

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 706**

51 Int. Cl.:

**A61Q 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08847183 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2214790**

54 Título: **Aplicaciones terapéuticas de extractos de semillas de Fraxinus excelsior**

30 Prioridad:

**05.11.2007 US 985558 P**  
**04.08.2008 US 185649**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.01.2014**

73 Titular/es:

**NATUREX S.A. (100.0%)**  
**Pole Technologique Agroparc BP 1218**  
**84911 Avignon Cedex 9, FR**

72 Inventor/es:

**HE, KAN;**  
**ROLLER, MARC;**  
**BILY, ANTOINE;**  
**IBARRA, ALVIN;**  
**DIKANSKY, JACQUES y**  
**BAI, NAISHENG**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 439 706 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

Aplicaciones terapéuticas de extractos de semillas de *Fraxinus excelsior*.

5 Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) es una enfermedad global común caracterizada por deficiencia de insulina e insensibilidad a la insulina. La DM-2 se considera una enfermedad grave que crea un problema sanitario asociado con una alta morbilidad, y es la sexta causa principal de muerte en los Estados Unidos [Miniño *et al*, 2007, National Vital Statistical Report, 55]. Se espera que el número de pacientes diabéticos puede aumentar hasta 300 millones en todo el mundo para el año 2025 [King *et al*, 1998, Diabetes Care, 21, 1414-31]. En los Estados Unidos, el 7 por ciento de la población (20,8 millones de niños y adultos) se ven afectados por diabetes [French, 2007, Inside, 12, 46-7] y se estima que costó en los Estados Unidos 132 mil millones de dólares en 2002 en gastos médicos y pérdida de productividad [Hogan *et al*, 2003, Diabetes Care, 26, 917-32]. Los métodos de tratamiento para DM-2 incluyen el uso de insulina, análogos de insulina o insulina modificada, potenciar la liberación de insulina y la acción de insulina, inhibir la producción de glucosa hepática e inhibir la captación de glucosa [Moller, 2001, Nature, 414, 821-27]. Además de estos agentes terapéuticos, también se usan en todo el mundo medicinas tradicionales para el tratamiento de DM-2. Se han usado más de 1.200 especies de organismos de manera etnofarmacológica o experimental para tratar síntomas de DM-2 [Marles y Farnsworth, 1996, Protocol J. Botanical Med., 1, 85-137].

20 Generalmente se reconoce que la prevalencia en rápido aumento de la obesidad representa un grave problema para la sanidad pública en los Estados Unidos. Según datos de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES, encuesta nacional de examen de salud y nutrición) de 1999-2000, casi dos tercios (el 64,5%) de la población adulta de los Estados Unidos tienen sobrepeso en comparación con el 55,9% según se detalla por la investigación NHANES III realizada entre 1988 y 1994. La prevalencia de la obesidad también ha aumentado drásticamente desde el 22,9% hasta el 30,5% a lo largo del mismo periodo. El creciente número de personas obesas corren probablemente un alto riesgo de desarrollar una variedad de enfermedades relacionadas con la obesidad que incluyen diabetes [Flegal *et al*, 2002, JAMA. 288, 1723-1727 y Kuczmarski *et al* 1994, JAMA. 272, 205-221].

30 *Fraxinus excelsior* L., una planta de la familia de las oleáceas, se denomina comúnmente “fresno común” o “fresno europeo” en los países de Europa y Asia templada [Gilman y Watson, 1993, Fact Sheet ST- 264, Noviembre]. Esta planta también está ampliamente distribuida en todo el norte de África, la región sudoriental de Marruecos, y allí se conoce como “l'essane l'ousfour”. La región Tafilalet se ha considerado entre las regiones de Marruecos en las que el conocimiento sobre fitoterapia está más desarrollado [Eddouks *et al*, 2002, J. Ethnopharmacol. 82, 97- 103]. Recientes estudios han indicado que *F. excelsior* (FE) presenta actividades antibacterianas y antioxidantes. Un extracto en metanol de FE mostró una potente actividad antioxidante con  $CR_{50}$  de  $1,35 \times 10^{-2}$  en el ensayo cualitativo de  $\alpha, \alpha$ -difencil- $\beta$ -picirilhidrazilo (DPPH). Los extractos en n-hexano y diclorometano de FE también fueron activos contra ocho especies de bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas sometidas a prueba incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) dentro de  $1,25 \times 10^{-1}$  mg/mL [Middleton *et al*, 2005, Indian J. Pharma. Res., 2, 81-6]. Se notificó el efecto hipotensivo de FE sobre ratas tanto normotensas como espontáneamente hipertensas. La administración oral diaria del extracto acuoso de semillas de FE produjo una disminución significativa en la tensión arterial sistólica y potenció significativamente la micción en ambos tipos de ratas [Eddouks *et al*, 2005, J. Ethnopharmacol., 99, 49-54]. Los extractos acuosos de semillas de FE presentaron una potente actividad hipoglucémica y anti-hiperglicémica en ratas normales e inducidas por estreptozotocina (STZ) sin afectar a las concentraciones de insulina en plasma basales [Maghrani *et al*, 2004, J. Ethnopharmacol., 91, 309-16]. El efecto similar a florizina de la inhibición de la reabsorción de la glucosa renal puede ser uno de los mecanismos para el efecto hipoglucémico de FE [Eddouks *et al*, 2004, J. Ethnopharmacol., 94, 149-54].

Se informó que FE contiene principalmente cumarinas, secoiridoides y feniletanoides. [Kostova y Iossifova, 2007, Fitoterapia 78, 85-106]. Los secoiridoides encontrados en FE se derivan de oleósido. Estos tipos de secoiridoides sólo existen en plantas de la familia de las oleáceas [Egan *et al*, 2004, Biochem. Sys. Ecol., 32, 1069-71].

55 Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* que comprende G15 o nuzhenida, y al uso del extracto en la preparación de un medicamento, para su uso en un método terapéutico según las reivindicaciones adjuntas.

También se dan a conocer en el presente documento secoiridoides novedosos que se han aislado del extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* (nombre común, fresno). Los dos compuestos se identificaron como (1) éster metílico del ácido (2S, 3E, 4S) 3-etiliden-2-[(6-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonil)2H-piran-4-acético, denominado excélsido A, que tiene la fórmula química  $C_{22}H_{32}O_{16}$  (figura 1-1) ; y (2) éster etílico del ácido (2S, 3E, 4S) 3-etiliden-2-[(6-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonil)2-(4-hidroxifenil)2H-piran-4-acético, denominado excélsido B, que tiene la fórmula  $C_{30}H_{40}O_{17}$  (figura 1-2). Ambos compuestos son secoiridoides de tipo oleósido caracterizados por una funcionalidad 8, 9-olefínica exocíclica.

65 También se da a conocer en el presente documento un procedimiento de obtención de una composición derivada de FE aislada. La composición puede obtenerse mediante un único procedimiento de extracción y aislamiento. Se

trituran las semillas para dar gránulos con un tamaño de partícula en un intervalo de desde 0,1 mm hasta 30 mm para aumentar el área superficial para que entre en contacto con el disolvente y para aumentar la eficacia de extracción. La temperatura de extracción puede estar en un intervalo de desde 20°C hasta 100°C, o en un intervalo de desde 50°C hasta 70°C. La razón de material vegetal con respecto a la mezcla disolvente usada en el procedimiento de extracción varía desde 1:1 hasta 1:10 en una base de gramos con respecto a mililitros. En una descripción del procedimiento, la razón es de desde 1:3 hasta 1:8. El periodo de incubación durante el cual el material vegetal está en contacto con la mezcla disolvente es un periodo de tiempo de desde aproximadamente 2 h hasta aproximadamente 24 h. Los disolventes de extracción pueden ser agua, una mezcla de agua-alcohol (desde el 1% hasta el 99% de alcohol en agua) y alcohol. Los alcoholes preferidos son etanol (EtOH) y metanol (MeOH). Tras incubarse el material vegetal y el disolvente, se separa el disolvente del material vegetal residual y se concentra la composición de extracción hasta que la composición de extracción tiene un componente sólido que generalmente contiene aproximadamente el 1% - 35% de secoiridoides de *F. excelsior*. Los secoiridoides incluyen dos nuevos glucósidos de tipo oleósido, excélsido A y excélsido B, secoiridoides diméricos, nuzhenida (3) (figura 1-3), GI 3 (4) (figura 1-4) y GI 5 (5) (figura 1-5), así como ligstrósido, éster dimetilico de oleósido (6) (figura 1-6) y 11-éster metílico de oleósido. Otros componentes incluyen compuestos fenólicos, salidrósido, cumarinas y flavonoides. Tras completarse la formación del extracto, se aíslan los secoiridoides. Los secoiridoides pueden aislarse a partir del extracto de FE mediante un procedimiento cromatográfico.

Los secoiridoides se aíslan a partir de un extracto de FE en polvo seco. Se disuelve el polvo en un alcohol y se extraen los secoiridoides mediante alcohol del polvo. Entonces se evapora el alcohol y se carga el residuo restante que incluye secoiridoides en una columna de cromatografía cargada con resina C-18 de fase inversa. Se eluyen varias fracciones que contienen diferentes compuestos con una serie de sistema de agua y el 10% de MeOH/el 90% de agua y MeOH. Se comparan las fracciones mediante análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y se combinan los eluatos que tienen patrones de HPLC similares. Se separan las fracciones combinadas sobre cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal y se eluyen con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), mezcla de CHCl<sub>3</sub>-metanol que comienza desde el 90%, el 80% de CHCl<sub>3</sub> hasta el 100% de MeOH para dar varias subfracciones. Se comparan las subfracciones mediante HPLC y se combinan las fracciones que contienen excélsido A y excélsido B, respectivamente. Se purifican adicionalmente las fracciones combinadas mediante una combinación de cromatografía en columna sobre resinas C-18, MCI GEL CHP-20P y/o Sephadex LH-20 para proporcionar excélsido A y excélsido B puros.

Las nuevas estructuras químicas de excélsido A y excélsido B se esclarecen usando métodos espectroscópicos incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV), infrarrojos (IR) y espectroscopía de masas (MS), y también se determinan propiedades físicas. Las estructuras químicas conocidas de los secoiridoides se identifican mediante comparación directa de los espectros de RMN con los de la bibliografía. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600 FTIR usando placas de KBr. Los espectros de RMN se tomaron en un instrumento Varian INOVA 400 con metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) como disolvente. Todos los espectros de correlación en 2D se obtuvieron usando secuencias de pulsos en gradiente convencionales de software para RMN de Varian. Los espectros de correlación incluyen COSY (espectroscopía de correlación), TCOSY (espectroscopía de correlación total), HMQC (coherencia cuántica múltiple heteronuclear), HMBC (correlación heteronuclear de enlaces múltiples) y ROESY (espectroscopía de potenciación de Overhauser de marco rotatorio). El análisis por HPLC se realizó usando un sistema de HPLC modelo Agilent 1100 equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un desgasificador en línea de cuatro canales, un detector por red de fotodiodos y software Agilent Chemstation. Se determinaron los pesos moleculares usando CL/EM en modo ESI/APCI en un espectrómetro de masas por trampa de iones Finnigan LCQ. Se adquirieron espectros UV en un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu, UV-1700.

La presente invención se refiere al efecto inhibitorio de dos secoiridoides diméricos, GI5 (5) y nuzhenida (3), sobre una célula 3T3-L1 no diferenciada. El componente principal de aumento de peso es la deposición de tejido adiposo en el cuerpo mediante un procedimiento de adipogénesis. La adipogénesis se caracteriza por un aumento en el número y el tamaño de células adiposas. La inhibición de la adipogénesis inhibiendo la síntesis de células adiposas para reducir el número y el tamaño de células adiposas conduce al control del peso corporal.

También se da a conocer en el presente documento la activación de PPAR-alfa mediante *Fraxinus excelsior* (FE) y los secoiridoides aislados a partir de FE, éster dimetilico de oleósido (6), excélsido A (1) y GI3 (4). Los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) son receptores nucleares que controlan muchos procesos celulares y metabólicos. PPAR-alfa se expresa predominantemente en el hígado en el que tiene un papel crucial en el control de la oxidación de ácidos grasos [Reddy y Hashimoto, 2001, Annu Rev Nutr., 21, 193-230]. La inducción de oxidación de ácidos grasos mediante activación de PPAR-alfa mejora los perfiles lipídicos en plasma. En una variedad de modelos de ratón, agonistas de PPAR-alfa reducen los triglicéridos en plasma, reducen la adiposidad y mejoran la esteatosis hepática y muscular, mejorando por consiguiente la sensibilidad a la insulina y reduciendo la glucosa en sangre [Guerre-Millo *et al*, 2000, J. Biol. Chem., 275, 16638-42 y Kim *et al*, 2003, Diabetes, 52, 1770-8].

