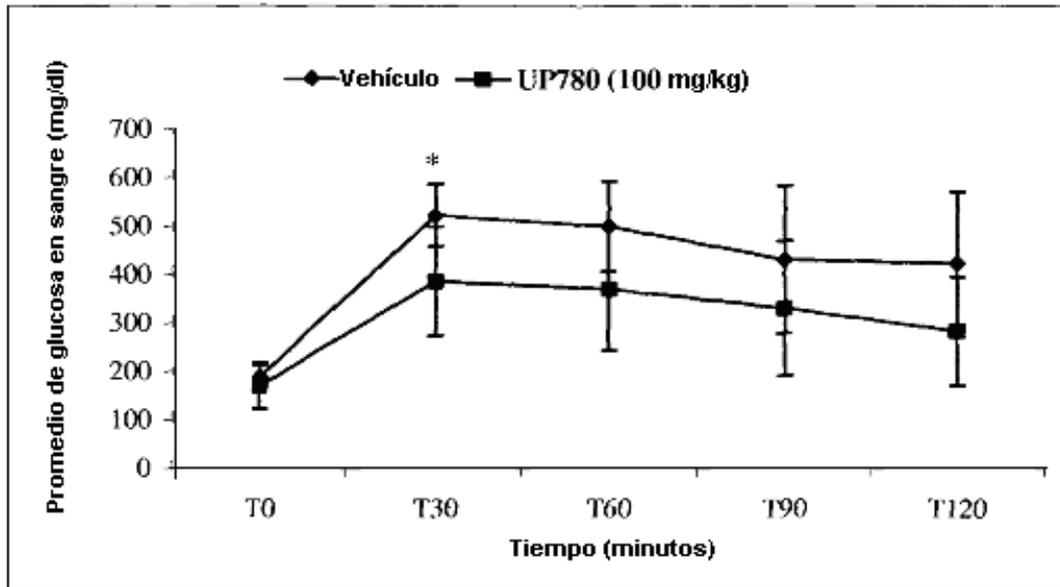


Figura 14C

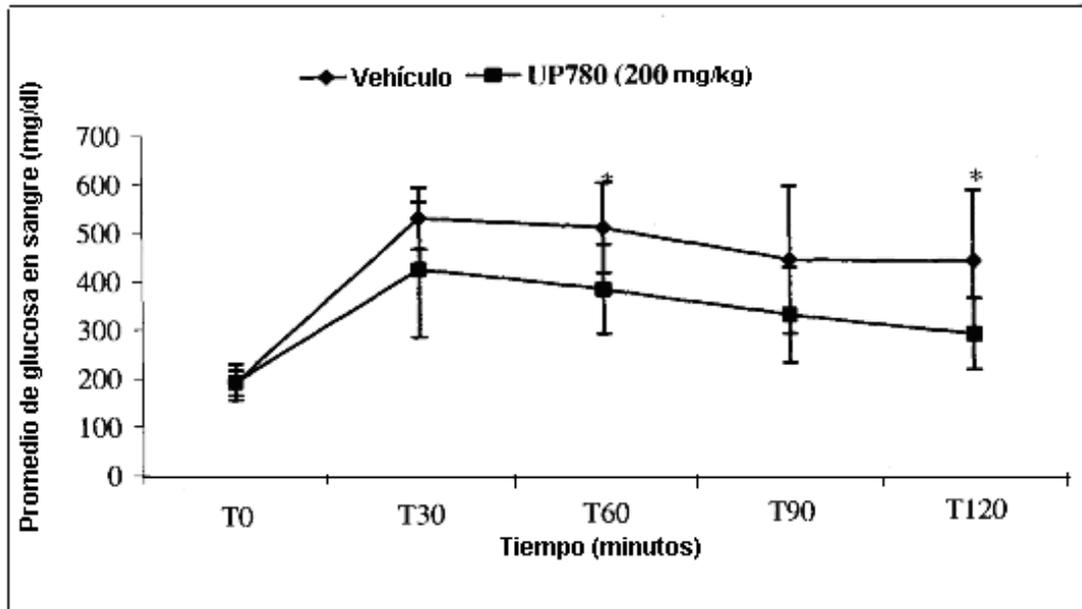


Figura 14D

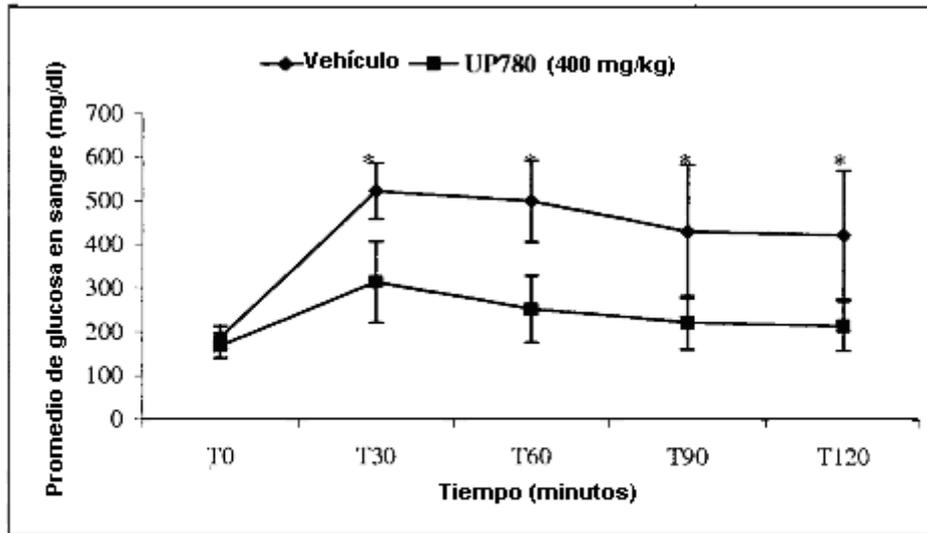


Figura 14E

