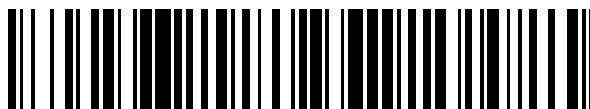


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 518**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7034 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2008** **E 11176167 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013** **EP 2384758**

54 Título: **Compuestos poliacetilénicos**

30 Prioridad:

12.02.2007 US 674105

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

17.01.2014

73 Titular/es:

ACADEMIA SINICA (100.0%)
128 Sec. 2, Academia Sinica Road Nan-Kang
Taipei, TW

72 Inventor/es:

YANG, WEN-CHIN y
CHANG, LEE-TIAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 438 518 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

Compuestos poliacetilénicos

5 ANTECEDENTES

La diabetes tipo II es una enfermedad marcada por la hiperglucemia, es decir, altos niveles de glucosa en la sangre. Muchos pacientes de diabetes tipo II sufren varias complicaciones potencialmente mortales como resultado de la hiperglucemia a largo plazo. El control efectivo de los niveles de glucosa en la sangre es la clave para prevenir o revertir las complicaciones diabéticas.

La secreción de insulina desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Por lo tanto, hay una necesidad de identificar compuestos que mejoran la secreción de insulina, y de ese modo tratar eficazmente la diabetes tipo II.

La publicación de la patente japonesa núm. 2004-83463 describe compuestos de acetileno que son ingredientes de extractos de *Bidens pilosa* y excelentes en la acción hipoglucémica y la acción antiinflamatoria.

Li-Wha Wu y otros ("Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents" Pharmaceutical Research (2004) Vol. 21, núm. 11, páginas 2112-2119) describe una fracción de acetato de etilo (EA) de *B. pilosa* que muestra actividades de proliferación anti-célula y de formación anti-tubo significativas contra las células del endotelio venoso umbilical humano (HUVEC), y poliacetilenos, 1,2-dihidroxitrideca-5,7,9,11-tetraeno y 1,3-dihidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-trieno aislado a partir de la fracción EA que muestra actividades antiangiogénicas y la capacidad para regular la expresión de los mediadores del ciclo celular.

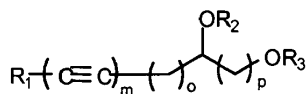
Shu-Lin Chang y otros ("Polyacetylenic compounds and butanol fraction from *Bidens pilosa* can modulate the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice" Planta Med. 2004 Nov;70(11):1045-51) describe una fracción de butanol de *B. pilosa* que suprime el desarrollo de la diabetes, y dos compuestos poliacetilénicos, 2-beta-D-glucopiranosilo-1-hidroxi-5(E)-trideceno-7,9,11-trieno y 3-beta-D-glucopiranosilo-1-hidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-trieno, identificados a partir de la fracción de butanol que previenen además la aparición de la diabetes como la fracción de butanol.

RESUMEN

Esta invención se basa en el hallazgo inesperado que un compuesto poliacetilénico de origen natural fue eficaz para tratar diabetes tipo II.

En un aspecto, esta invención presenta un extracto de *Bidens pilosa* que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula (I):

40



para el uso en el tratamiento de la diabetes tipo II en un sujeto que lo necesita, en donde R_1 es H, C_1 - C_{10} alquilo, C_2 - C_{10} alquenilo, C_1 - C_{10} alquinilo, C_3 - C_{20} cicloalquilo, C_3 - C_{20} cicloalquenilo, C_1 - C_{20} heterocicloalquilo,

C_1 - C_{20} heterocicloalquenilo, arilo, o heteroarilo; R_2 es un residuo de monosacárido; R_3 es H o C_1 - C_{10} alquilo; m es 2, 3, o 4; n es 0, 1, 2, o 3; o es 0, 1, 2, 3, o 4; y p es 1, 2, 3, o 4. El término "compuesto puro" se refiere a un compuesto que tiene una pureza de al menos 80% (por ejemplo, 95% o 99%). Con referencia a la Fórmula (I), un subconjunto de los compuestos poliacetilénicos descritos anteriormente son aquellos en los cuales R_1 es C_1 - C_{10} alquilo (por ejemplo, metilo), R_2 es glicopiranos; R_3 es H o C_1 - C_{10} alquilo; m es 4; n es 0; o es 2; y p es 1.