También se da a conocer en el presente documento que la composición anterior es útil para tratar síndromes metabólicos para reducir la glucosa en sangre en un sujeto con DM-2, para ayudar a perder peso y para equilibrar el nivel de insulina para prevenir la hiperinsulinemia, un síntoma de la resistencia a la insulina en un paciente con DM-

2. Cuando se alimenta a ratones C57BL/6J macho con una dieta con alto contenido en grasa, desarrollan obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia. La administración de una cantidad eficaz de FE puede reducir significativamente el nivel de glucosa en ratones, reducir su peso corporal y grasa corporal y disminuir los niveles de insulina en plasma.

5 En un ensayo clínico con seres humanos, a 16 voluntarios sanos en ayunas se les administraron 50 gramos de glucosa para inducir glicemia posprandial y se les administró FE o un placebo (salvado de trigo). El grupo con extracto de FE redujo la concentración de glucosa en plasma posprandial incremental en comparación con el placebo. Redujo estadísticamente ( $P = 0,02$ ) el área bajo la curva de glucosa en sangre (AUC) glicémica. El extracto de semillas de FE también indujo una secreción significativa ( $P = 0,002$ ) de insulina a los 90 min. tras la  
10 administración de glucosa.

#### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-1 a 1-6 ilustran la estructura molecular de excélsido A, excélsido B, nuzhenida, GI3, GI5 y éster dimetilico de oleósido, respectivamente;

15 la figura 2 ilustra la actividad de captación de glucosa (cpm) de compuestos GI5 (5) y nuzhenida (3) para 1 sin tratar, 2, insulina, 3 insulina y MeOH, 4 nuzhenida a concentraciones del 0,004%, el 0,02%, el 0,05% y el 0,1%; 5 GI5 a concentraciones del 0,004%, el 0,02%, el 0,05% y el 0,1%;

20 la figura 3 ilustra la activación relativa de receptor de fusión GAL4/PPAR $\alpha$  mediante extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* L. y 100  $\mu$ M de fenofibrato (control positivo) en comparación con el efecto de DMSO (condiciones de control) (los valores son la media  $\pm$  DE (n=4). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . Prueba de la t de Student);

25 la figura 4 ilustra resultados de glucosa en sangre en ayunas (mg/dL) de ratones tratados con bajo contenido en grasa (LF), alto contenido en grasa (HF) y *Fraxinus* (HF + extracto de FE) tras un tratamiento de 16 semanas;

la figura 5 ilustra los resultados de peso corporal promedio (g) de ratones tratados con bajo contenido en grasa (LF), alto contenido en grasa (HF) y *Fraxinus* (HF + extracto de FE) a diferentes semanas de tratamiento;

30 la figura 6 ilustra el potencial de activación de PPAR $\alpha$  relativo (%) en líneas celulares indicadoras usando concentraciones que oscilaban entre  $10^{-5}$  M - $10^{-9}$  M para el activador de PPAR $\alpha$  sintético selectivo WY 14,643 así como los compuestos aislados a una concentración de  $10^{-4}$  M y una disolución acuosa 1:10 de extracto de semillas de FE, con etiqueta de compuesto: FE19028 (nuzhenida, 3), FE20015 (GI3, 4), FE20031 (éster dimetilico de oleósido, 6), FE21008 (excélsido A, 1) y FE21023 (GI5, 5);

35 la figura 7 ilustra el peso (g) de la grasa omental de ratones individuales de los grupos LF (n = 10), HF (n = 10) y extracto de semillas de FE, respectivamente;

40 la figura 8 ilustra el peso (g) de la grasa retroperitoneal de ratones individuales de los grupos LF (n = 10), HF (n = 10) y extracto de semillas de FE, respectivamente;

la figura 9 ilustra los niveles de insulina en plasma en ayunas (ng/mL) de ratones individuales de los grupos LF (n = 10), HF (n = 10) y extracto de semillas de FE, respectivamente;

45 las figuras 10A y 10B ilustran respectivamente una comparación (mmol/L frente al tiempo) entre extracto de semillas de *Fraxinus Excelsior* L (FE) (1,0 g) y placebo de salvado de trigo correspondiente (1,0 g) sobre la glicemia en voluntarios sanos a los que se les administraron 50 g de glucosa, para (A) glicemia incremental en puntos de tiempo individuales, y (B) área bajo la curva de glucosa en sangre (AUC), siendo los valores la media  $\pm$  EEM. \* $P = 0,02$ , prueba de la t de Student para datos emparejados (n = 16);

50 las figuras 11A y 11B ilustran respectivamente una comparación (mU/L frente al tiempo) entre extracto de semillas de *Fraxinus Excelsior* L (1,0 g) y placebo de salvado de trigo correspondiente (1,0 g) sobre los niveles de insulina en voluntarios sanos a los que se les administraron 50 g de glucosa, para (A) insulinemia incremental en puntos de tiempo individuales, y (B) el área bajo la curva (AUC) insulinémica, siendo los valores la media  $\pm$  EEM. \*\* $P = 0,002$ , prueba de la t de Student (n = 16).

#### Descripción detallada de la invención

Con referencia a los dibujos y a los siguientes ejemplos, ahora se describirá una realización preferida de la presente invención para un extracto de semillas de *Fraxinus excelsior*.

60 Ejemplo de referencia 1

Extracción de secoiridoides a partir de *Fraxinus excelsior* con agua. Se secó un total de 2,5 kg de las semillas de *F. excelsior* en aire y después se trituraron para dar polvo grueso con un tamaño de partícula de aproximadamente 1-2 mm. Se empapó el polvo grueso en agua en un instrumento de percolación a 80-90°C durante 5 horas y se drenó el extracto en agua del instrumento de percolación. Se repitió tres veces el procedimiento de extracción. Se

combinaron entre sí todos los extractos en agua y se concentraron en un evaporador a vacío rotatorio. Tras evaporarse el agua, se obtuvo un total de 550 gramos de extracto en polvo seco. El análisis por HPLC indica que este extracto en polvo contenía dos secoiridoides principales, el 11,4% (peso/peso) de nuzhenida y el 6,2% de GI3. La composición también contenía el 0,19% de 11-éster metílico de oleósido, el 0,41% de excélsido B, el 0,63% de GI5, el 0,2% de salidrósido, junto con algunos secoiridoides minoritarios incluyendo ligstrósido, éster dimetílico de oleósido y excélsido A.

#### Ejemplo de referencia 2

Extracción de secoiridoides a partir de *Fraxinus excelsior* con agua, agua-EtOH y EtOH. Se prepararon 5 muestras y cada muestra contenía 5 gramos de semillas de *F. excelsior*. Se molió cada muestra para dar polvo y se sometió a extracción con disolvente con 200 mL de agua, el 25% de EtOH/el 75% de agua, el 50% de EtOH/el 50% de agua, el 75% de EtOH/ el 25% de agua y EtOH, respectivamente. Tras la extracción durante 24 horas a temperatura ambiente (22-24°C), se evaporaron los disolventes y se analizaron los sólidos residuales mediante HPLC. El contenido en secoiridoides y los salidrósidos se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido en secoiridoides principales y salidrósidos usando diferentes disolventes (resultados expresados como porcentaje en peso).

Compuestos	EtOH	75% de EtOH	50% de EtOH	25% de EtOH	agua
Nuzhenida	9,05	15,04	15,43	14,10	1,50
GI3	9,20	14,77	17,06	9,18	1,14
Éster dimetílico de oleósido	0,57	0,91	0,78	0,74	0,96
Excélsido B	0,06	0,09	0,10	0,12	0,03
GI5	0,91	1,45	1,70	0,83	0,10
Salidrósido	0,08	0,17	0,16	0,18	0,74

#### Ejemplo de referencia 3

Aislamiento de secoiridoides a partir de *F. excelsior*. Se añadieron 3,5 litros de metanol y se mezclaron con 500 gramos de extracto en polvo obtenido a partir del procedimiento mostrado en el ejemplo de referencia 1, durante 3 horas a temperatura ambiente. Se separó la disolución en metanol del polvo mediante un procedimiento de filtración. Se repitió el mismo procedimiento una vez y se combinaron los dos extractos en metanol y se concentraron a presión reducida para proporcionar un total de 54 gramos de extracto en metanol seco. Volvió a disolverse en agua el extracto en metanol y se filtró para eliminar las sustancias no solubles en agua. Se sometió adicionalmente el filtrado a separación cromatográfica en columna de fase inversa sobre resina C-18 lavada con agua y sistema de disolvente en gradiente de MeOH-agua de desde el 10% de MeOH en agua hasta el 100% de MeOH. Se recogió un total de 7 fracciones. Se evaporó cada fracción eluida de columna a vacío y se combinó mediante análisis por HPLC. Se cargaron las fracciones 2, 3 y 7 en una columna cromatográfica cargada con resina de gel de sílice y se eluyó con sistema de cloroformo-metanol comenzando a partir de CHCl<sub>3</sub>, el 10% de MeOH/CHCl<sub>3</sub>, el 20% de MeOH/CHCl<sub>3</sub> hasta el 100% de MeOH. Se compararon las fracciones recogidas a partir de la columna de gel de sílice mediante análisis por HPLC y se sometió repetidamente cada eluato separado a cromatografías en columna sobre resinas MCI GEL CHP-20P y/o Sephadex LH-20 y se eluyeron con sistema de agua-metanol hasta que se obtuvo un único compuesto puro. Se descubrieron dos nuevos compuestos, excélsido A y excélsido B, junto con varios compuestos conocidos, nuzhenida, GI3, GI5, ligstrósido, éster dimetílico de oleósido, 11-éster metílico de oleósido y salidrósido. Se esclarecieron todas las estructuras químicas mediante métodos espectroscópicos.

#### Ejemplo de referencia 4

Elucidación de la estructura de excélsido A y excélsido B: Se obtuvo excélsido A (1) como polvo amorfo. Se determinó su fórmula molecular, C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>, basándose en su EM y se confirmó mediante datos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN (tabla 2). El espectro UV mostró una absorción típica a 232 (sh) nm derivada de un sistema de enol-éter iridoídico conjugado con un grupo carbonilo. El espectro IR mostró grupos funcionales hidroxilo a  $\nu_{\text{máx}}$  3401, éster a 1734, 1717 y éster  $\alpha,\beta$ -insaturado a 1626 cm<sup>-1</sup>. El análisis detallado de sus espectros de correlación <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-RMN y 2D indicó que excélsido A llevaba un resto glucósido de secoiridoide de tipo oleósido que estaba soportado por las señales de protones a  $\delta_{\text{H}}$  7,51 (s, H-3), 5,93 (s, H-1), 6,08 (qd, J = 7,2, 0,8 Hz, H-8), 1,72 (d, J = 7,6 Hz, H<sub>3</sub>-10) y 4,80 (d, J = 8,0 Hz, H-1'), las correspondientes señales de carbono 13- a  $\delta_{\text{C}}$  155,2 (C-3), 94,8 (C-1), 124,7 (C-8), 13,6 (C-10) y 100,5 (C-1'). Dos señales metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3,62 (OCH<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{C}}$  51,9) y 3,70 (OCH<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{C}}$  52,3) mostraron correlación con C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  173,7) y C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  168,6) en el espectro de gHMBC, respectivamente, indicando que excélsido A tenía una unidad de 7,11-éster dimetílico de oleósido [Boros y Stermitz, 1991, J. Nat. Prod., 54, 1173-246]. Aparte de esto, la aparición de señales de RMN adicionales debidas a un resto  $\beta$ -glucopiranosilo ( $\delta_{\text{C}}$  100,6, 77,6, 77,8, 71,6, 75,3 y 70,1) sugirió que A era un 7,11-éster dimetílico de oleósido que llevaba otro glucosilo. Se determinó que la posición del glucosilo estaba unida a C-6' del resto oleósido ya que había un desplazamiento campo abajo de 7,5 ppm de la señal en C-6' y desplazamientos campo arriba de 0,5 y 2,6 ppm en C-3' y C-5',

respectivamente, en comparación con excélsido A con la misma posición de la señal de 7,11-dimetilo oleósido. Esta deducción se respaldó adicionalmente mediante el espectro de correlación gHMBC, en el que se observaron picos cruzados entre H-1'' a  $\delta_H$  4,35 y C-6' a  $\delta_C$  70,1 ppm, así como entre H-6' ( $\delta_H$  4,15 y 3,84 ppm) y C-1'' ( $\delta_C$  105,3 ppm). Se colocó un grupo metilo en una configuración E en un enlace 8,9-olefínico y estaba respaldado por el espectro ROESY en el que se observó una fuerte correlación entre H-10 ( $\delta_H$  1,72) y H-5 ( $\delta_H$  3,96). En el mismo espectro, una correlación entre H-1 ( $\delta_H$  5,93) y H-6 ( $\delta_H$  2,51) sugirió que el glucosilo en C-1 adoptó una configuración  $\beta$ . Por tanto, se determinó que la estructura de excélsido A era el éster metílico del ácido (2S,3E,4S)3-etiliden-2-[(6-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonil)2H-piran-4-acético, denominado excélsido A. Las asignaciones de datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN completas se facilitan en la tabla 2.