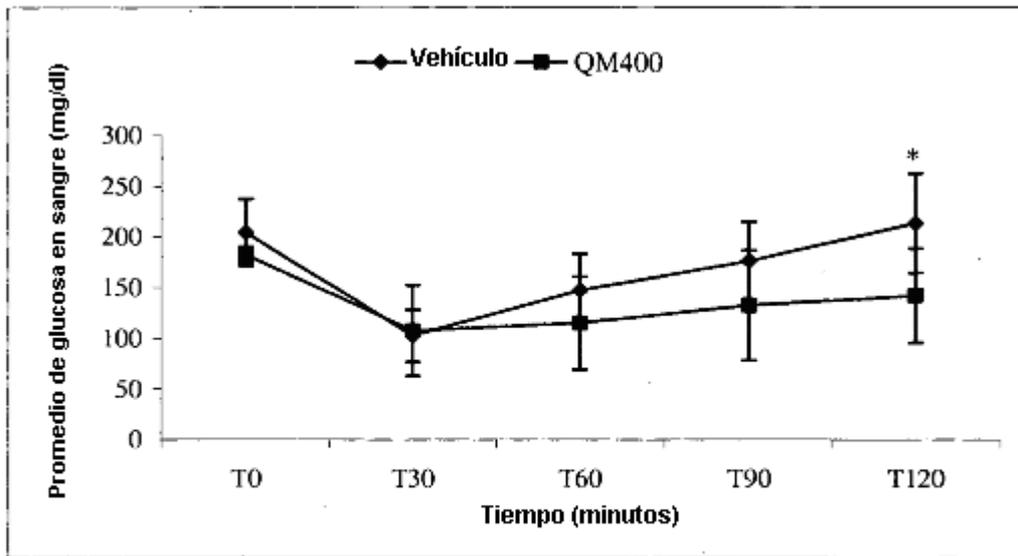


Figura 15A

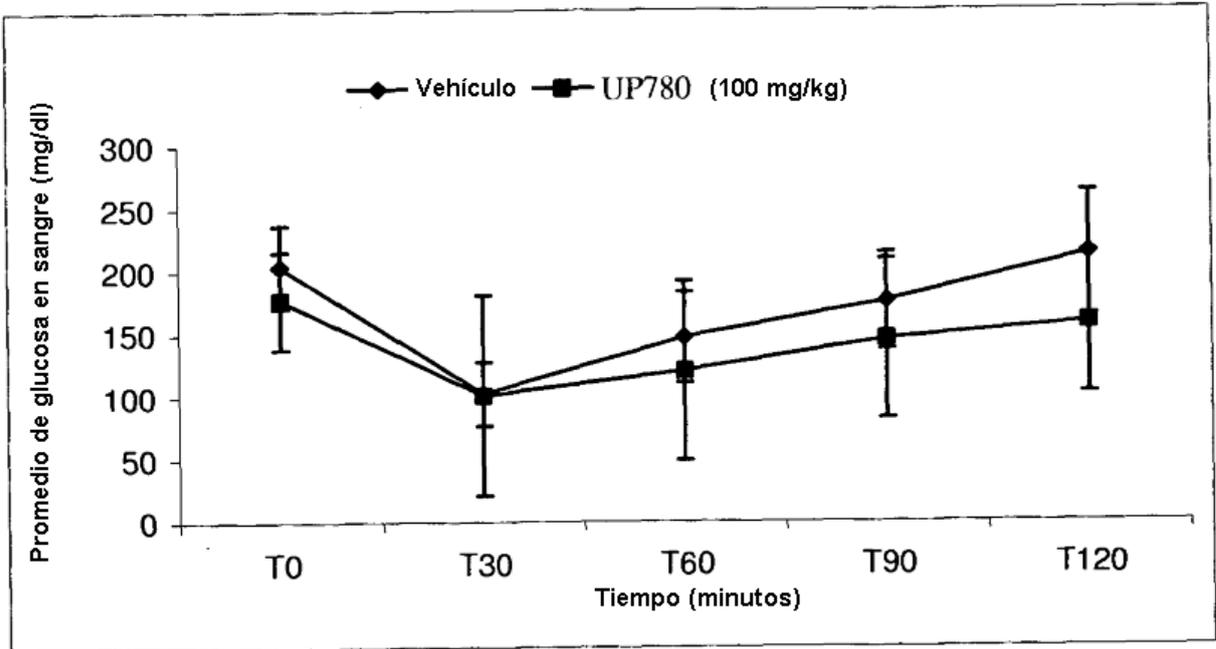


Figura 15B

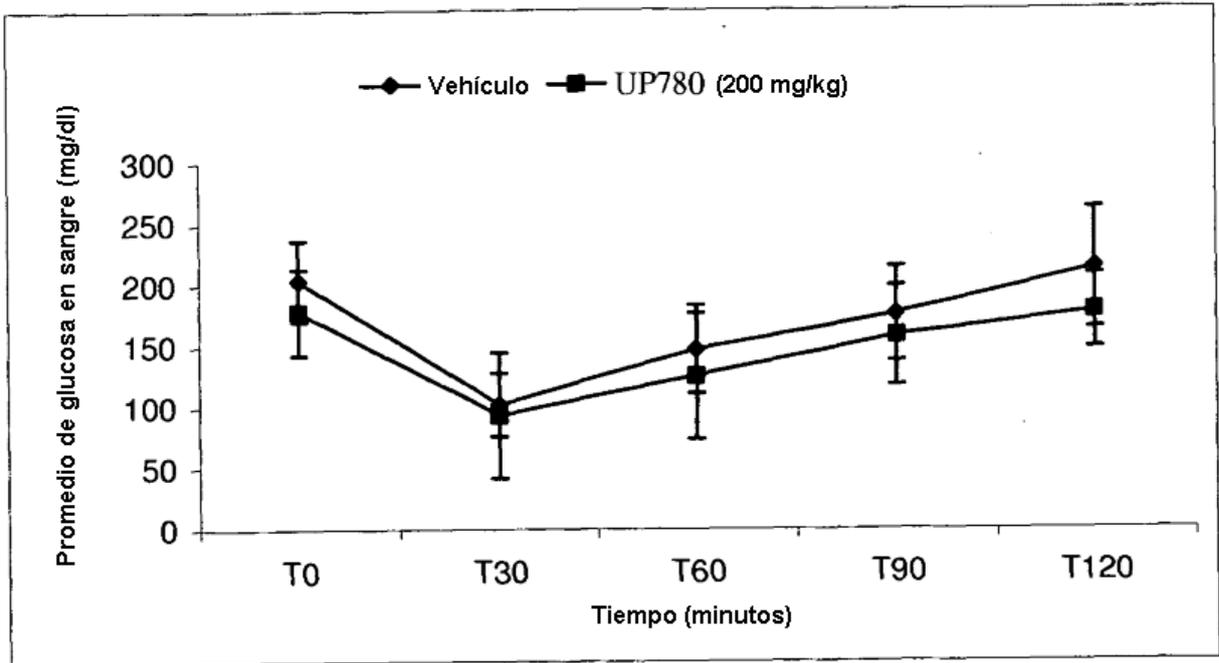


Figura 15C

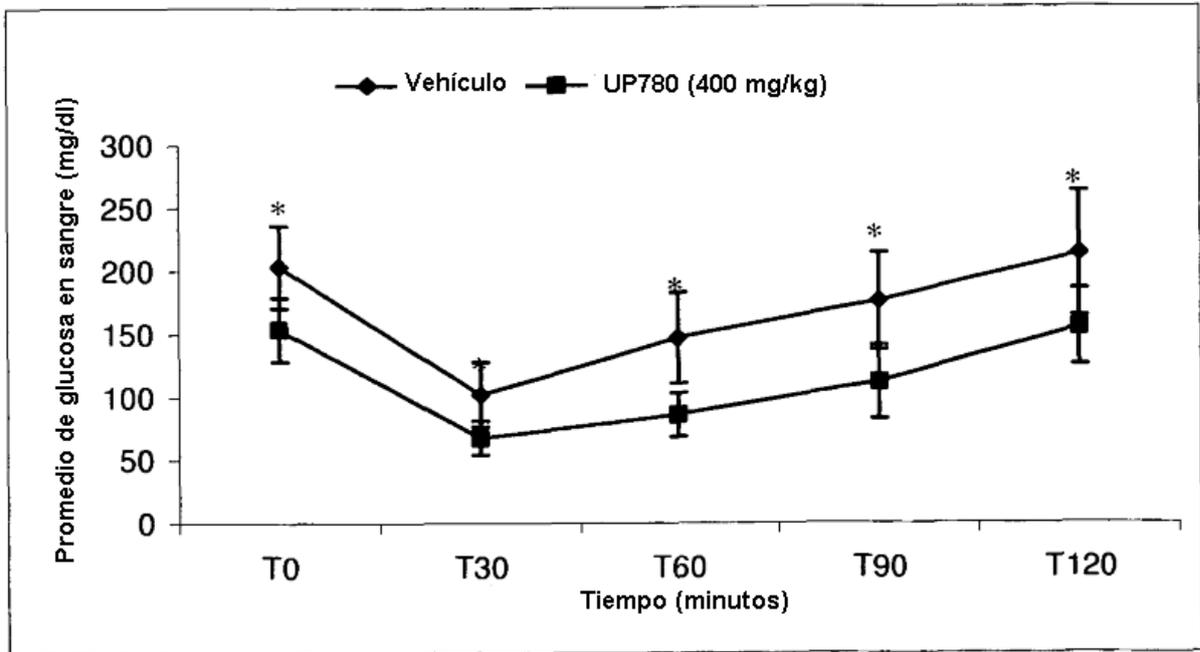