El término "alquilo" se refiere a una porción de hidrocarburo no aromático lineal o ramificado saturado, tal como CH_3 , $-CH_2-$, o $(CH_3)_2CH_2-$ ramificado. El término "alquenilo" se refiere a una porción de hidrocarburo no aromático lineal o ramificado que tiene al menos un enlace doble, tal como $CH_2=CH-$, o $-CH=CH-$. El término "alquinilo" se refiere a una porción de hidrocarburo no aromático lineal o ramificado que tiene al menos un enlace triple, tal como $CH\equiv C-$ o $-C\equiv C-$. El término

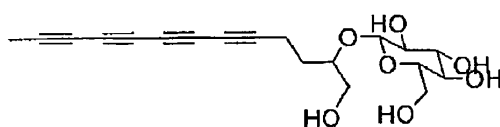
55

"cicloalquilo" se refiere a una porción de hidrocarburo cíclico no aromático saturado, tal como ciclohexilo. El término "cicloalquenilo" se refiere a una porción de hidrocarburo cíclico, no aromático que contiene al menos un enlace doble en el anillo, tal como ciclohexenilo. El término "heterocicloalquilo" se refiere a una porción cíclica saturada no aromática, que tiene al menos un heteroátomo en el anillo (por ejemplo, O, N, o S), tal como 4-tetrahidropirranilo. El término "heterocicloalquenilo" se refiere a una porción cíclica, no aromática que tiene al menos un heteroátomo en el anillo y al menos un enlace doble en el anillo, tal como piranilo. El término "arilo" se refiere a una porción de hidrocarburo que tiene al menos un anillo aromático. Los ejemplos de porciones arilo incluyen fenilo, fenileno, bifenilo, naftilo, naftileno, pirenilo, antrilo, y fenantrilo. El término "heteroarilo" se refiere a una porción que tiene al menos un anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo. Los ejemplos de porciones heteroarilo incluyen furilo, furileno, fluorenilo, pirrolilo, tienilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, piridilo, pizidinilo, quinazolinilo, isoquinolilo, e indolilo.

El alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo mencionados en la presente incluyen tanto porciones sustituidas como no sustituidas. Los ejemplos de sustituyentes en el cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo incluyen, pero sin limitarse a, C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀ alquenilo, C₂-C₁₀ alquinilo, C₃-C₁₀ cicloalquilo, C₃-C₂₀ cicloalquenilo, C₁-C₁₀ alcoxi, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, C₁-C₁₀ alquilamino, C₁-C₁₀ dialquilamino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, C₁-C₁₀ alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, C₁-C₁₀ alquilsulfonamida, arilsulfonamida, heteroarilsulfonamida C₁-C₁₀ alquilimino, arilimino, C₁-C₁₀ alquilsulfonimino, arilsulfonimino, hidroxilo, halo, tio, C₁-C₁₀ alquiltio, ariltio, aminotioacilo, amidino, guanidina, ureido, ciano, nitro, nitroso, azido, acilo, tioacilo, aciloxi, carboxilo, amido, carbamoilo, y carboxilo, y éster carboxílico. Los ejemplos de sustituyentes en el alquilo, alquenilo, y alquinilo incluyen todos los sustituyentes mencionados anteriormente excepto C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀ alquenilo, y C₂-C₁₀ alquinilo. El cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, y heteroarilo pueden fusionarse entre sí.

En otro aspecto, está invención presenta el uso de un extracto de *Bidens pilosa* que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula (I) mostrada anteriormente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes tipo II, en la cual R₁ es H, C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀ alquenilo, C₂-C₁₀ alquinilo, C₃-C₂₀ cicloalquilo, C₃-C₁₀ cicloalquenilo, C₁-C₂₀ heterocicloalquilo, C₁-C₂₀ heterocicloalquenilo, arilo, o heteroarilo; R₂ es H o un residuo de monosacárido; R₃ es H o C₁-C₁₀ alquilo; m es 2, 3, o 4; n es 0, 1, 2, o 3; o es 0, 1, 2, 3, o 4; y p es 1, 2, 3, o 4. Un subconjunto de los compuestos poliacetilénicos son aquellos en los cuales R₁, es C₁-C₁₀ alquilo (por ejemplo, metilo); R₂ es un residuo de glucosa, galactosa, fucosa, manosa, glucosa, o H; R₃ es H; m es 4, n es 0, o es 2, y p es 1.