Se aisló excélsido B (2) como un polvo amorfo incoloro. Se determinó que su fórmula molecular era  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$  mediante EM y se confirmó mediante datos de RMN. En el espectro UV de 2, además de la absorción típica a 230 nm de un enol-éter iridoídico conjugado con un grupo carbonilo, las absorciones adicionales a 275 y 283 nm indicaron la existencia de un fenol. IR mostró hidroxilo a  $\nu_{\text{máx}}$  3400, éster  $\alpha,\beta$ -insaturado a 1701, 1636, y anillo aromático a  $1518\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$  de excélsido B presentaron las señales típicas debidas a un resto oleósido: la señal olefínica a  $\delta_H$  7,50 (s, H-3),  $\delta_C$  155,2 (C-3), un acetal alílico a  $\delta_H$  5,94 (s, H-1),  $\delta_C$  94,7 (C-1), una señal anomérica de glucosilo a  $\delta_H$  4,82 (d, H-1'),  $\delta_C$  100,3 (C-1'), un protón olefínico de grupo etilideno a  $\delta_H$  6,05 (d, H-8),  $\delta_C$  124,8 (C-8) y metilo del etilideno a  $\delta_H$  1,61 (d, H3-10),  $\delta_C$  13,6 (C-10). Las señales de feniletanoide observadas así como un sistema de espín AA'BB' en el anillo aromático a  $\delta_H$  6,71 (2H, dd, J = 6,8, 2,8 Hz) y  $\delta_H$  7,02 (2H, dd, J = 6,8, 2,8 Hz) sugirieron un patrón sustituido en para del feniletanoide. La correlación de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de largo alcance encontrada en gHMBC entre H-1'' a  $\delta_H$  4,26 y C-7 a  $\delta_C$  67,0 ppm sugirió que el feniletanol estaba unido en la posición C-7, lo que relacionaba la estructura de excélsido B a ligstrósido, un éster de oleósido metílico de parahidroxifeniletanol [Takenaka *et al.*, 2000, *Phytochemistry*, 55, 275-84]. De manera similar al excélsido A, se sugirió que la unidad de  $\beta$ -glucopiranosilo adicional aparente en excélsido B estaba unida en C-6'. Esto se confirmó mediante desplazamiento químico campo abajo de 7,3 ppm en la señal de C-13 en C-6' de excélsido B y desplazamientos campo arriba de 0,7 y 2,9 ppm en C-3' y C-5', respectivamente, en comparación con los de ligstrósido. Se observó una confirmación adicional de tal conexión en el espectro gHMBC en el que la fuerte correlación entre la señal anomérica del glucosilo a  $\delta_H$  4,31 (H-1''') y a  $\delta_C$  70,1 (C-6'). Se asignó la posición del grupo metilo a C-11 debido al pico cruzado de largo alcance observado de las señales a  $\delta_H$  3,69 (OCH<sub>3</sub>) y  $\delta_C$  168,7 (C-11) en el espectro gHMBC. Por tanto, el compuesto excélsido B se denominó éster etílico del ácido (2S,3E,4S)3-etiliden-2-[(6-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosil)oxi]-3,4-dihidro-5-(metoxicarbonil)2-(4-hidroxifenil)2H-piran-4-acético, denominado excélsido B. Las asignaciones de datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN se facilitan en la tabla 2.

Tabla 2. Datos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN y HMBC para compuestos excélsido A (1) y excélsido B (2) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

N.º	1			2		
	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC (H a C)	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC (H a C)
1	5,93 s	94,8 d	8, 1'	5,94 s	94,7 d	8, 1'
3	7,51 s	155,2 d	1, 4, 5, 11	7,50 s	155,2 d	1, 4, 5, 11
4		109,3 s			109,3 s	
5	3,96 dd (9,0, 4,3)	31,9 d	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11	3,95 dd (9,6, 4,0)	32,0 d	7, 11
6	2,76 dd (14,4, 4,4) 2,51 dd (14,0, 10,0)	41,1 t	4, 5, 7, 9 4, 5, 7, 9	2,72 dd (14,0, 4,0) 2,50 dd (14,0, 9,6)	41,3 t	7 7
7		173,7 s			173,4 s	
8	6,08 dq (7,2, 0,8)	124,7 d	1, 5, 10	6,05 d (6,8)	124,8 d	1, 5, 9, 10
9		130,4 s			130,1 s	
10	1,72 d (7,6)	13,7 q	8, 9	1,61 d (7,2)	13,6 q	8, 9
11		168,7 s			168,7 s	
OCH <sub>3</sub>	3,70 s	52,3 q	11	3,69 s	51,9 q	11
OCH <sub>3</sub>	3,62 s	51,9 q	7			
1'	4,80 d (8,0)	100,6 d	1	4,82 d (7,6)	100,4 d	1, 2'
2'	3,24-3,68 m	77,6 d		3,12-3,55 m	77,5 d	
3'	3,24-3,68 m	77,8 d		3,12-3,55 m	77,8 d	
4'	3,24-3,68 m	71,6 d		3,12-3,55 m	71,5 d	
5'	3,24-3,68 m	75,3 d		3,12-3,55 m	75,1 d	
6'	4,15 dd (12,0, 1,6) 3,84 d.a. (12,0)	70,1 t	1'''	4,15 d (10,4) 3,81 dd (11,6, 2,4)	70,1 t	5', 1'''
1''				4,26 m 4,06 m	67,0 t	7, 2'', 3'' 7, 2'', 3''
2''				2,80 t (6,8)	35,2 t	
3''					130,3 s	
4''				7,02 dd (6,8, 2,8)	131,1 d	2'', 3'', 6''
5''				6,71 dd (6,8, 2,8)	116,4 d	3'', 4'', 6''
6''					157,0 s	

(continuación)

N.º	1			2		
	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC (H a C)	$\delta_H$	$\delta_C$	HMBC (H a C)
7''				6,71 dd (6,8, 2,8)	116,4 d	
8''				7,02 dd (6,8, 2,8)	131,1 d	
1'''	4,35 d (8,0)	105,2 d	6'	4,31 d (8,0)	105,2 d	6'
2'''	3,24-3,68 m	74,7 d		3,12-3,55 m	74,7 d	
3'''	3,24-3,68 m	77,7 d		3,12-3,55 m	77,6 d	
4'''	3,24-3,68 m	71,5 d		3,12-3,55 m	71,4 d	
5'''	3,24-3,68 m	77,8 d		3,12-3,55 m	77,6 d	
6'''	3,98 dd (9,6, 4,4)	62,7 t		3,74 dd (12,0, 6,8)	62,6 t	
	3,75 dd (12,0, 6,8)			3,62 dd (12,0, 6,8)		

Desplazamientos químicos  $\delta$  expresados en partes por millón (ppm) frente a tetrametilsilano (TMS) como patrón de referencia; la multiplicidad de señal se notifica como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), doblete de dobletes (dd), doblete de cuartetos (dq) y multiplete (m); la constante de acoplamiento entre paréntesis se expresa como Hz; el disolvente empleado para tomar los espectros de RMN es CD<sub>3</sub>OD.

## Ejemplo 5

Efecto inhibitorio de GI5 (5) y nuzhenida (3) sobre células 3T3-L1 no diferenciadas. El componente principal del aumento de peso es la deposición de tejido adiposo en el cuerpo mediante el procedimiento de adipogénesis. La adipogénesis se caracteriza por un aumento en el tamaño y el número de células adiposas. Los secoiridoides, GI5 y nuzhenida aislados a partir de *F. excelsior*, han mostrado una actividad inhibitoria de la adipogénesis significativa y leve, respectivamente, bloqueando la ruta de células 3T3-L1 no diferenciadas para dar adipocitos diferenciados para obtener un efecto sobre el control del peso corporal y la pérdida de grasa corporal. Se indujeron preadipocitos 3T3-L1 para diferenciarse con cóctel hormonal de metilisobutilxantina, dexametasona e insulina (MDI) en presencia o ausencia de compuestos. Diez días tras la inducción de diferenciación, se sometieron a ensayo las células tratadas para determinar su actividad de captación de glucosa respectiva, que es una medida indirecta de la diferenciación (adipogénesis) porque los preadipocitos no pueden realizar la captación de glucosa mediada por transportador de glucosa 4 (GLUT4), inducida por insulina, mientras que los adipocitos completamente diferenciados pueden realizar esta captación. Se usaron compuestos, GI5 y nuzhenida, a cuatro concentraciones diferentes: el 0,004%, el 0,02%, el 0,05% y el 0,1%. Se usaron células no tratadas (no diferenciadas) como control negativo mientras que se usó insulina como control positivo. También se usó metanol (MeOH), el disolvente de los compuestos, como control. El resultado mostró que GI5 y nuzhenida aislados a partir de *F. excelsior* presentan una actividad inhibitoria de la adipogénesis significativa y leve, respectivamente, bloqueando la ruta de células 3T3-L1 no diferenciadas para dar adipocitos diferenciados para obtener un efecto sobre el control del peso corporal y pérdida de grasa corporal (véase la figura 2).

## Ejemplo de referencia 6

Activación de PPAR-alfa de *Fraxinus excelsior*. Los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) son receptores nucleares que controlan muchos procesos celulares y metabólicos. PPAR-alfa se expresa predominantemente en el hígado y en el que tiene un papel crucial en el control de la oxidación de ácidos grasos (Reddy y Hashimoto, 2001, Annu Rev Nutr., 21, 193-230). La inducción de oxidación de ácidos grasos mediante la activación de PPAR-alfa mejora los perfiles lipídicos en plasma. En una variedad de modelos de ratón, los agonistas de PPAR-alfa reducen los triglicéridos en plasma, reducen la adiposidad y mejoran la esteatosis hepática y muscular, mejorando por consiguiente la sensibilidad a la insulina y reduciendo la glucosa en sangre [Guerre-Millo *et al*, 2000, J. Biol. Chem., 275, 16638-42 y Kim *et al*, 2003, Diabetes, 52, 1770-8].