Figura 15D

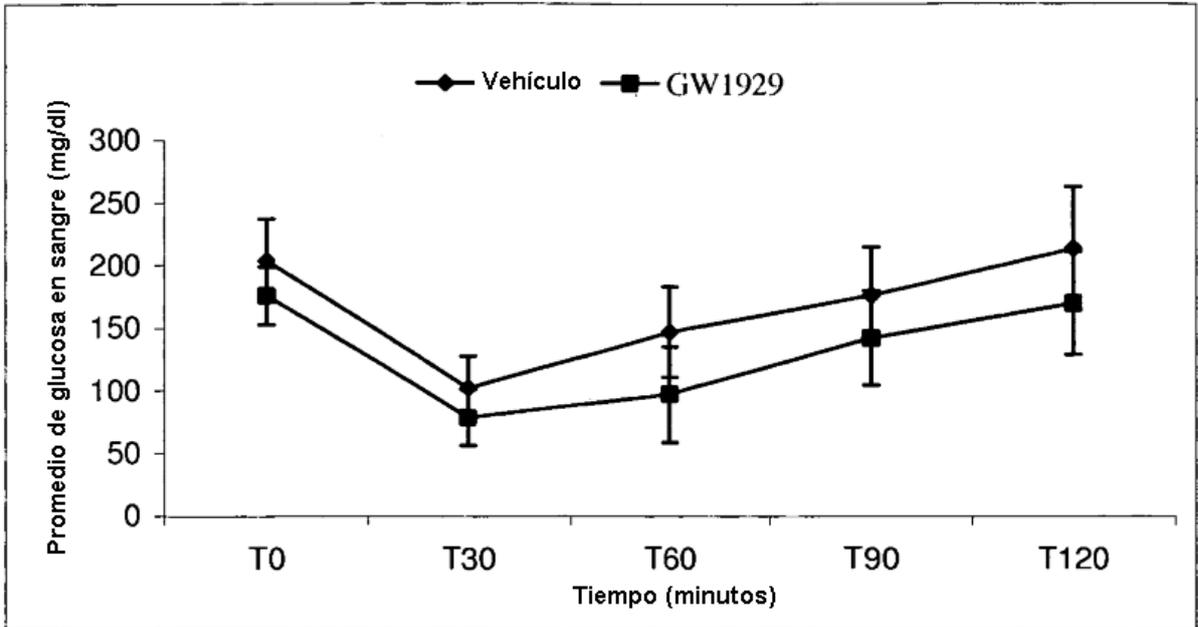


Figura 15E

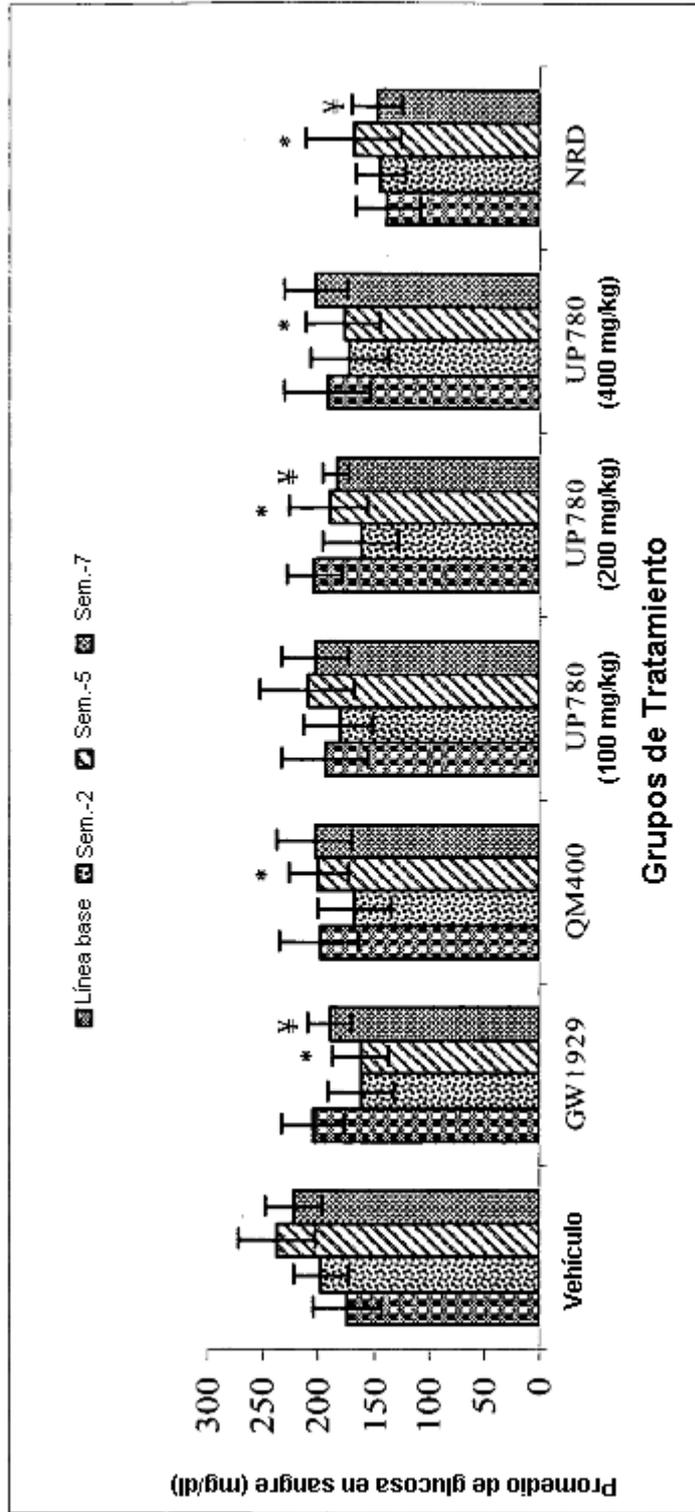


Figura 16

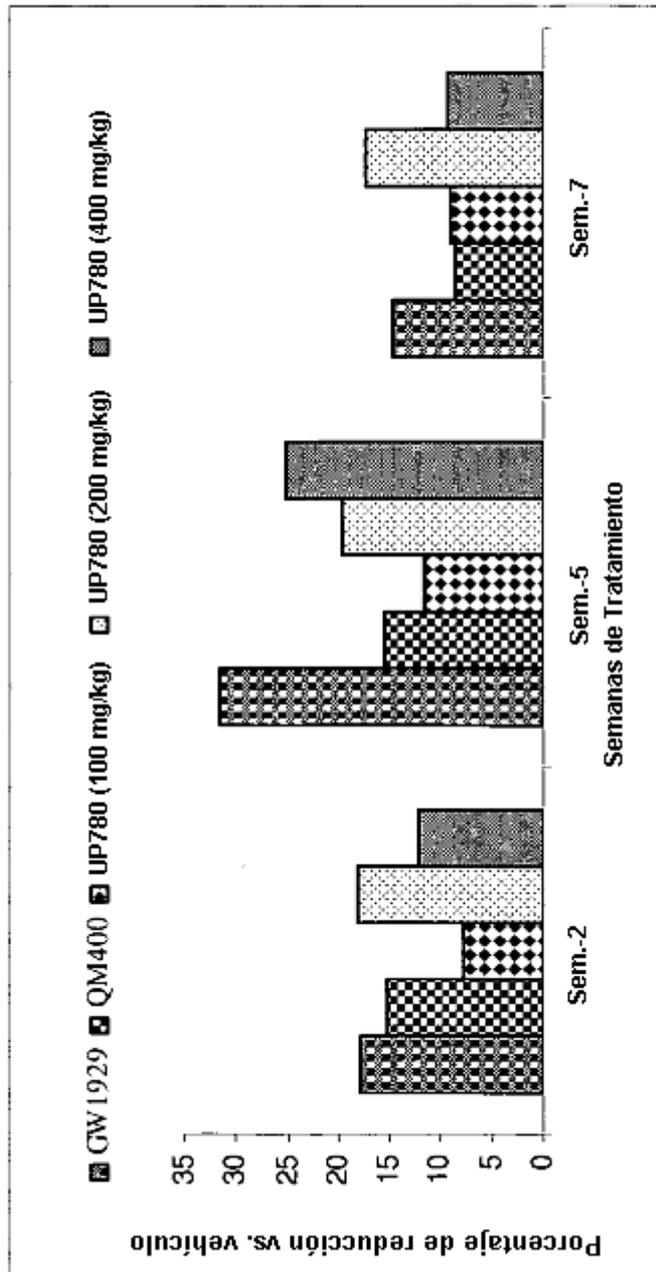


Figura 17