Una preparación de *Bidens pilosa* puede obtenerse mediante la agitación de plantas de *Bidens pilosa* pulverizadas en agua a una elevada temperatura (por ejemplo, a 50°C o 100°C) para formar una suspensión, y recoger un sobrenadante de la suspensión. El sobrenadante puede extraerse además con un alcohol (por ejemplo, n-butanol) para proporcionar una preparación enriquecida. La preparación de *Bidens pilosa* contiene uno o más de los compuestos poliacetilénicos de la fórmula (I) antes mencionada. Por ejemplo, esta contiene citopiloína:



Los compuestos poliacetilénicos descritos anteriormente incluyen los compuestos en sí, así como sus sales, profármacos, y solvatos, si fuera aplicable. Tales sales, por ejemplo, pueden formarse por interacción entre un sustituyente negativamente cargado (por ejemplo, carboxilato) en un compuesto poliacetilénico y un catión. Los cationes adecuados incluyen, pero sin limitarse a, ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio y un catión amonio (por ejemplo, ion de tetrametilamonio). De igual manera, un sustituyente positivamente cargado (por ejemplo, amino) en un compuesto poliacetilénico puede formar una sal con un contraión negativamente cargado. Los contraiones adecuados incluyen, pero sin limitarse a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, o acetato. Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres y otros derivados farmacéuticamente aceptable, los que, tras la administración a un sujeto, son capaces de proporcionar los compuestos anteriores descritos anteriormente. Un solvato se refiere a un complejo formado entre un compuesto poliacetilénico y un solvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, isopropanol, n-butanol, acetato de etilo, y ácido acético.

Los compuestos poliacetilénicos pueden contener uno o más centros asimétricos o un enlace doble no aromático. Así, estos pueden existir como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales, mezclas diastereoméricas, y formas cis- o trans-isoméricas. Se contemplan todas estas formas isoméricas.

Además dentro del alcance de esta invención está una composición, que incluyen un extracto de *Bidens pilosa*, que contiene uno o más de los compuestos poliacetilénicos descritos anteriormente para usar en el tratamiento de la diabetes tipo II, y el uso de tal composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento antes mencionado.

Los detalles de las modalidades de la invención se exponen en la descripción más abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones.

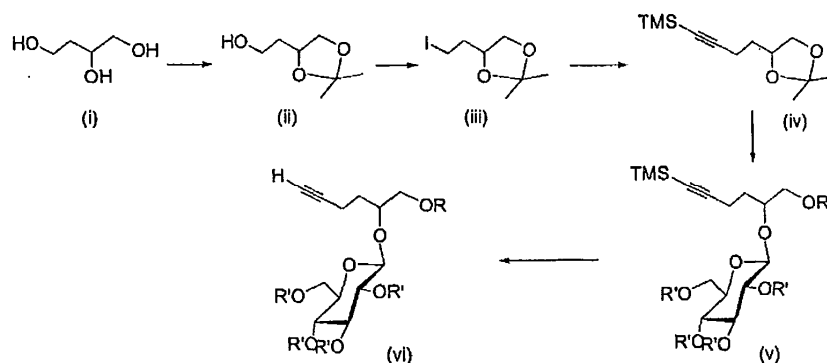
DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta invención se relaciona con el uso de compuestos poliacetilénicos para tratar la diabetes tipo II.

Algunos de los compuestos poliacetilénicos (por ejemplo, citopiloína) pueden aislarse a partir de *Bidens pilosa* como sigue. Las plantas de *Bidens pilosa* completas se pulverizan primero y después se agitan en agua caliente. Después de eliminar los materiales insolubles (por ejemplo, por filtración, decantación, o centrifugación), el sobrenadante resultante se somete a cromatografía de líquido (por ejemplo, cromatografía de líquido de alta presión) u otros métodos adecuados para proporcionar compuestos poliacetilénicos puros. Los compuestos puros así obtenidos pueden derivarse además para proporcionar una serie de otros compuestos poliacetilénicos de esta invención.