Se ha demostrado que el extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* obtenido usando agua como disolvente tal como se describió en el ejemplo 2 (extracto de FE) activa PPAR-alfa. Se calcularon las activaciones relativas de PPAR-alfa mediante extracto de FE y fenofibrato (control positivo) en comparación con DMSO (condiciones de control) como señal de luminiscencia de luciferasa (un indicador génico) obtenida a partir de los compuestos activos tras la incubación con células transfectadas con receptor GAL4/PPAR-alfa. En primer lugar, se transfectaron de manera transitoria células COS-7 (cultivadas en DMEM + el 10% de FCS) con una proteína de fusión GAL4/PPAR-alfa y un constructo de ADN que llevaba luciferasa. Para la transfección, en primer lugar se obtuvo el plásmido pGALS-TK-pGL3 insertando cinco copias del sitio de unión a ADN de GAL4 (factor de transcripción de levadura) delante del promotor de timidina cinasa del plásmido pTK-pGL3. Después, se construyó el plásmido pGAL4-hPPAR-alfa mediante amplificación por PCR de los dominios DEF de hPPAR-alfa (aa 180-464). Se clonaron los productos de PCR resultantes en pBD-GAL4 (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) y posteriormente se subclonó la quimera en el vector pCDNA3. Tras la transfección, se incubaron células COS-7 durante 24 h con 0  $\mu$ g/mL (condiciones de control), 1  $\mu$ g/mL, 3  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 30  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 300  $\mu$ g/mL y 1.000  $\mu$ g/mL de extracto de FE, o 100  $\mu$ M de fenofibrato (control positivo). Se usó DMSO como disolvente. Tras la incubación, se recogieron las células y se realizó un ensayo de luciferasa. La activación de PPAR-alfa mediante extracto de FE y fenofibrato dio como

resultado la expresión de luciferasa y el consiguiente aumento de las señales luminiscentes, que se midieron con un espectrofotómetro Tecan Ultra (Tecan, Austria). Los resultados se expresan como la activación relativa de GAL4/PPAR-alfa proporcional a la señal luminiscente emitida como resultado del extracto de FE y de fenofibrato en comparación con la actividad luminiscente del control (DMSO). Los resultados se notifican como la media  $\pm$  DE de cuatro ensayos para cada prueba (figura 3). Se calcularon diferencias entre grupos usando la prueba de la t de Student (XLSTAT 2008, Addinsoft™, EE.UU.). Los resultados de la activación de PPAR-alfa mediante extracto de FE se muestran en la figura 3. El extracto de FE alcanzó el 18% de activación de PPAR-alfa a 1.000  $\mu$ g/mL. Los resultados se expresan como porcentaje de fenofibrato, un activador de PPAR-alfa usado como compuesto de referencia.

La capacidad del extracto de FE para activar PPAR-alfa pudo explicar, en parte, el efecto hipoglicemiante observado en estudios con animales.

#### Ejemplo de referencia 7

Actividad hipoglicémica del extracto de FE sobre ratones C57BL/6J macho. Se dividieron ratones C57BL/6J macho en tres grupos: 1) grupo control negativo en el que 20 ratones macho fueron sometidos a dieta con bajo contenido en grasa (LF) con una ingesta diaria de aproximadamente 10 kcal; 2) grupo de control positivo en el que 20 ratones fueron alimentados con una dieta con alto contenido en grasa (HF) y una ingesta diaria de aproximadamente 60 kcal y debido a la alimentación con alto contenido en grasa, este grupo de ratones desarrolló obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia; 3) grupo con el 0,5% de extracto de FE en el que 10 ratones macho fueron alimentados con dieta con alto contenido en grasa como los del grupo 2, pero también se mezcló la dieta con el 0,5% de extracto de FE. La ingesta de alimentos y fluidos y el peso corporal se midieron semanalmente. Se monitorizaron signos de anomalía y posible toxicidad. Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola y se midió el nivel de glucosa en sangre en ayunas usando un medidor de glucosa en sangre. Se determinaron datos basales antes del experimento. No había ninguna diferencia estadística entre los tres grupos.

Tras 16 semanas de tratamiento, los ratones en el grupo tratado con extracto de FE mostraron niveles de glucosa en sangre en ayunas significativamente inferiores a los de los ratones en el grupo de control con alto contenido en grasa ( $p < 0,001$ ), lo que indicó un fuerte efecto hipoglicémico de extracto de FE (figura 4).

#### Ejemplo 8

Actividad de reducción del peso corporal del extracto de FE en ratones C57BL/6J macho. Se midió el peso corporal de cada ratón de los mismos grupos que en el ejemplo de referencia 7. No había ninguna diferencia estadística entre los tres grupos de peso corporal basal. Tras 16 semanas de tratamiento, todos los ratones en los grupos tratados con alto contenido en grasa (grupo 2 y 3) habían aumentado significativamente más de peso corporal que aquellos en el grupo tratado con bajo contenido en grasa. Sin embargo, el grado de aumento de peso corporal en el grupo de FE fue muy inferior en comparación con el grupo de control positivo, lo que indica una actividad del extracto de FE sobre el control del peso corporal (figura 5).

#### Ejemplo de referencia 9

Actividad PPAR-alfa de excélsido A (1), GI3 (4) y éster dimetilico de oleósido (6). Se sometieron a prueba cinco compuestos individuales aislados a partir de extracto en agua de semillas de *Fraxinus excelsior* (FE) para determinar la actividad PPAR-alfa. El activador de PPAR-alfa sintético y selectivo, WY14,643, sirvió como control positivo y DMSO, que se usó para disolver estos compuestos, como control negativo en el ensayo. Cinco secoiridoides puros fueron parcialmente activos a una concentración de  $10^{-4}$  M. Los compuestos excélsido A, éster dimetilico de oleósido y GI3 mostraron buena actividad (figura 6).

#### Ejemplo 10

Reducción de grasa del extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* (FE) en ratones C57BL/6J macho. Al final del experimento (del ejemplo de referencia 7), tras 16 semanas de tratamiento, se anestesiaron los ratones de todos los grupos y se sacrificaron. Se extrajo y se pesó la grasa omental y retroperitoneal de ratones individuales. Los resultados mostraron que el extracto de semillas de FE disminuye en un 18,3% el aumento de grasa omental y en un 17,8% el aumento de grasa retroperitoneal, respectivamente (figuras 7 y 8).

#### Ejemplo de referencia 11

Niveles de insulina en plasma en ayunas del extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* (FE) en ratones C57BL/6J macho. Al final del experimento (del ejemplo de referencia 7), se determinaron los niveles de insulina en plasma en ayunas usando un kit Elisa para ratones. Los ratones tratados con extracto de semillas de *Fraxinus* tenían niveles de insulina en plasma en ayunas significativamente inferiores en comparación con los del grupo de control con alto contenido en grasa ( $P < 0,05$ ) (figura 9).

## Ejemplo de referencia 12

Actividad de reducción del azúcar en sangre del extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* (FE) en seres humanos. Para evaluar el efecto de las composiciones dadas a conocer en el presente documento en seres humanos, se realizó un estudio con diseño aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo y con cruce en seres humanos. Se incluyó un total de dieciséis individuos sanos (11 hombres y 5 mujeres) de la India. Se requirió que los sujetos tuvieran entre 25 y 55 años de edad con un índice de masa corporal de  $26 \pm 2,2 \text{ kg/m}^2$  y glucosa en sangre en ayunas de  $4,4 \pm 0,09 \text{ mmol/L}$ . Se usó extracto de semillas de FE para el grupo de tratamiento y se usó polvo de salvado de trigo para el grupo de placebo. La dosificación diaria por persona en este estudio fue de 1 g de extracto de semillas de FE. Se instruyó a los sujetos a que tomaran o bien dos cápsulas de extracto de semillas de FE (500 mg cada una) o bien dos cápsulas de placebo (500 mg de salvado de trigo cada una) por vía oral como una única dosis antes de la exposición a glucosa (50 g en 100 mL de agua) para la evaluación de la respuesta glicémica. Tras un periodo de lavado de una semana, se cambiaron los dos grupos entre sí. Durante el estudio, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción en el dedo a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Se administró el extracto de prueba/placebo con 100 mL de agua inmediatamente después de tomar la muestra de sangre en ayunas a los 0 min. Entonces, el sujeto ingirió la bebida de glucosa en el plazo de 5-8 minutos (50 g en 100 mL de agua, D-glucosa, Qualigens Co., Glaxo India). En este momento se inició el cronómetro. Se extrajeron muestras de sangre adicionales mediante punción en el dedo a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. tras el inicio de la bebida de glucosa. Se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre completa en el capilar usando un glucómetro de Bayer y una tira reactiva con glucosa de Essentia. Se calculó el área bajo la curva (AUC) incremental positiva para los grupos tanto tratado con placebo como tratado con FE para determinar las concentraciones de glucosa en sangre a diferentes intervalos de tiempo. Se calcularon diferencias significativas entre grupos usando una prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral. Se realizaron análisis usando un software XLSTAT 2008 (Addinsoft™, EE.UU.). Se fijó la significación estadística a  $P < 0,05$ . Todos los datos se notificaron como media  $\pm$  EEM.

La gráfica, a partir de la comparación por parejas, de glicemia incremental mostró una disminución en los niveles de glucosa posprandial mediante extracto de semillas de FE, durante la duración del experimento desde 15 min. ( $2,0 \pm 0,26 \text{ mmol/L}$  frente a  $1,7 \pm 0,21 \text{ mmol/L}$ ), 30 ( $4,0 \pm 0,41 \text{ mmol/L}$  frente a  $3,7 \pm 0,33 \text{ mmol/L}$ ), 45 ( $4,2 \pm 0,41 \text{ mmol/L}$  frente a  $3,7 \pm 0,47 \text{ mmol/L}$ ), 60 ( $3,4 \pm 0,46 \text{ mmol/L}$  frente a  $3,4 \pm 0,41$ ), 90 ( $1,8 \pm 0,38 \text{ mmol/L}$  frente a  $1,6 \pm 0,31 \text{ mmol/L}$ ) hasta 120 ( $0,58 \pm 0,29 \text{ mmol/L}$  frente a  $0,21 \pm 0,27 \text{ mmol/L}$ ) minutos en comparación con placebo de salvado de trigo correspondiente (figura 10A). La prueba de la t de Student para datos emparejados indicó que las diferencias ( $299,8 \pm 28,8 \text{ min. mmol/L}$  frente a  $273,2 \pm 25,2 \text{ min. mmol/L}$ ) en el efecto del tratamiento (FE frente a placebo) sobre el AUC media fueron estadísticamente significativas ( $P = 0,02$ ). Los resultados se presentan en la figura 10B.

## Ejemplo de referencia 13

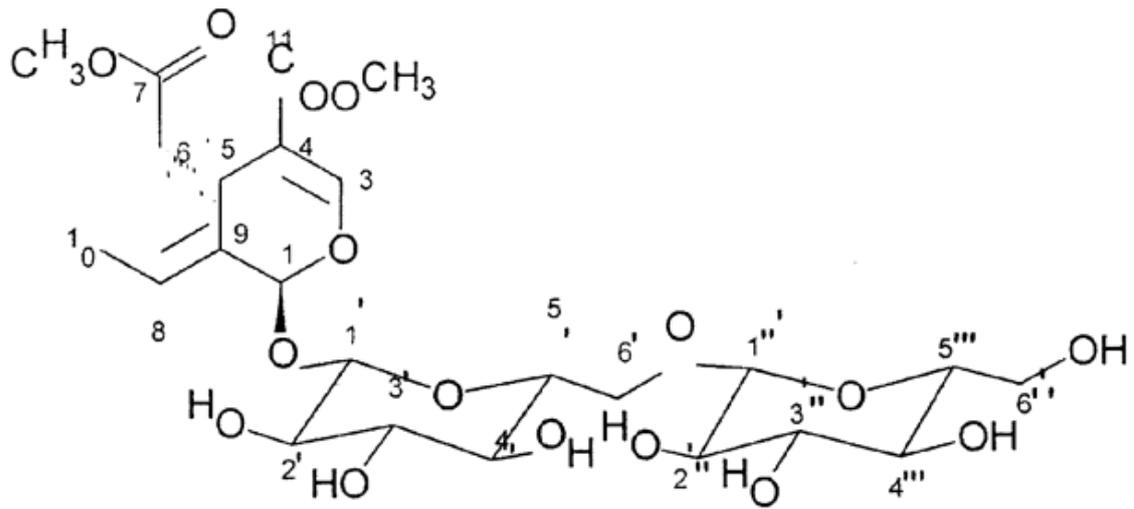
Efecto insulínico agudo de extracto de semillas de *Fraxinus Excelsior* (FE) sobre seres humanos. Se evaluó el efecto insulínico de la composición como objetivo adicional del estudio clínico descrito en el ejemplo 12. Se extrajeron muestras de sangre venosa (7-8 mL) a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. en FE de prueba/placebo de sujetos sanos tratados en tubos de separación de suero. Se dejó coagular la sangre durante 15 minutos, y después se centrifugó a  $1.500 \times g$  durante 10 minutos. Después se analizó el suero resultante para detectar insulina usando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA). Se calculó el área bajo la curva (AUC) insulínica incremental positiva para grupos tanto tratados con placebo como tratados con FE para determinar niveles de insulina a diferentes intervalos de tiempo. Se calcularon diferencias significativas entre grupos usando una prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral. Se realizaron análisis usando un software XLSTAT 2008 (Addinsoft™, EE.UU.). Se fijó la significación estadística a  $P < 0,05$ . Todos los datos se notifican como media  $\pm$  EEM. FE ( $55,5 \pm 4,6 \text{ mU/L}$ ) indujo una secreción significativa ( $P = 0,002$ ) de insulina a los 90 minutos en comparación con placebo ( $43,5 \pm 5,0 \text{ mU/L}$ ) (figura 11A). No se observó ninguna diferencia significativa en el AUC insulínica media (0-120 minutos) en el grupo tratado con FE ( $6.041,6 \pm 340,5 \text{ min.mU/L}$ ) en comparación con placebo ( $5.996,3 \pm 594,58 \text{ min.mU/L}$ ) (figura 11B).