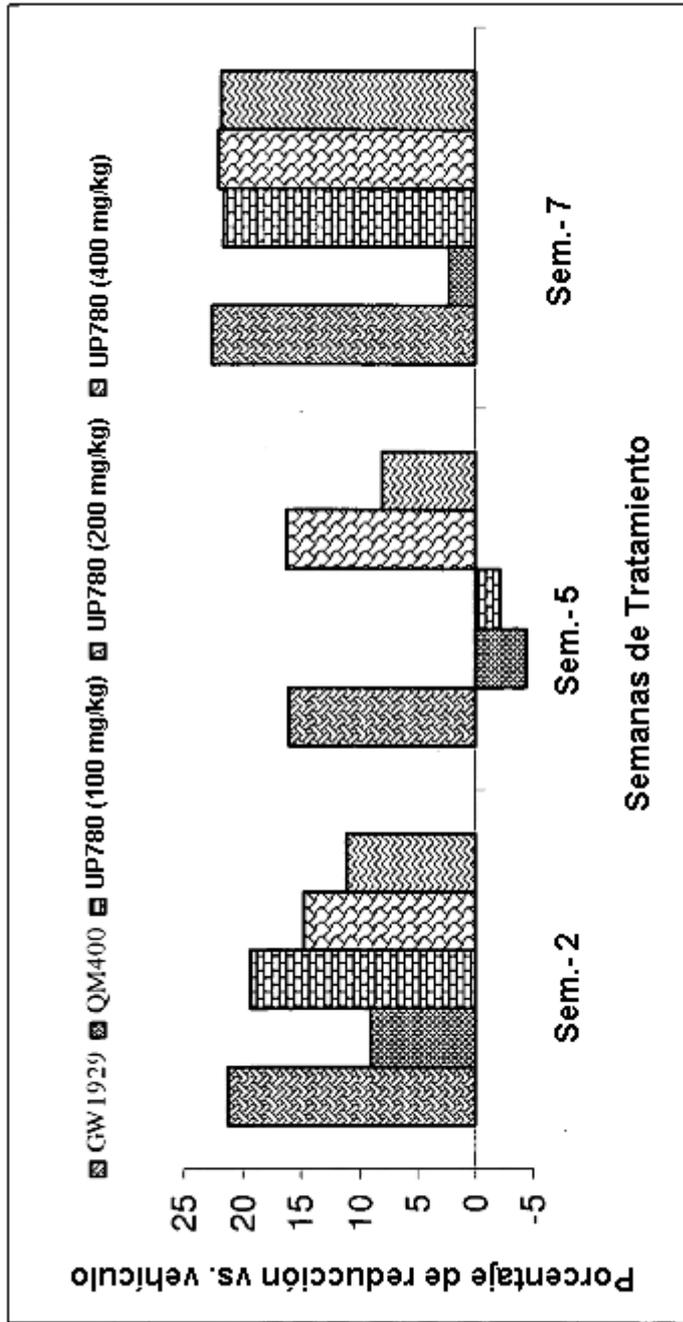


Figura 18

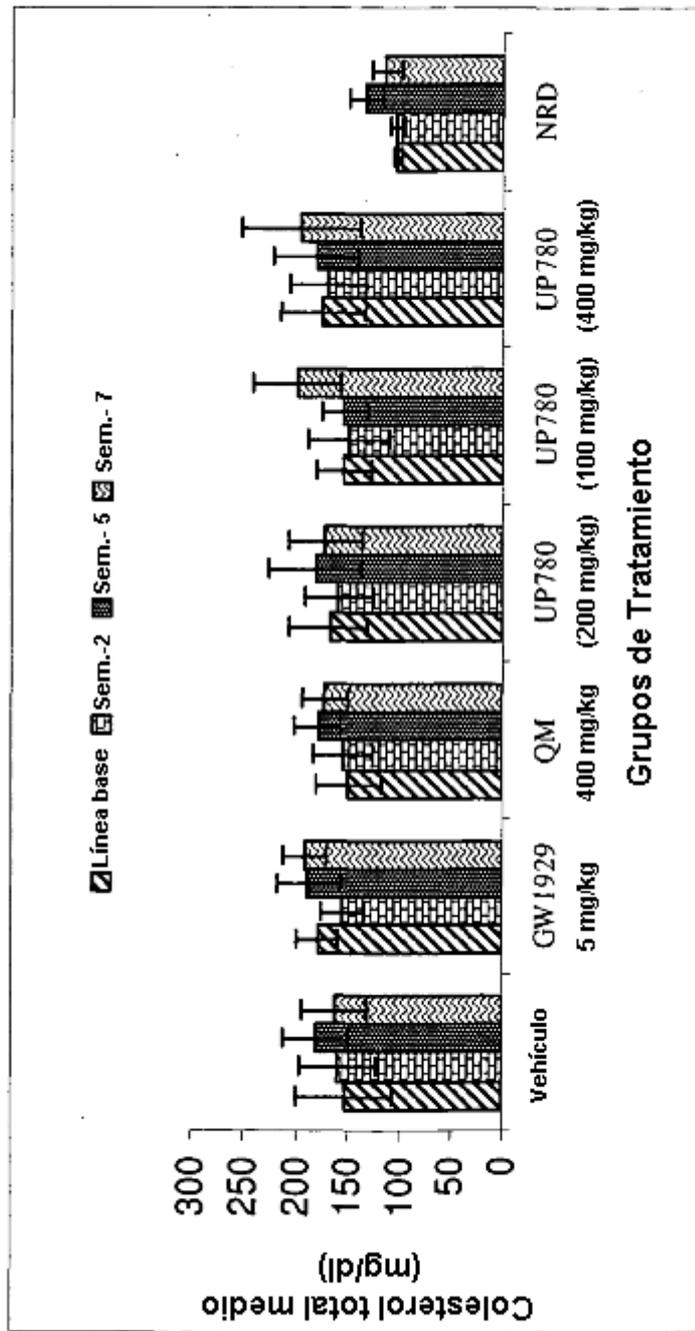


Figura 19

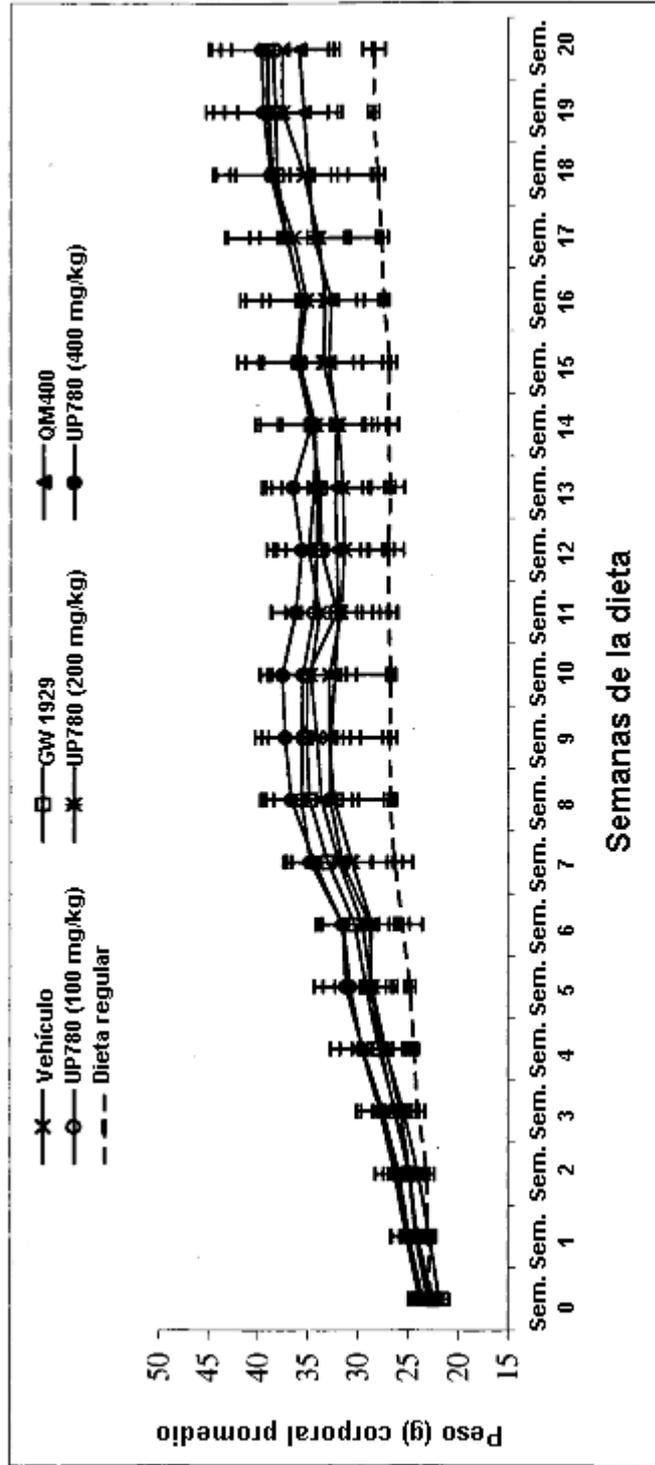


Figura 20