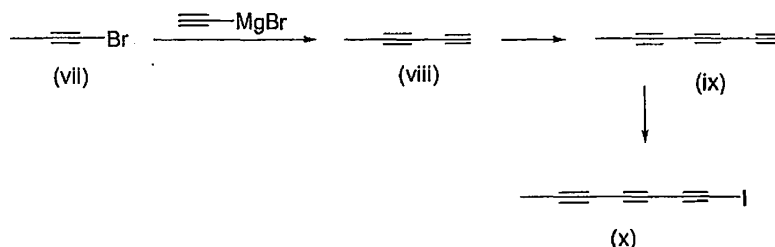
Los compuestos poliacetilénicos descritos anteriormente pueden prepararse además por un método convencional. Más abajo hay tres esquemas de reacción que ilustran las vías de síntesis para un compuesto poliacetilénico de esta invención.

Esquema 1



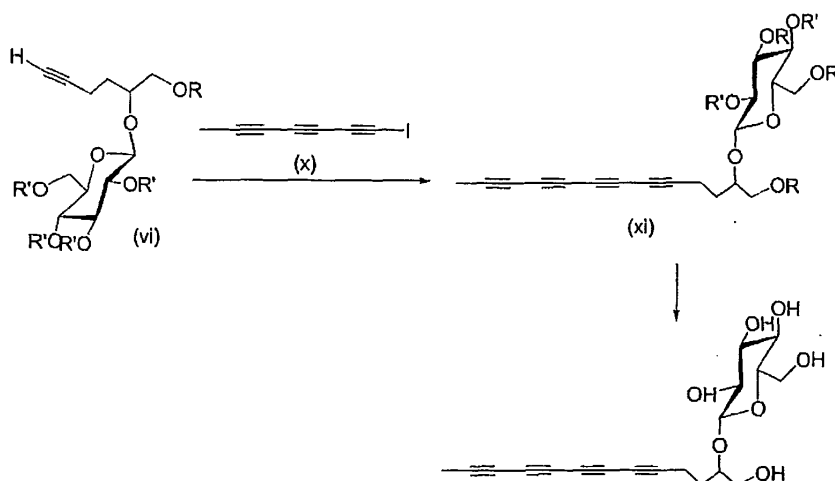
Butano-1,2,4-triol (i) reacciona con acetona para formar un compuesto 1,2,4-triol protegido (ii), que puede transformarse fácilmente en un derivado de yodo (iii). El compuesto (iii) reacciona después con etiniltrimetilsilano, bajo una condición básica (por ejemplo, n-BuLi), para dar (4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)but-1-ynil)trimetilsilano (iv). El compuesto (iv) se trata posteriormente con un ácido (por ejemplo, ácido acético), seguido por una reacción de acoplamiento con 2-bromoglucopiranososa para proporcionar un aducto (v). El compuesto (v) puede tratarse además con fluoruro de potasio para proporcionar 2-fenil-4H-cromen-4-ona (vi).

Esquema 2



5 1-Bromoprop-1-ina (vii) reacciona con bromuro de etinilmagnesio para proporcionar penta-1,3-diino (viii), que se convierte después a hepta-1,3,5-triino (ix). El compuesto (ix) puede transformarse fácilmente a 1-yodohepta-1,3,5-triino (x) bajo una condición básica (por ejemplo, n-BuLi), seguido por la adición de un compuesto de yodo (por ejemplo, I₂).

Esquema 3



10

15 El esquema de reacción 3 demuestra una reacción de acoplamiento entre un derivado acetileno (vi), obtenido del Esquema 1, y 1-yodohepta-1,3,5-triino (x), obtenido del Esquema 2, a un compuesto de tetraeno (xi). La eliminación de los grupos protector proporciona un compuesto poliacetilénico, 2β-D-glucopiranosilo-1-hidroxitrideca-5,7,9,11-tetraeno, un compuesto de esta invención.

20 Las transformaciones químicas sintéticas útiles para la síntesis de compuestos aplicables se describen, por ejemplo, en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ra Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) y ediciones posteriores de estos.

25 Esta invención presenta un método para administrar una cantidad eficaz de uno de los compuestos poliacetilénicos anteriormente descritos o una preparación de *Bidens pilosa* que contiene tal compuesto a un sujeto para tratar la diabetes tipo II. El término "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) a un sujeto, que tiene diabetes tipo II, o un síntoma o predisposición hacia dicha enfermedad, con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, mejorar o prevenir la diabetes tipo II, los síntomas de esta, o las predisposiciones hacia esta. Tal sujeto puede ser identificado por un profesional de la salud sobre la base de los resultados de cualquier método de diagnóstico adecuado.