La estimulación de la secreción de insulina a los 90 min. parece ser una acción directa del FE sobre células del islote pancreáticas que volvieron a la normalidad al final del estudio (120 minutos). Esto puede reducir la resistencia a la insulina y mejorar la sensibilidad a la insulina en tales casos. Además, dado que no hay ninguna diferencia significativa en el AUC insulínica media entre el tratamiento y el placebo, el uso de extracto es seguro sin hiperinsulinemia resultante en las siguientes horas tras el tratamiento.

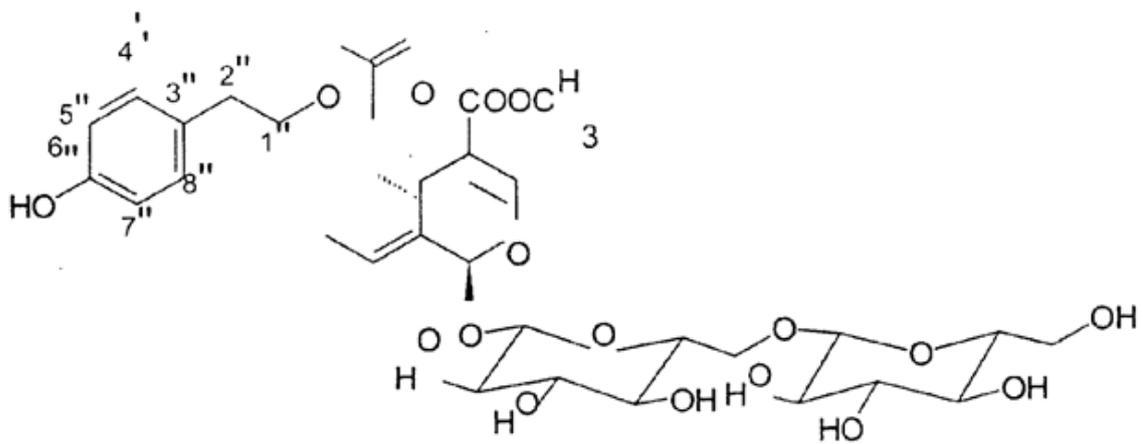
Debe entenderse que la cantidad eficaz del extracto de FE puede variar dependiendo del peso del animal o la persona que toma el tratamiento, tal como conocen los expertos habituales en la técnica. Además, el extracto de FE puede administrarse mediante cualquier medio convencional, en una formulación que da como resultado un líquido, polvo, o comprimido oblongo, comprimido o cápsula u otra forma de medicamento convencional, junto con cargas, aditivos, aglutinantes, excipientes, aromatizantes y similares tales como se usen comúnmente en especialidades farmacéuticas publicitarias y productos de complemento dietético.

**REIVINDICACIONES**

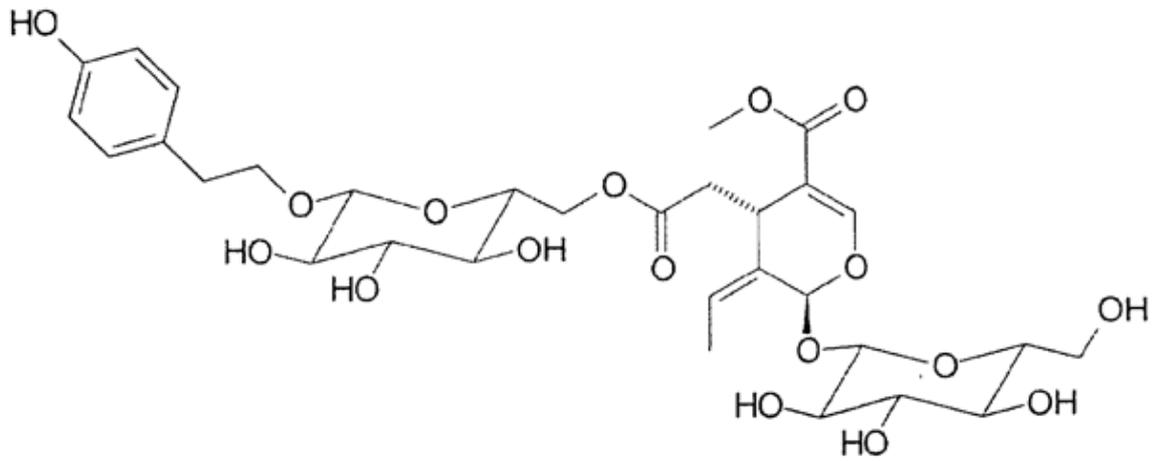
1. Extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* que comprende GI5 o nuzhenida para su uso en un método terapéutico de control del peso corporal o reducción de la grasa corporal.
- 5 2. El extracto para su uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es en un ser humano.
3. El extracto para su uso según la reivindicación 1, en el que el extracto comprende nuzhenida.
- 10 4. Uso de un extracto de semillas de *Fraxinus excelsior* que comprende GI5 o nuzhenida en la preparación de un medicamento para su uso en un método terapéutico de control del peso corporal o reducción de la grasa corporal.
- 15 5. El uso según la reivindicación 4, en el que el tratamiento es en un ser humano.
6. El uso según la reivindicación 4, en el que el extracto comprende nuzhenida.