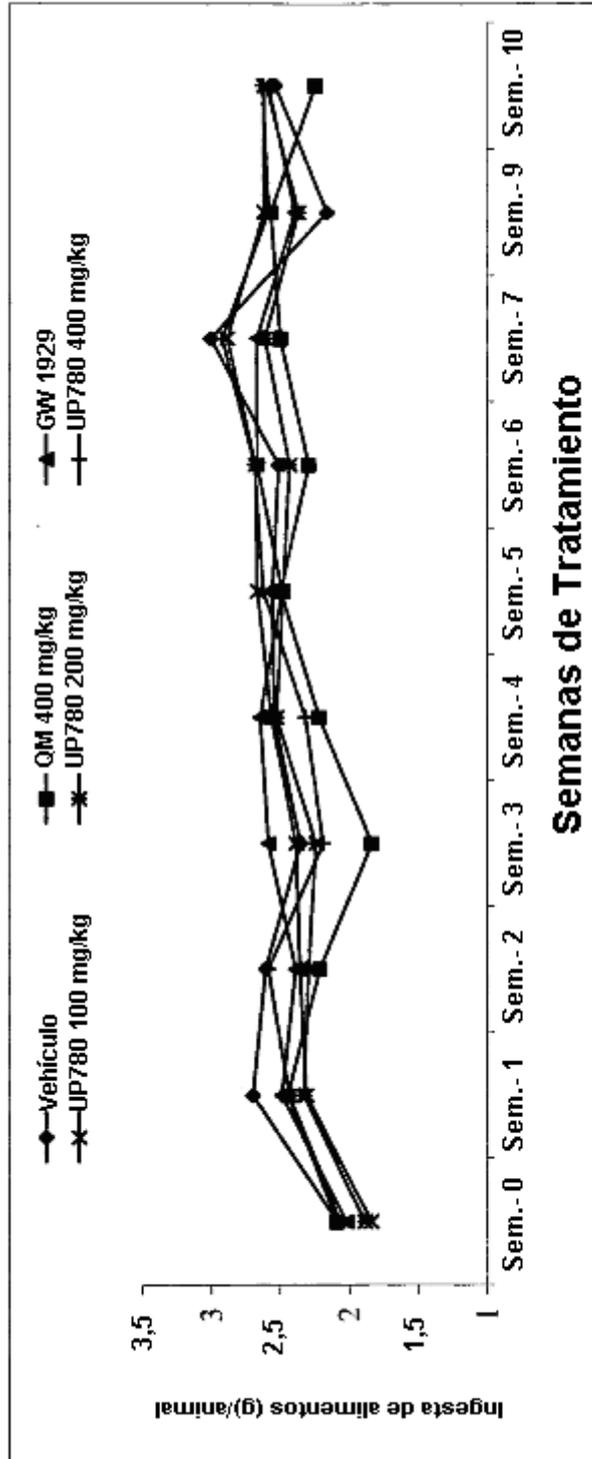


Figura 21

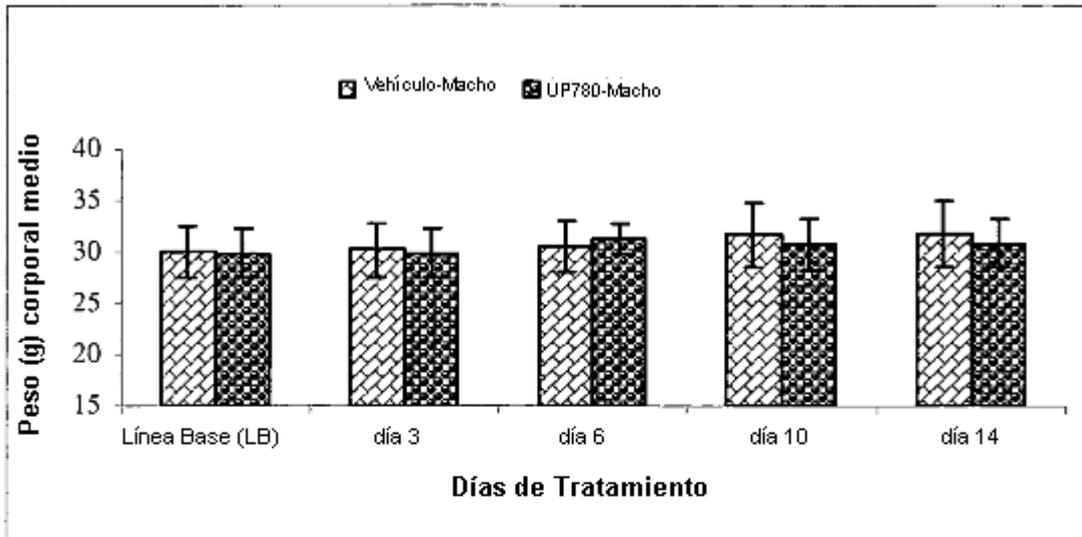


Figura 22A

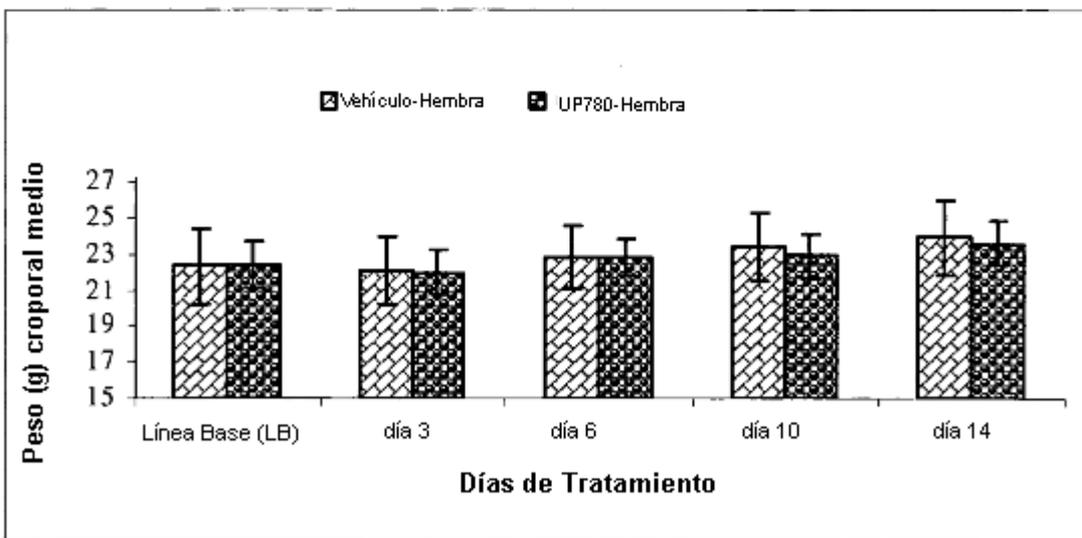


Figura 22B

Figura 23A