30 "Una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de tiofeno activo que se requiere para conferir un efecto

terapéutico en el sujeto tratado. Las dosis eficaces variarán, como reconocen aquellos con experiencia en la técnica, dependiendo de la vía de administración, excipiente usado, y la posibilidad del uso conjunto con otro tratamiento terapéutico.

5 Cuando se trata la diabetes tipo II con un compuesto poliacetilénico (como un compuesto puro o en un extracto de *Bidens pilosa*), estos pueden administrarse por vía parenteral, oral, nasal, rectal, en forma tópica, o bucalmente. El término "parenteral" como se usa en la presente se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

10 Una composición inyectable estéril puede ser una solución o suspensión en un diluyente o solvente no tóxico aceptable parenteralmente, tal como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están el manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, los aceites fijos se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos).
15 Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, así como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden contener además un diluyente o dispersante alcohol de cadena larga, o carboximetil celulosa o agentes dispersantes similares. Además se pueden usar otros surfactantes comúnmente usados tales como Tween o Spans u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de can dosificación sólidas, líquidas, o de otro tipo farmacéuticamente aceptables para los propósitos de formulación.

20 Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye cápsulas, tabletas, emulsiones, y suspensiones, dispersiones, y soluciones acuosas. En el caso de las tabletas, los portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. Típicamente, también se añaden agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas o emulsiones se administran oralmente, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, cierto agente endulzante, saborizante o colorante puede añadirse también.

30 Una composición para inhalación o aerosol nasal puede prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica. Por ejemplo, una composición de este tipo puede prepararse como una solución en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de absorción adecuados para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes de solubilización o dispersantes conocidos en la técnica. Una composición que tiene uno o más compuestos activos anteriormente descritos puede administrarse además en forma de supositorios para administración rectal.

35 Un portador farmacéuticamente aceptable se usa de manera habitual con uno o más compuestos activos anteriormente mencionados. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido que sea compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferentemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no perjudicial para el sujeto a tratar. Uno o más agentes de solubilización pueden usarse como excipientes farmacéuticos para el suministro de un compuesto anteriormente mencionado. Los ejemplos de otros portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato magnésico, celulosa, lauril sulfato de sodio, y D&C Amarillo #10.

40 Los compuestos poliacetilénicos descritos anteriormente disminuyen los niveles de glucosa en sangre mejorando la síntesis de insulina y la secreción de insulina. Ellos pueden y tamizarse preliminarmente por su eficacia para tratar la diabetes tipo II por ensayos *in vitro* o por experimentos animales, y confirmados después por ensayos clínicos. Otros métodos serán también evidentes para las personas de habilidad ordinaria en la técnica.

45 Los ejemplos específicos que aparecen más abajo deben considerarse meramente ilustrativos y no limitativos del resto de la descripción de modo alguno. Sin entrar en otros detalles innecesarios, se considera que, basándose en la presente descripción, una persona con experiencia en la técnica podrá usar al máximo la presente invención.

Ejemplo 1

55 Las plantas de *Bidens pilosa* se recogieron del campo de la Academia Sinica, Taiwán. Aproximadamente 10 kg de las plantas limpias y trituradas, en su totalidad, se sometió a reflujo en 40 l de agua por dos horas. Después de la eliminación de la fase acuosa, los materiales insolubles se sometieron nuevamente a reflujo en 25 l de agua por dos horas. Las soluciones acuosas combinadas (aproximadamente 65 l) se evaporaron *al vacío* para obtener un residuo, que se suspendió

posteriormente en 1.0 l de agua y se extrajo con 1.0 l de *n*-butanol tres veces. La fracción de *n*-butanol se evaporó primero en un evaporador rotatorio vacío bajo presión reducida y después se liofilizó para proporcionar un producto crudo de citopiloína (37.7 g).