1. EXCÉLSIDO A  
**FIG. 1-1**

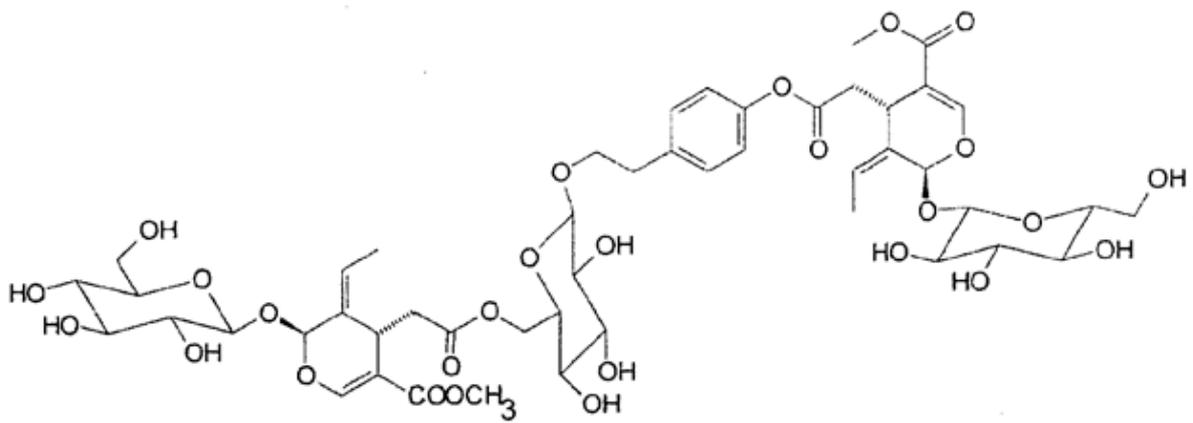


2. EXCÉLSIDO B  
**FIG. 1-2**



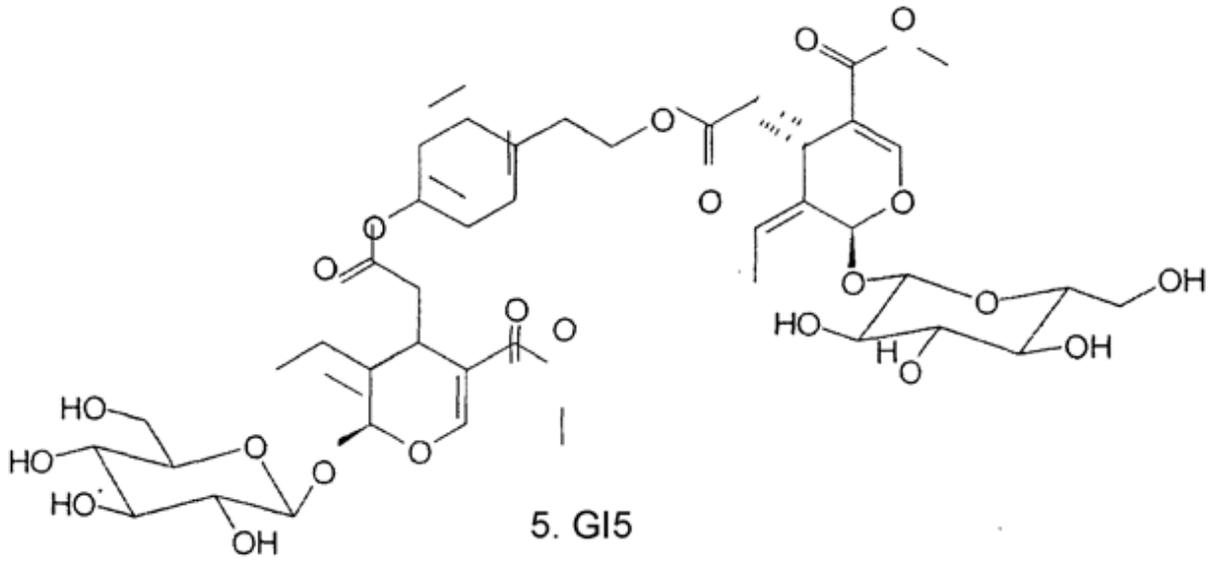
3: NUZHENIDA

**FIG. 1-3**

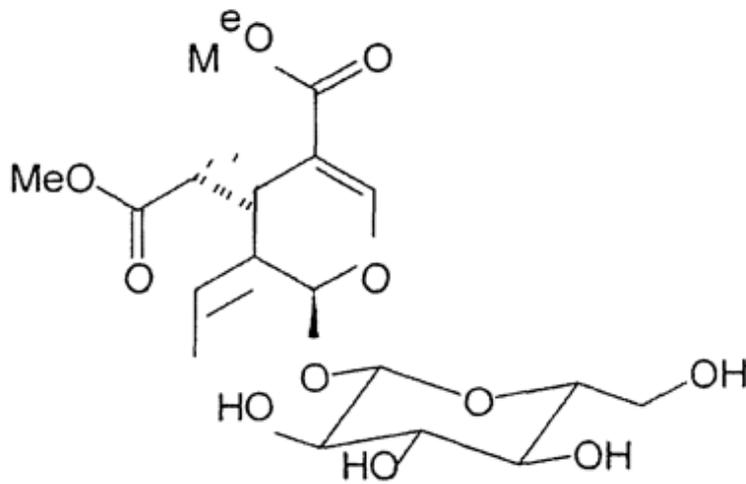


4: GI3

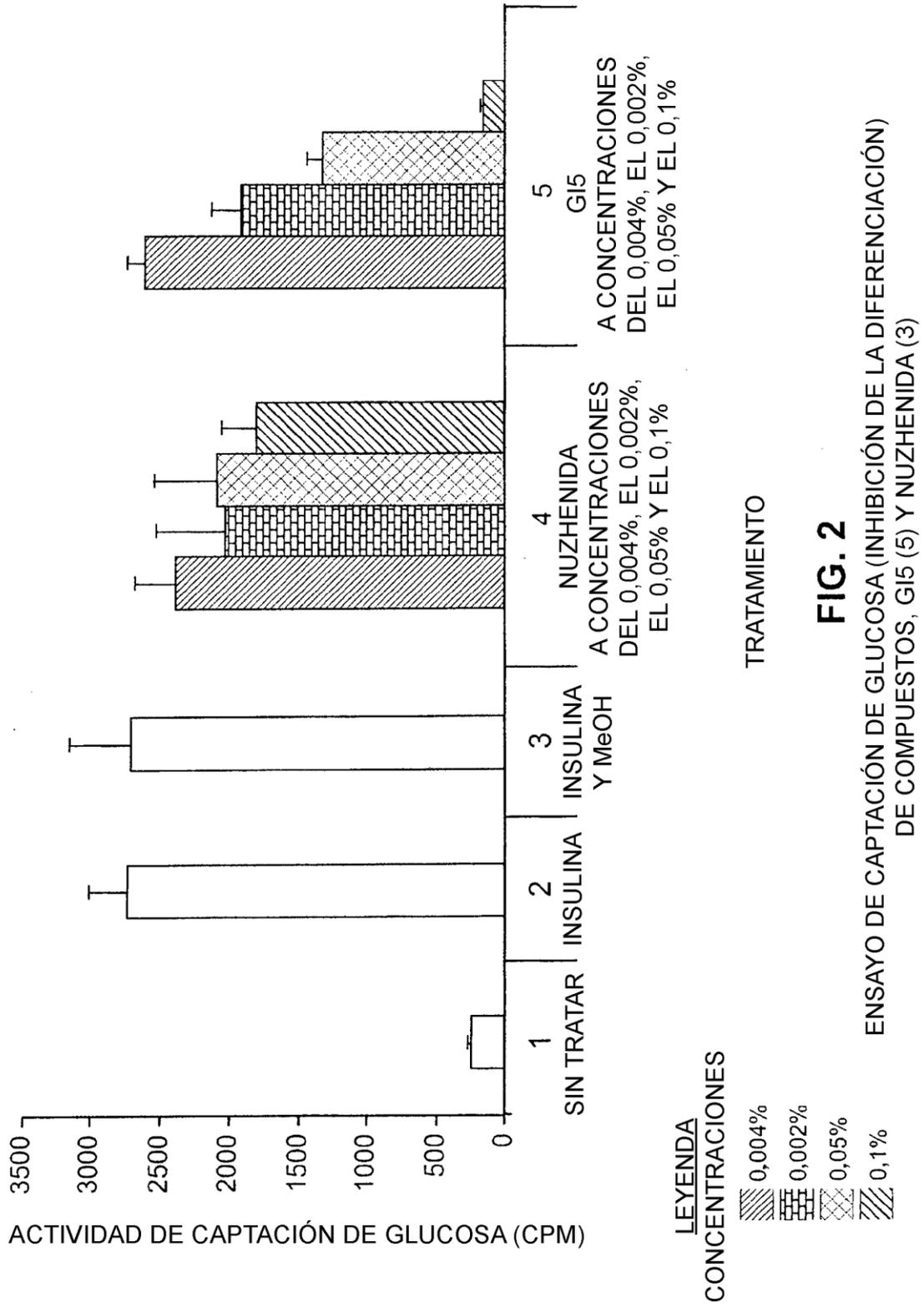