737 Genes Significativos por el procedimiento Bonferroni Secuencial de Holm

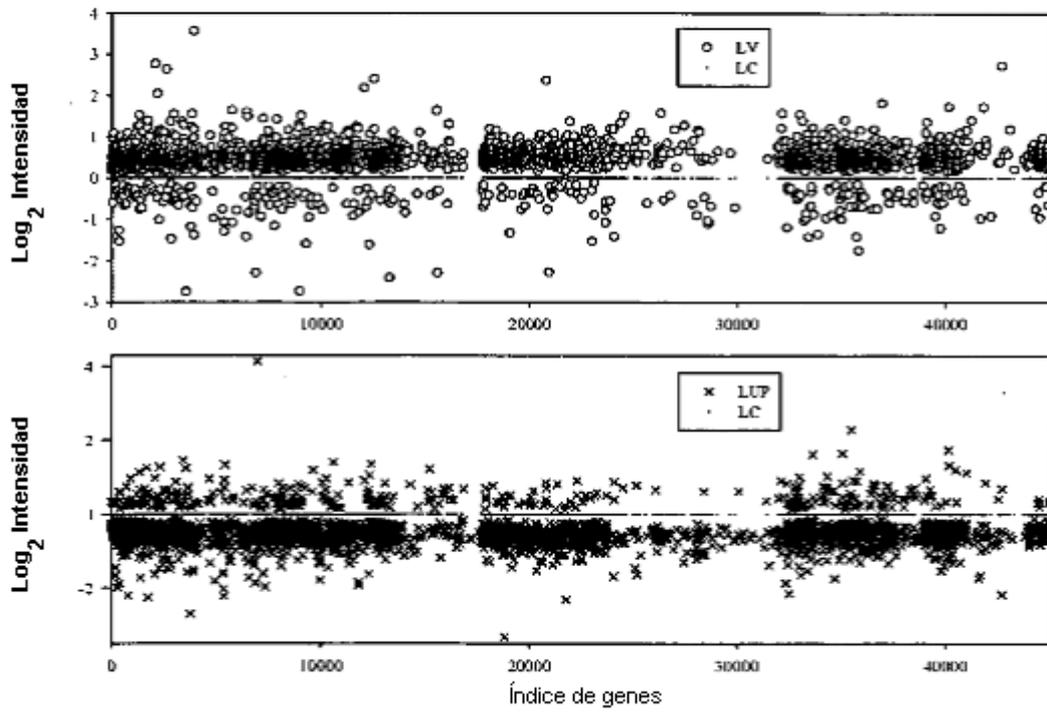
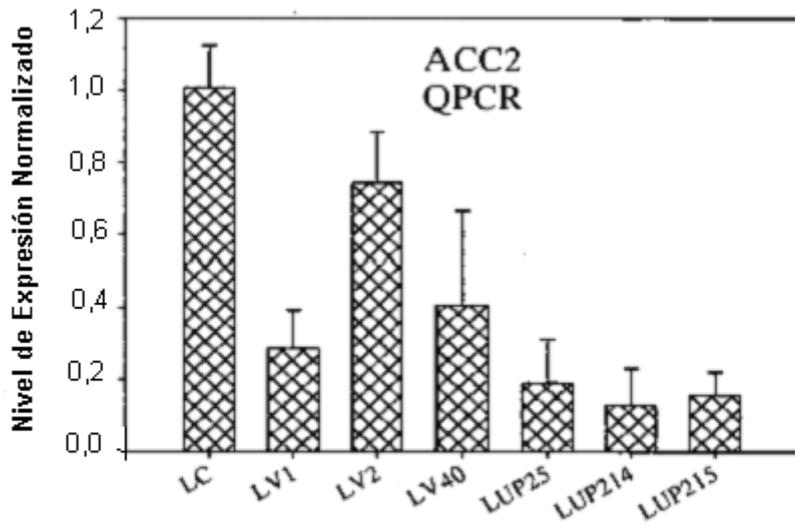
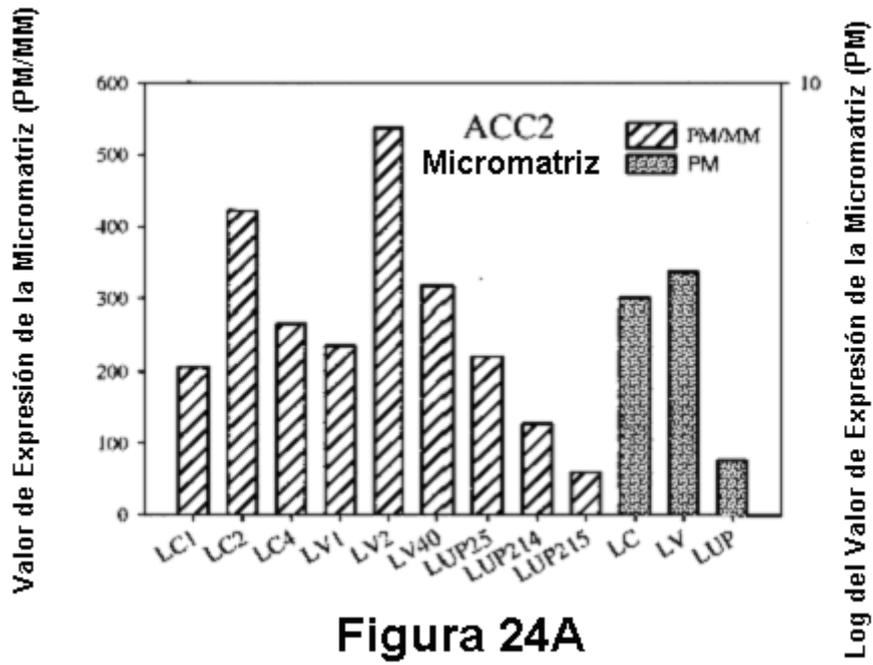