- 5 El producto crudo se cromatografió posteriormente sobre una columna de gel de sílice RP-18 con un sistema solvente de gradiente CH₃OH/H₂O para dar sub-fracciones BPB1, BPB2, BPB3, y BPB4. La fracción BPB3, eluida por 70% CH₃OH, se fraccionó adicionalmente por HPLC semi-preparativa usando un sistema solvente CH₃OH/H₂O. La citopiloína se obtuvo y se caracterizó por ¹H NMR y ¹³C NMR.
- 10 ¹H NMR (500 MHz, CDOD₃) δ 1.78 (2H, q, J= 6.8 Hz), 1.98 (3H, s), 2.58 (2H, t, J= 6.8 Hz), 3.19 (1H, dd, J= 9.1, 7.8 Hz), 3.30 (1H, m), 3.34 (1H, m), 3.59 (2H, m), 3.65 (1H, dd, J= 12.0, 6.5 Hz), 3.75 (1H, p, J= 6.8 Hz), 3.85 (1H, dd, J= 12.0, 1.7 Hz), 4.32 (1H, d, J= 7.8 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDOD₃) δ 3.8, 16.1, 31.4, 60.0, 60.9, 61.8, 62.4, 62.6, 64.9, 65.8, 66.2, 71.5, 75.2, 77.9, 81.6, 104.8.

15 Ejemplo 2

Los ratones db/db se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, Estados Unidos), y después se mantuvieron y manipularon de acuerdo con las directrices de la Academia Sinica Institutional Animal Care and Utilization Committee (Taiwán).

- 20 Los ratones db/db diabéticos de 7-8 semanas de edad ayunaron por 12 horas (agua permitida), y después se inyectaron intraperitonealmente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o citopiloína a 25 µg/kg, los niveles de glucosa en sangre en los ratones se monitorearon a 0, 1, 2, 4, y 6 horas usando el glucómetro Elite.
- 25 Los resultados muestran que a las dos horas los niveles de glucosa en sangre en los ratones tratados disminuyeron significativamente.

Ejemplo 3

- 30 Los ratones db/db se obtuvieron de Jackson Laboratory, y después se mantuvieron y manipularon de acuerdo con las directrices de la Academia Sinica Institutional Animal Care and Utilization Committee (Taiwán). La glibenclamida se obtuvo de MP Biomedical Inc.

- 35 Los ratones db/db diabéticos de 7-8 semanas de edad ayunaron por 12 horas (agua permitida) y se administraron oralmente con PBS, citopiloína a 0.5 mg/kg o glimepirida a 2.5 mg/kg. Media hora más tarde, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con glucosa a 0.5 g/kg de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se monitorearon a 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas usando el glucómetro Elite.

- 40 Los resultados muestran que la citopiloína a 0.5 mg/kg de peso corporal mejoró la tolerancia a la glucosa tan eficazmente como la glimepirida a 2.5 mg/kg de peso corporal, en contraposición a PBS en ratones.

Ejemplo 4

- 45 Células RIN-m5F, una línea celular β de rata, se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El medio RPMI libre de glucosa se obtuvo de Life Technology. Las células se cultivaron en un medio RPMI 1640 libre de glucosa suplementado con 10% FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml), 2-mercapoetanol (50 µM), piruvato de sodio (1 mM), y glutamato (292 µg/ml).

- 50 Las células se incubaron separadamente con vehículo, glucosa a una dosis alta (16.7 mM), glucosa a una dosis baja (3.6 mM), y citopiloína a 2.5, 10, y 15 µg/ml por 24 horas. Los niveles de insulina en el medio celular se determinó usando un kit Elisa de insulina (Mercodia, Uppsala, Suecia).

Los resultados muestran que la citopiloína mejoró significativamente la secreción de insulina.

Ejemplo 5

- 55 Las células RIN-m5F se pre-trataron con el vehículo, diazóxido (100 µM), EGTA (10 µM), o nimodipina (1 µM) por 30 minutos. Estos se incubaron después con citopiloína a 5 µg/ml por 10 min. Los niveles de insulina en el medio celular se determinó usando un kit Elisa de insulina.

Se observó que el diazóxido, un activador de los canales de potasio/ATP, suprimió la secreción de insulina inducida por citopiloína. EGTA, un quelante de calcio, y nimodipina, un bloqueador del canal de calcio, suprimió la secreción de insulina inducida por citopiloína en las células β . Estos resultados sugieren que la citopiloína indujo la secreción de insulina mediante la afectación de las funciones del canal de potasio/ATP canal de calcio.

Ejemplo 6

El vector pINS-DCR3 que contiene un promotor de insulina humano se digirió con SphI y BamHI y después se clonó en un vector pcDNAΔGMVluc para generar el plásmido pINS-Luc. El plásmido pRL-TK que contiene un promotor de timidina cinasa y un gen reportero de luciferasa *Renilla* se obtuvo de Promega.