**FIG. 1-4**



**FIG. 1-5**



**FIG. 1-6**



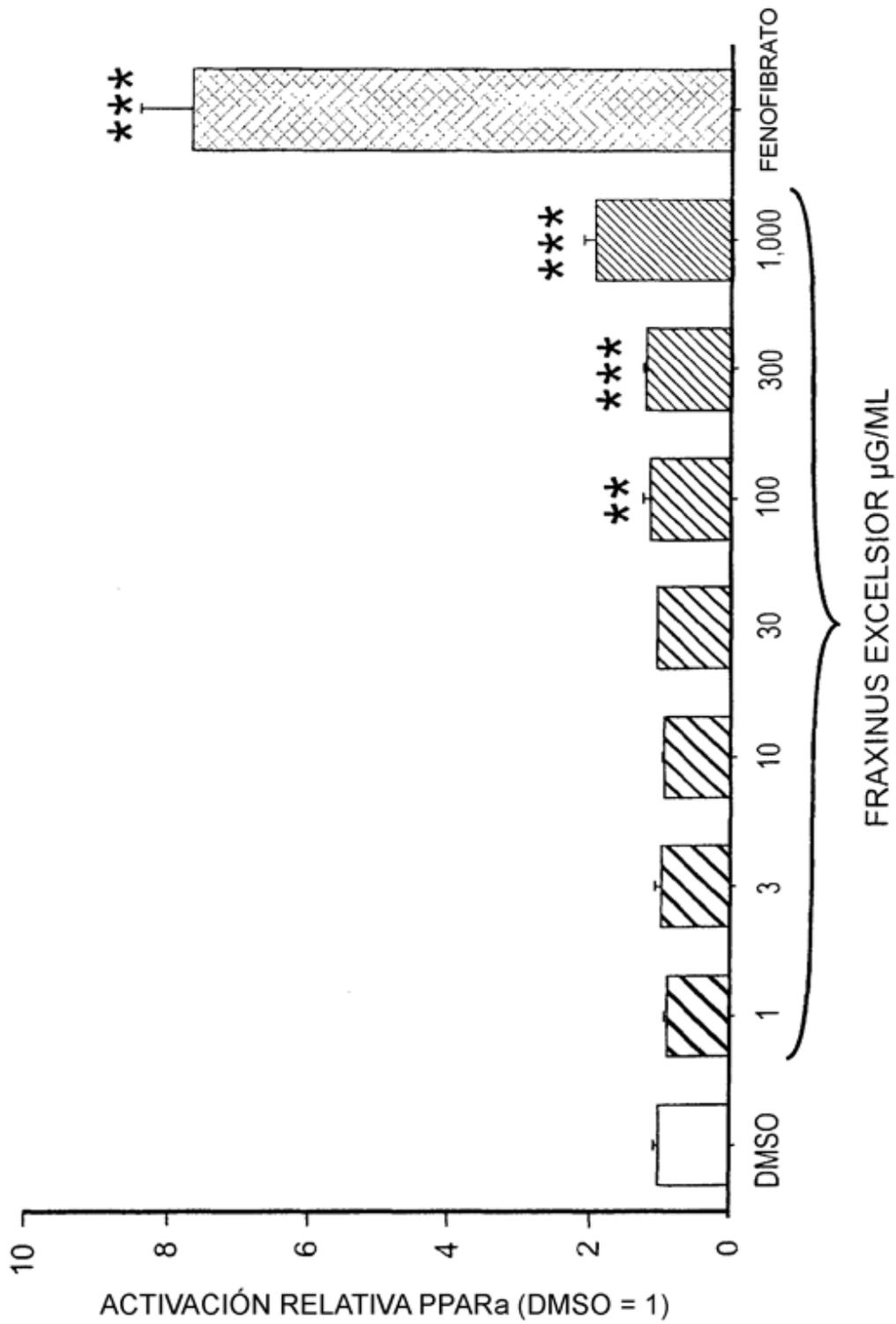


FIG. 3

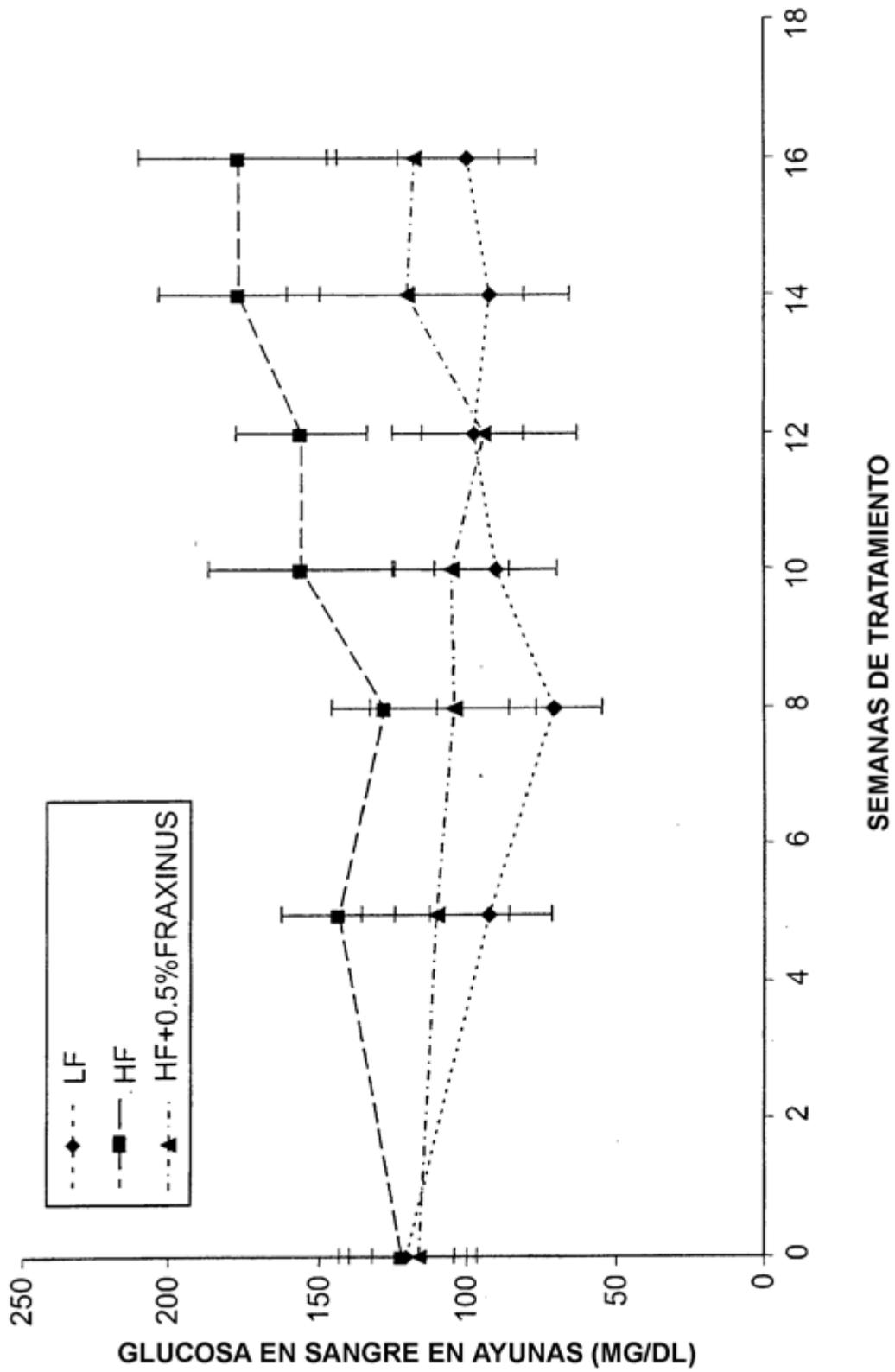


FIG. 4

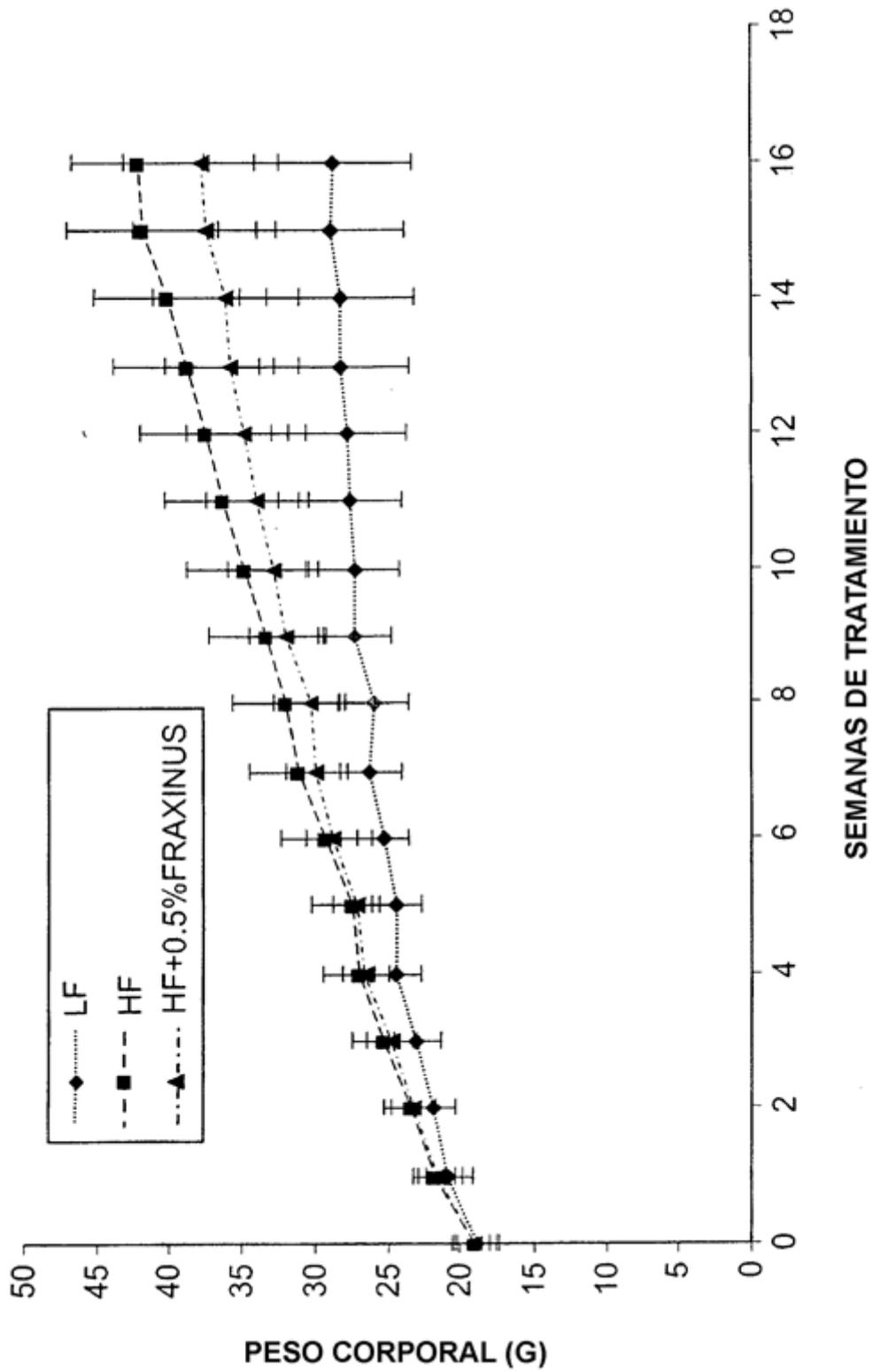


FIG. 5

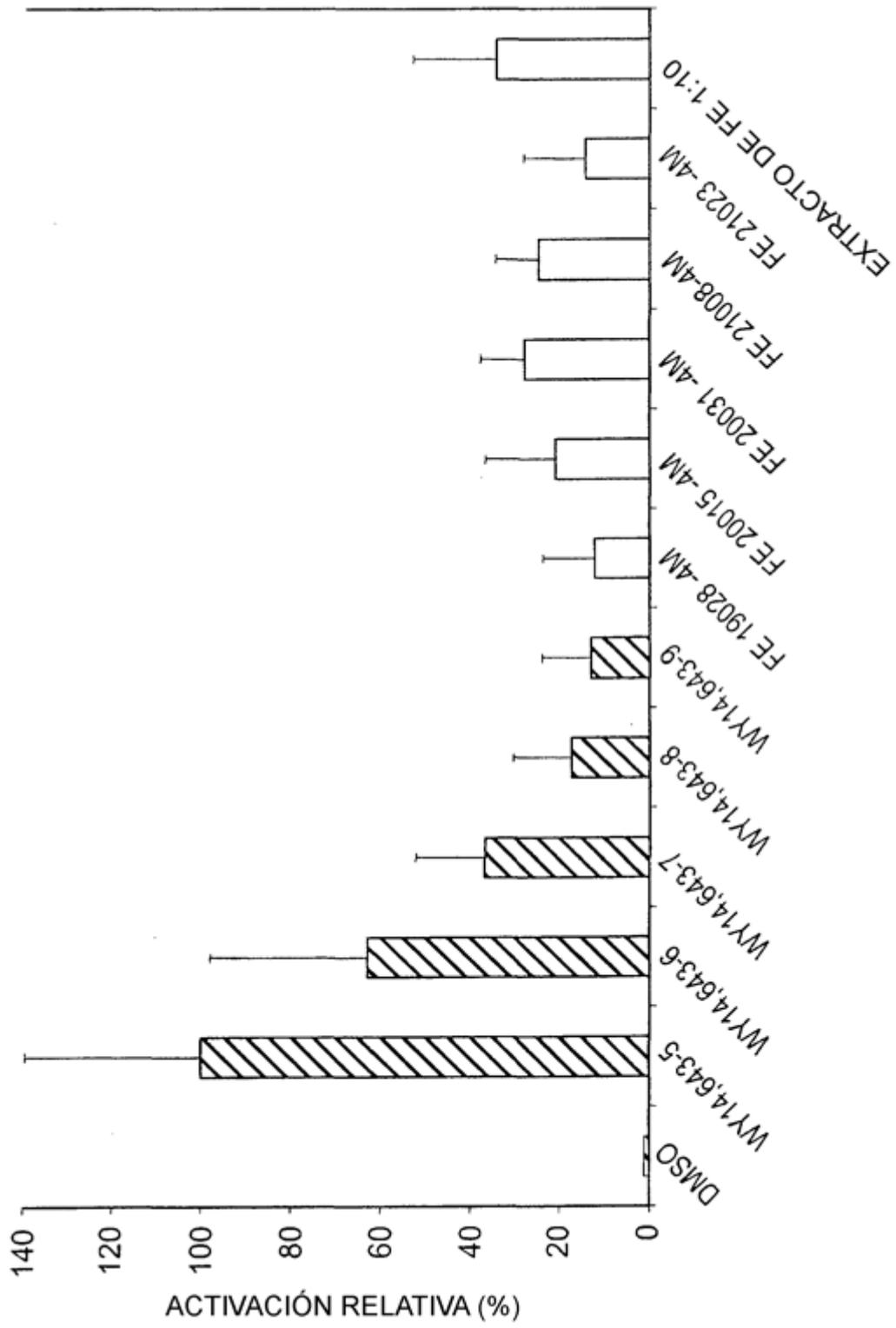


FIG. 6

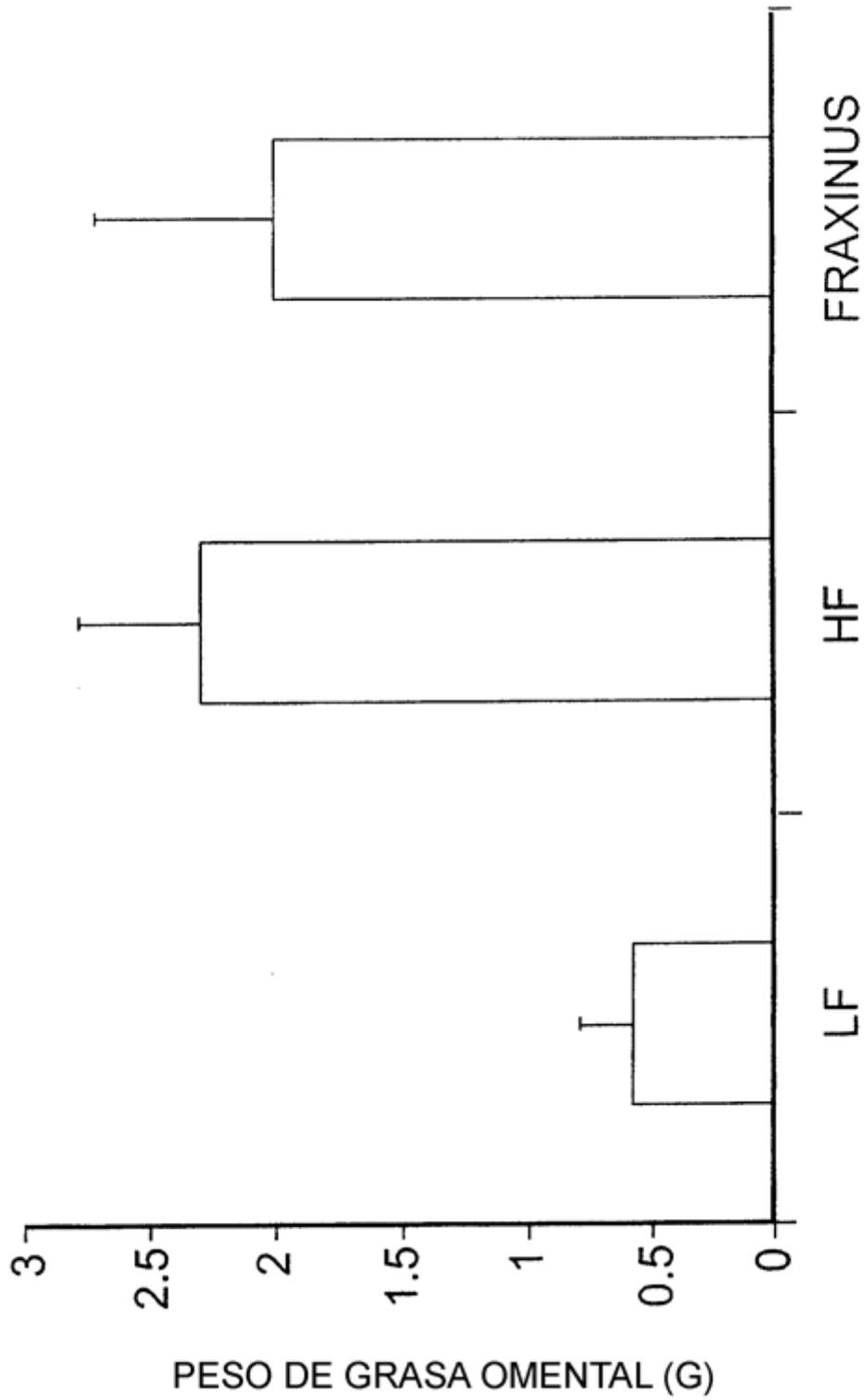


FIG. 7

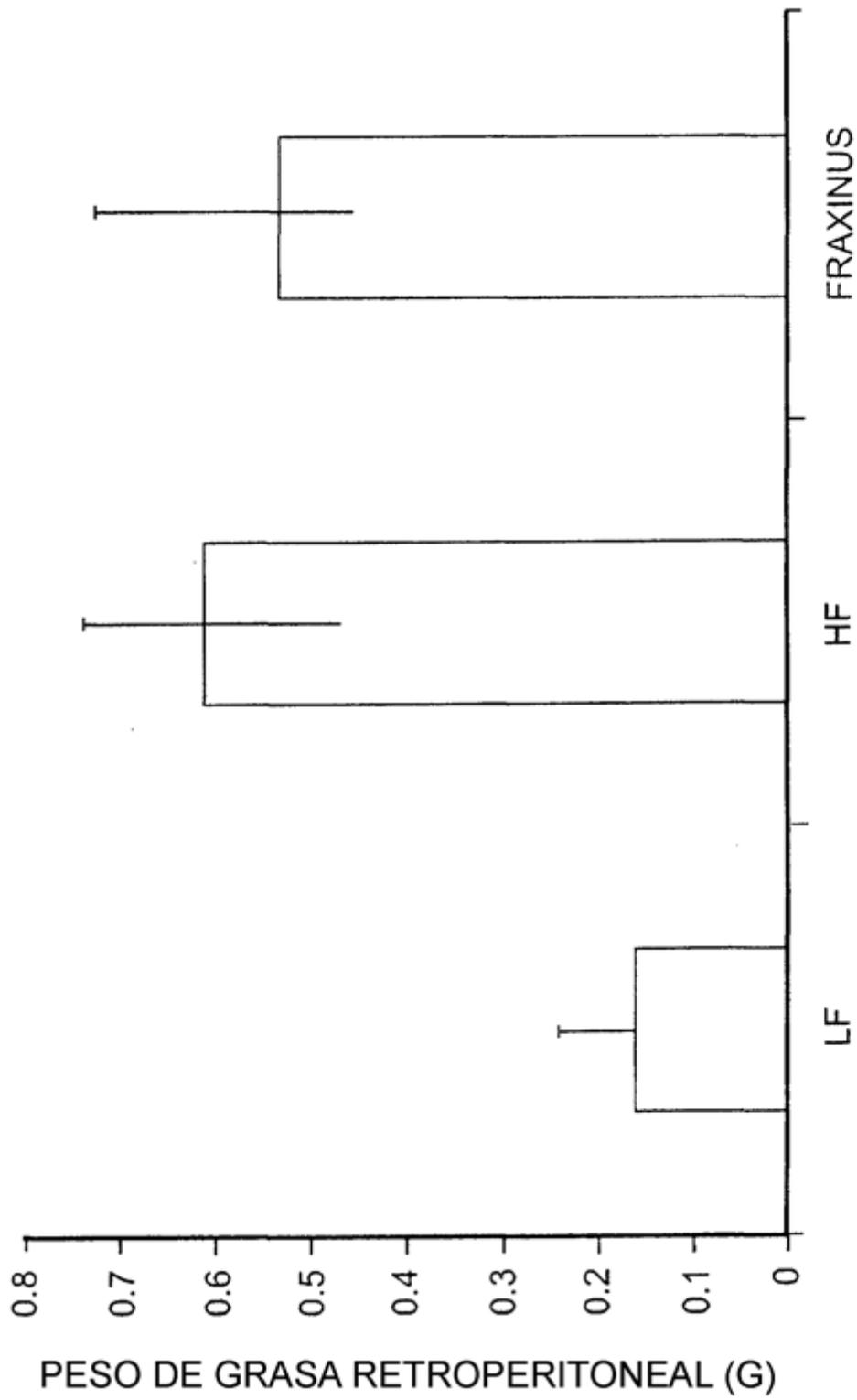


FIG. 8

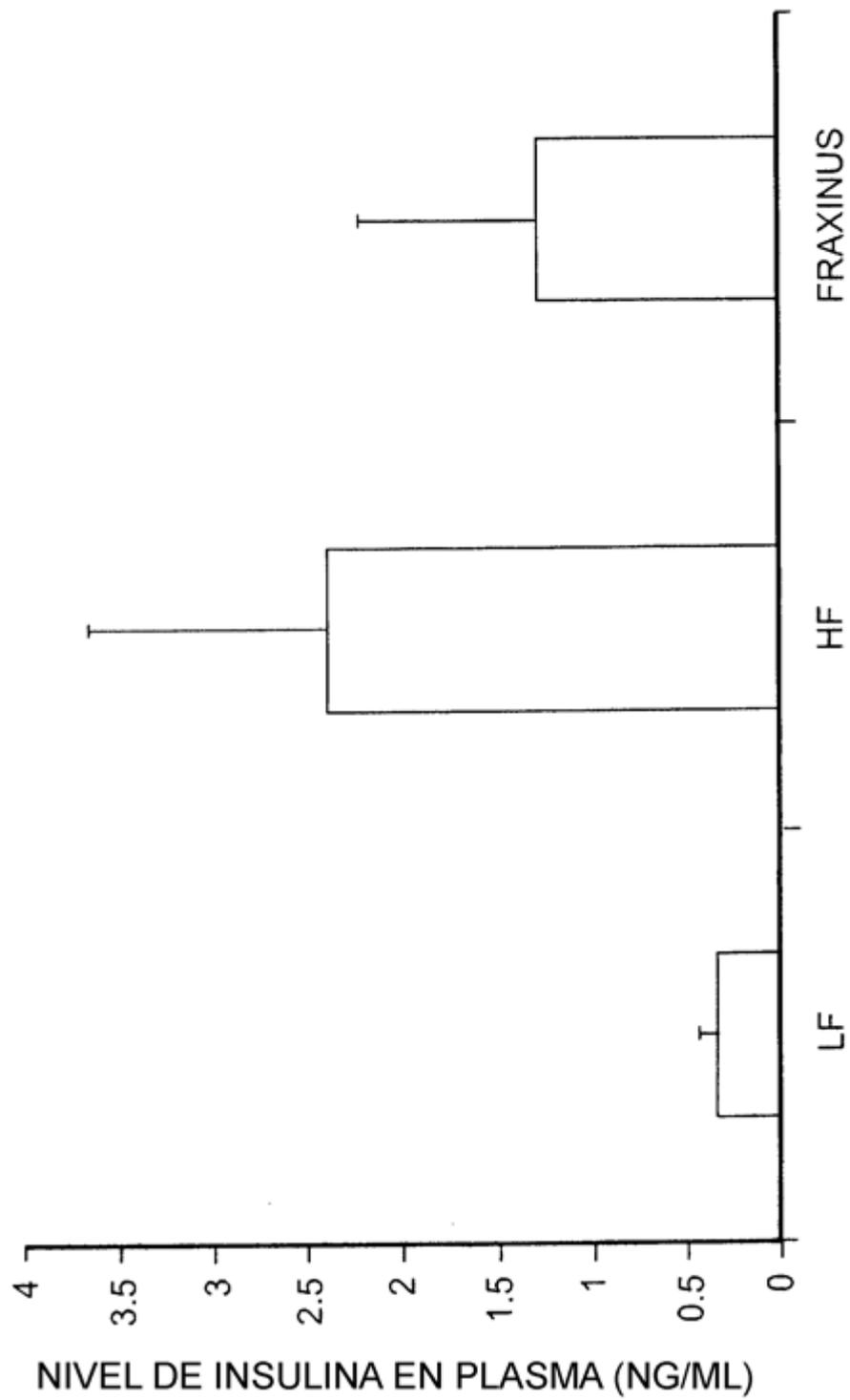


FIG. 9

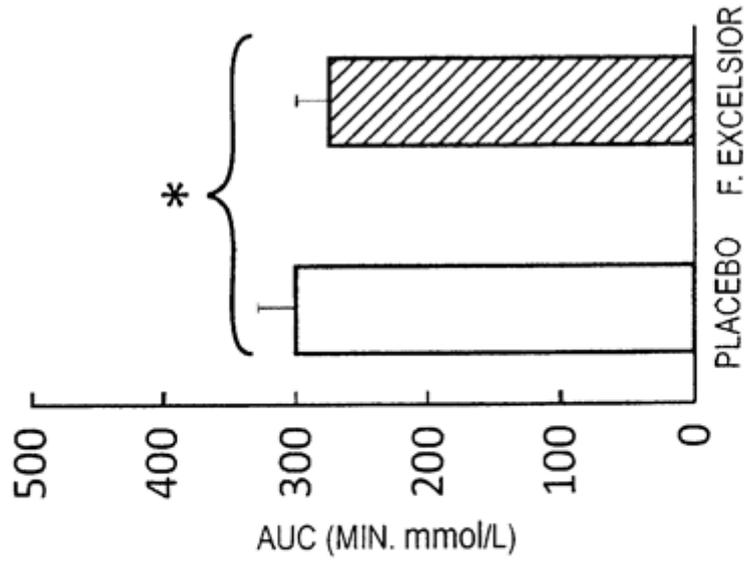


FIG. 10B

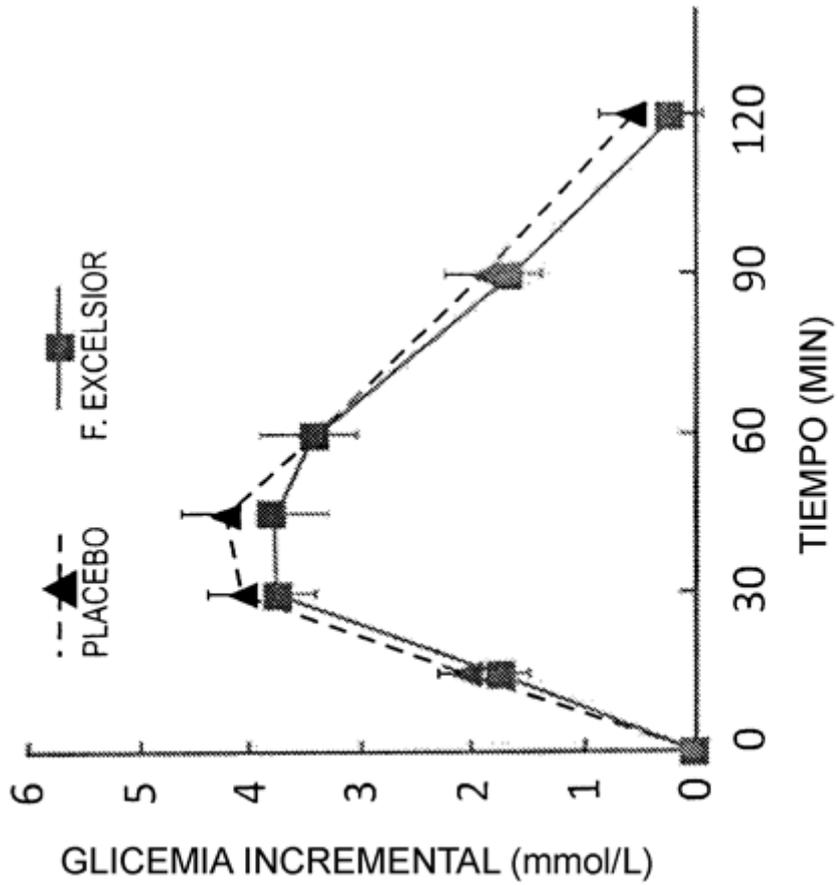


FIG. 10A

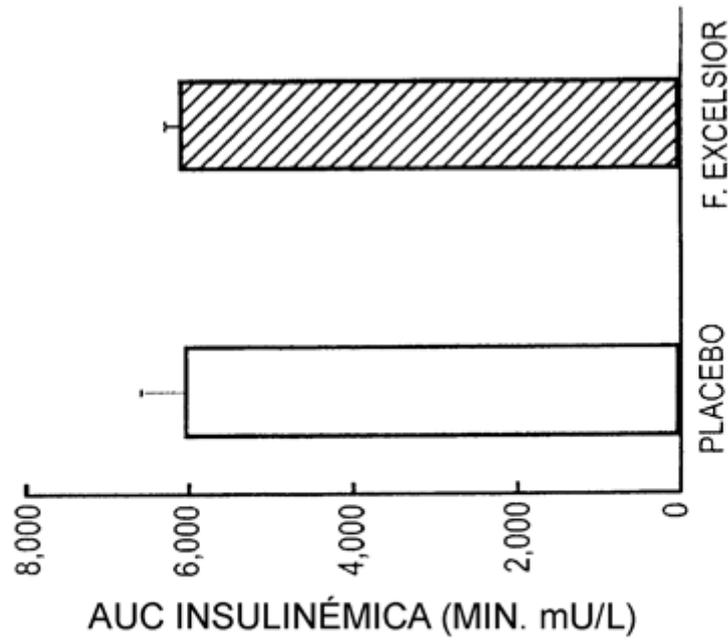


FIG. 11B

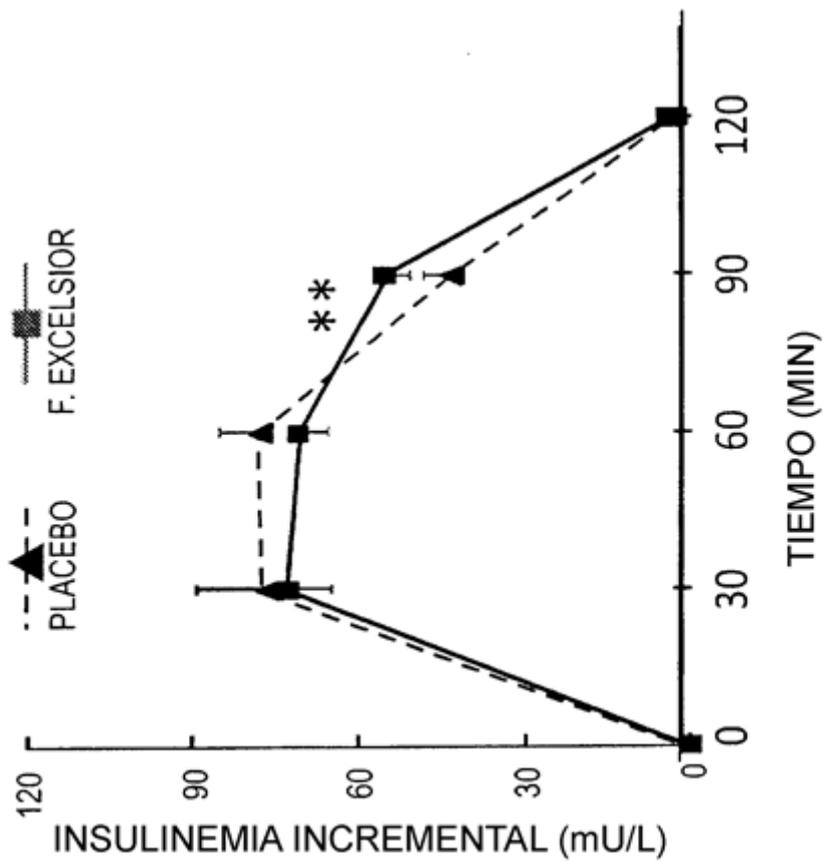


FIG. 11A