Figura 23B



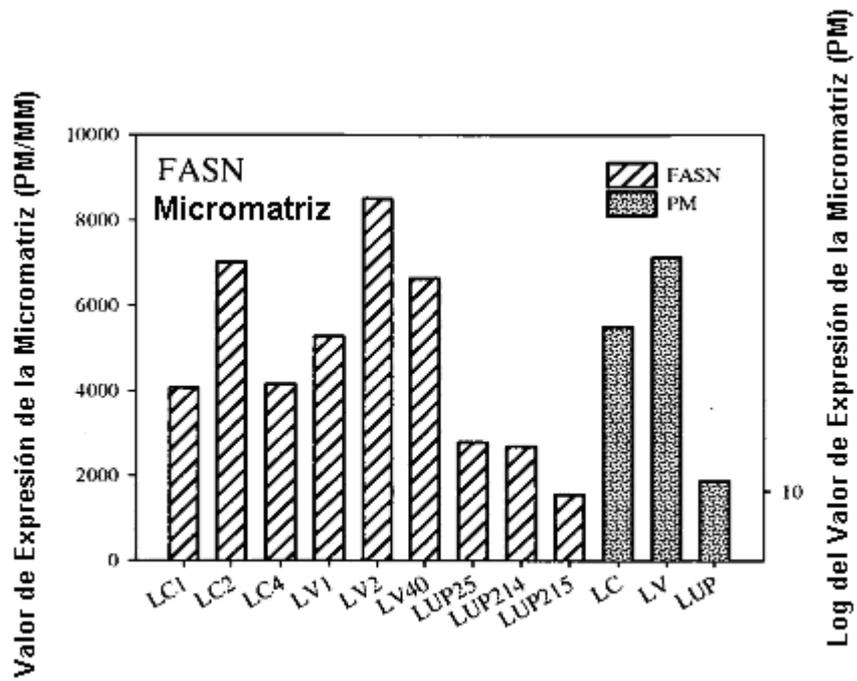


Figura 25A

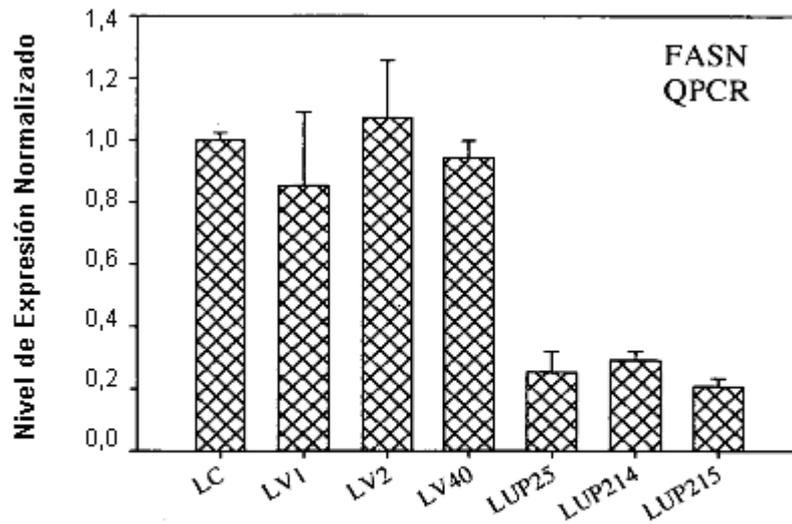


Figura 25B

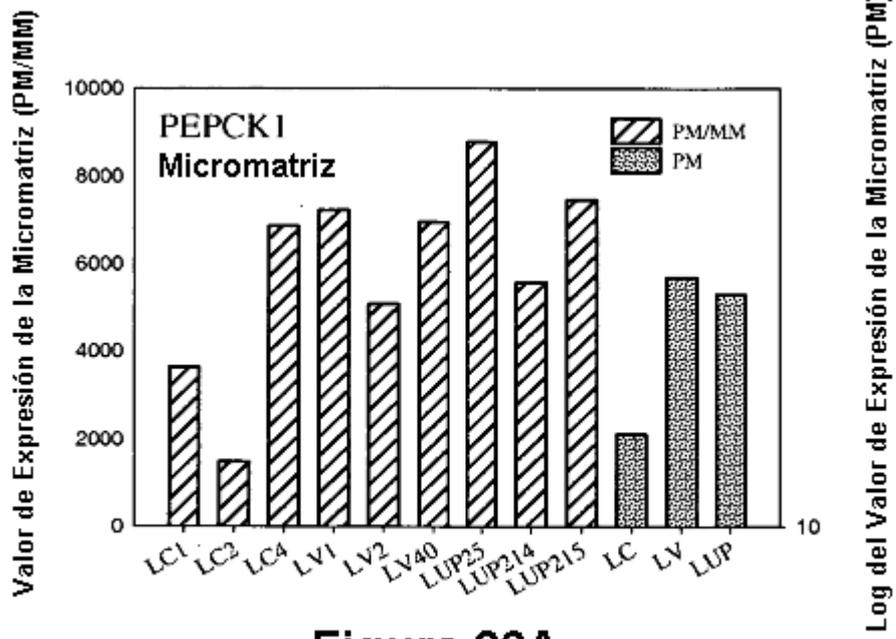


Figura 26A

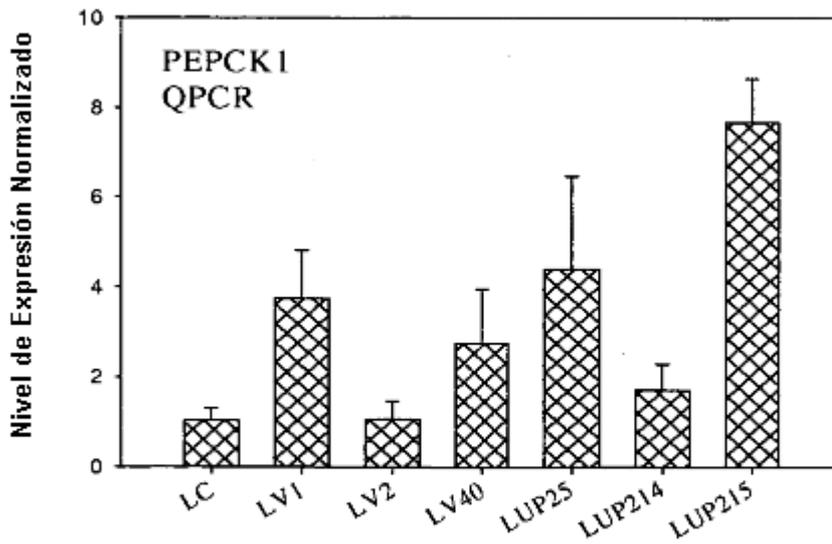


Figura 26B

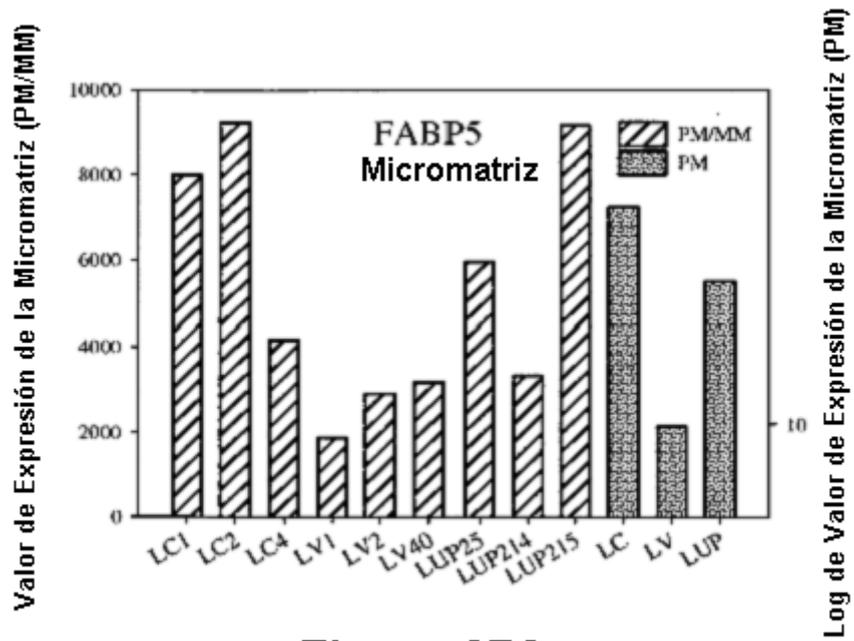


Figura 27A

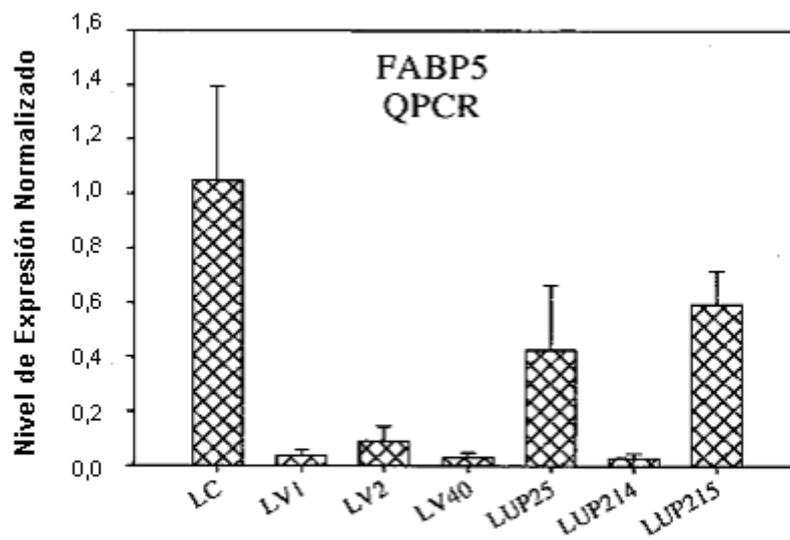


Figura 27B

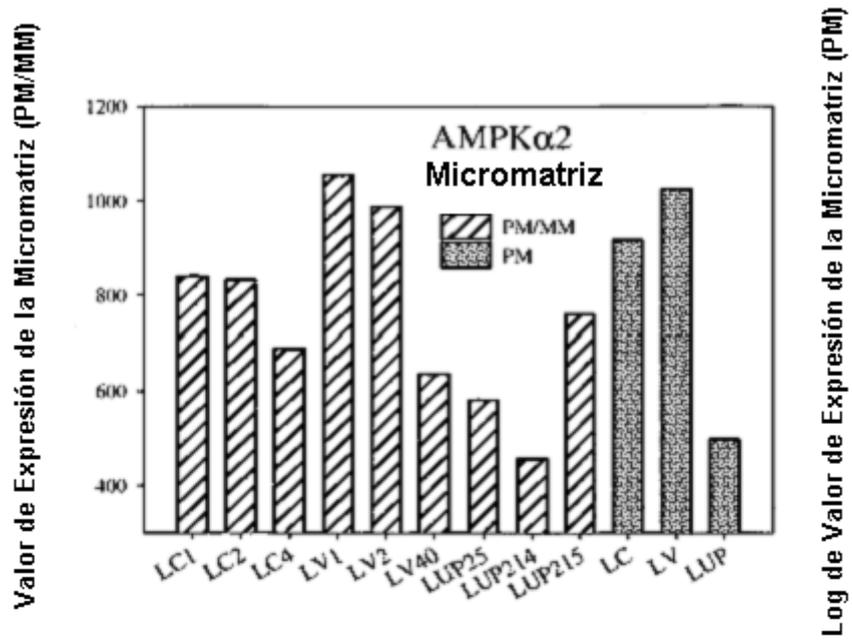


Figura 28A

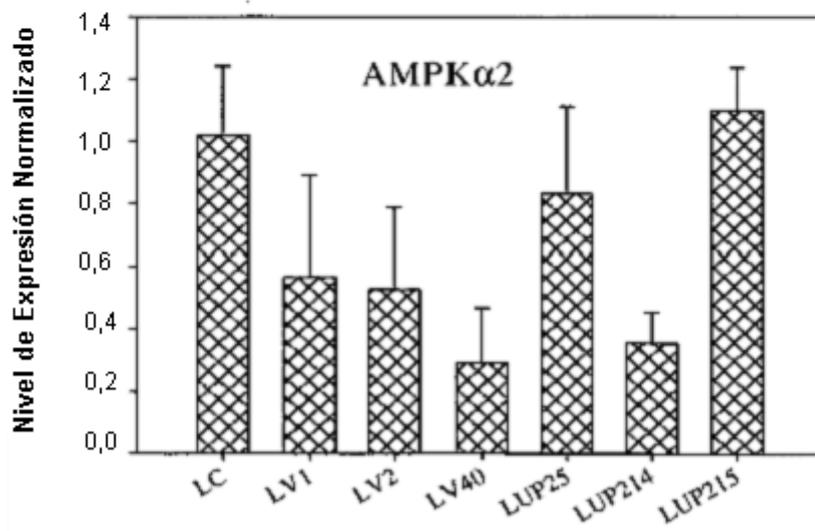


Figura 28B