Las células RIN-m5F transfectadas con los plásmidos INS-Luc y pRL-TK se incubaron con el vehículo, alta glucosa (16.7 mM), o citopiloína a 2.5, 10, o 15 μ g/ml por 24 horas.

Los resultados muestran que citopiloína estimularon la transcripción de insulina en células RIN-m5F en una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7

Las células β primarias de ratones se sembraron en placas de 9-cm² en un medio RPMI 1640 libre de glucosa. Las células β primarias de ratones y las células RIN-m5F se trataron con el vehículo o citopiloína a 2.5, 5, o 10 μ /ml por 24 horas. Las células tratadas se sometieron posteriormente a tinción intracelular con el anticuerpo anti-insulina (H86, Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos) y antisuero de anti-conejo conjugado con FITC (BD Biosciences, CA, Estados Unidos) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los niveles de insulina en el medio celular se determinó usando un kit Elisa de insulina.

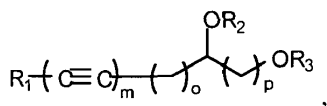
Los resultados muestran que la citopiloína elevó los niveles de insulina en células β en comparación con el tratamiento con el vehículo.

OTRAS MODALIDADES

Todas las características descritas en esta descripción pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta descripción puede reemplazarse por una característica alternativa que sirve para el mismo propósito, uno equivalente o similar. Así, a menos que se declare expresamente de cualquier otra forma, cada característica descrita es solamente un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de *Bidens pilosa* que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la siguiente fórmula:



para usar en el tratamiento de la diabetes tipo II en un sujeto que lo necesita,
en donde

R_1 es H, C_1-C_{10} alquilo, C_2-C_{10} alqueno, C_2-C_{10} alquino, C_3-C_{20} cicloalquilo, C_3-C_{20} cicloalqueno, C_1-C_{20} heterocicloalquilo, C_1-C_{20} heterocicloalqueno, arilo, o heteroarilo;

R_2 es H o un residuo de monosacárido;

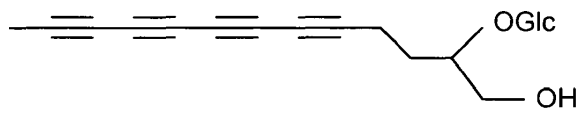
R_3 es H o C_1-C_{10} alquilo;

m es 2, 3, o 4;

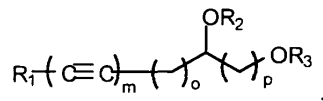
o es 0, 1, 2, 3, o 4; y

p es 1, 2, 3, o 4.

2. El extracto para usar de la reivindicación 1, en donde R_2 es un residuo de glucosa, galactosa, fucosa, manosa, o glucosa.
3. El extracto para usar de la reivindicación 2, en donde R_2 es glucopiranos.
4. El extracto para usar de la reivindicación 3, en donde m es 4, o es 2, y p es 1.
5. El extracto para usar de la reivindicación 4, en donde R_1 es C_1-C_{10} alquilo.
6. El extracto para usar de la reivindicación 5, en donde R_1 es metilo.
7. El extracto para usar de la reivindicación 6, en donde R_3 es H.
8. El extracto para usar de la reivindicación 1, en donde R_2 es H.
9. El extracto para usar de la reivindicación 8, en donde m es 4, o es 2, y p es 1.
10. El extracto para usar de la reivindicación 9, en donde R_1 es C_1-C_{10} alquilo.
11. El extracto para usar de la reivindicación 10, en donde R_1 es metilo.
12. El extracto para usar de la reivindicación 11, en donde R_3 es H.
13. El extracto para usar de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:



14. Uso de un extracto de *Bidens pilosa* que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la siguiente fórmula:



5 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo II,
en donde

R_1 es H, C_1-C_{10} alquilo, C_2-C_{10} alquenilo, C_2-C_{10} alquinilo, C_3-C_{20} cicloalquilo, C_3-C_{20} cicloalquenilo, C_1-C_{20} heterocicloalquilo, C_1-C_{20} heterocicloalquenilo, arilo, o heteroarilo;

R_2 es H o un residuo de monosacárido;

R_3 es H o C_1-C_{10} alquilo;

m es 2, 3, o 4;

o es 0, 1, 2, 3, o 4; y

p es 1, 2, 3, o 4.

15. El uso de la reivindicación 14, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:

