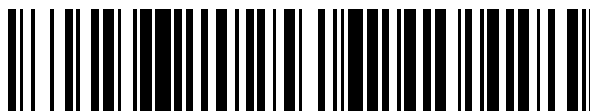


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 743**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2009** **PCT/GB2009/000417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2009** **WO2009103953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2009** **E 09712052 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 2257286**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad de utilización de la energía**

30 Prioridad:

18.02.2008 GB 0802903

18.02.2008 GB 0802904

18.02.2008 GB 0802907

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:

VIDA PHARMA LIMITED (100.0%)

Manor Farm Main Street

Hotham York YO43 4UD, GB

72 Inventor/es:

NASH, ROBERT, JAMES;

WILSON, FRANCIS, XAVIER y

HORNE, GRAEME

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 620 743 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

Tratamiento de enfermedad de utilización de la energía

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con el síndrome metabólico (incluyendo cualquier enfermedad o trastorno asociado con esta, por ejemplo, obesidad central, niveles elevados de triglicéridos y diabetes, incluyendo diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina), y a procesos para producir dichas composiciones a partir de diversas fuentes vegetales, junto con diversos productos, compuestos, composiciones, usos médicos y métodos basados en las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 Los ácidos iminoazúcar (ISA) constituyen una subclase de la clase más ampliamente distribuida de fitoquímicos conocidos como iminoazúcares. Muchos ISA conocidos son fitoquímicos, presentes como metabolitos secundarios en los tejidos vegetales (donde pueden jugar un papel en la defensa). Estructuralmente, los ISA muestran gran diversidad. Muchos ISA son moléculas pequeñas, con pesos moleculares por debajo de 250 Dalton. Los esqueletos se derivan de ácidos de azúcar que se pueden clasificar estructuralmente sobre la base de la configuración del N-heterociclo: Watson et. al. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-295 han clasificado un intervalo amplio de alcaloides polihidroxilados, *inter alia*, como piperidina, pirrolina, pirrolidina, pirrolizidina, indolizidina y los ISA de nortropano (véanse las figuras 1-7 de Watson et al. (2001), la divulgación de los cuales se incorpora en este documento como referencia).

- 20 Aunque los iminoazúcares están ampliamente distribuidos en plantas (Watson et al., 2001), los ácidos iminoazúcar están mucho menos distribuidos ampliamente. Como se describe en este documento, los presentes inventores han descubierto que la distribución botánica de ácidos iminoazúcar se correlaciona con plantas medicinales utilizadas para el control de enfermedad de la utilización de energía, incluyendo diabetes, obesidad y otros trastornos asociados con el síndrome metabólico.

Enfermedades de utilización de la energía

- 25 Las enfermedades de utilización de energía abarcan un intervalo amplio de enfermedades e incluyen, por ejemplo, trastornos de la homeostasis, enfermedades metabólicas, disfunción del metabolismo del azúcar y trastornos del apetito.

Ejemplos de enfermedades de utilización de energía incluyen por lo tanto resistencia a la insulina, diversas formas de diabetes, síndrome metabólico, obesidad, síndromes de desgaste (por ejemplo, caquexia asociada al cáncer), miopatías, enfermedad gastrointestinal, retardo de crecimiento, hipercolesterolemia, aterosclerosis y disfunción metabólica asociada con la edad.

- 30 Las enfermedades de utilización de energía también incluyen afecciones asociadas con síndrome metabólico, obesidad y/o diabetes, incluyendo por ejemplo, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, glucosuria, acidosis metabólica, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, degeneración macular, glomeruloesclerosis, cardiomiopatía diabética, resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, artritis, hipertensión, hiperlipidemia, osteoporosis, osteopenia, pérdida ósea, síndromes óseos quebradizos, síndrome coronario agudo, infertilidad, síndrome del intestino corto, fatiga crónica, trastornos alimentarios y disfunción de la motilidad intestinal.

Resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes

- 40 En individuos sanos, los niveles de glucosa en sangre se mantienen dentro de un intervalo estrecho por dos hormonas pancreáticas: insulina (producida por células β pancreáticas) y glucagón (producida por células α -pancreáticas). Las células β pancreáticas detectan aumentos en los niveles de glucosa en sangre y responden secretando insulina. La insulina promueve la captación de glucosa por los tejidos del cuerpo, restaurando así la concentración de glucosa en sangre hasta el intervalo fisiológico. El glucagón actúa recíprocamente, aumentando los niveles de glucosa en sangre bajo condiciones de ayuno, principalmente estimulando la producción de glucosa en el hígado.

- 45 La resistencia a la insulina se caracteriza por una acción reducida de la insulina en el músculo esquelético, los adipocitos y los hepatocitos, de modo que las cantidades normales de insulina se vuelven inadecuadas para producir una respuesta de insulina normal de las células de estos tejidos. En los adipocitos, la resistencia a la insulina resulta en la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, dando lugar a ácidos grasos libres elevados en el plasma sanguíneo. En los músculos, la resistencia a la insulina reduce la captación de glucosa mientras que en los hepatocitos reduce el almacenamiento de glucosa. En ambos de los últimos casos se produce una elevación de las concentraciones de glucosa en sangre.

Los niveles en plasma elevados de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo progresan al síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

El síndrome metabólico es una constelación de anomalías y trastornos que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes. La incidencia es muy alta en muchos países desarrollados: algunos estudios indican la prevalencia en los Estados Unidos de hasta el 25% de la población. El trastorno también se conoce como síndrome (metabólico) X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y CHAOS. El síndrome metabólico puede ser diagnosticado por la presencia de tres o más de los siguientes síntomas: obesidad central (medida de la cintura de más de 40 pulgadas para los hombres y más de 35 pulgadas para las mujeres); altos niveles de triglicéridos (150 mg/dL o más); niveles bajos de HDL (por debajo de 40 mg/dL para los hombres y por debajo de 50 mg/dL para las mujeres) y presión arterial alta (130/85 mm de Hg o más). Las enfermedades y signos asociados son: hígado graso (progreso frecuente a enfermedad hepática grasa no alcohólica), síndrome de ovario poliquístico, hemocromatosis (sobrecarga de hierro) y acantosis nigricans (parches oscuros en la piel).

El tratamiento de primera línea del síndrome metabólico es el cambio de estilo de vida (restricción calórica y actividad física). Sin embargo, se requiere con frecuencia el tratamiento con fármacos. Generalmente, las enfermedades individuales que comprenden el síndrome metabólico se tratan por separado (por ejemplo, diuréticos e inhibidores de la ACE para la hipertensión). Los fármacos para el colesterol se pueden utilizar para disminuir los niveles de colesterol LDL y triglicéridos, si están elevados, y para elevar los niveles de HDL si son bajos. El uso de fármacos que disminuyen la resistencia a la insulina (por ejemplo, metformina y tiazolidinedionas es controvertido). Un estudio reciente indicó que el ejercicio cardiovascular fue terapéutico en menos del 31% de los casos, el beneficio más probable fue para los niveles de triglicéridos, con un 43% mostrando mejoría; por el contrario 91% de los sujetos de ensayo no mostraron una disminución en la glucosa en plasma en ayunas o resistencia a la insulina.

La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica que se caracteriza por niveles de glucosa en sangre persistentemente elevados (hiperglucemia). La resistencia a la insulina junto con la alteración de la secreción de insulina de las células β pancreáticas caracteriza la enfermedad. La progresión de la resistencia a la insulina a la diabetes tipo 2 está marcada por el desarrollo de hiperglucemia después de comer cuando las células β pancreáticas son incapaces de producir insulina adecuada para mantener los niveles normales de azúcar en la sangre (euglicemia).

El fármaco más importante actualmente utilizado para tratar la diabetes tipo 2 es la metformina (Glucophage, Diabex, Diaformina, Fortamet, Riomet, Glumetza, Cidophage y otros). La metformina es de la clase biguanida de agentes antihiperglucémicos orales. Otras biguanidas incluyen fenformina y buformina (ahora retirada). La metformina trabaja principalmente reduciendo la liberación en el hígado de glucosa en sangre a partir de las reservas de glucógeno, pero también tiene algún efecto en el aumento de la captación de glucosa. Otras clases de fármacos ampliamente utilizadas incluyen las del grupo sulfonilurea (incluyendo glibenclamida y gliclazida). Estos fármacos aumentan la secreción de insulina estimulada por la glucosa por el páncreas. Las clases de fármacos más nuevas incluyen tiazolidinedionas (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona y troglitazona), que actúan uniéndose a PPAR (receptores activados por el proliferador de peroxisoma), un grupo de moléculas receptoras dentro del núcleo celular. Otras clases incluyen inhibidores de α -glucosidasa (acarbose y miglitol), meglitinidas (que estimulan la liberación de insulina e incluyen nateglinida, repaglinida y sus análogos), análogos de péptidos (por ejemplo, miméticos de incretina, que actúan como secretagogos de insulina, análogos de péptidos similares a glucagón (por ejemplo, exenatida), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (que aumentan los niveles de incretinas (por ejemplo, sitagliptina) y análogos de agonistas de amilina (que retardan el vaciado gástrico y suprimen el glucagón (por ejemplo, pramlintida).

Sin embargo, ninguna terapia existente para las diferentes formas de diabetes tipo 2 parece mejorar la función de factores intrínsecos clave en las células β y todas las terapias existentes fallan en detener la progresión de la enfermedad y, con el tiempo, también fallar en normalizar los niveles de glucosa y/o prevenir complicaciones posteriores. Las terapias existentes también están asociadas con efectos secundarios indeseables. Por ejemplo, los secretagogos de insulina y las inyecciones de insulina pueden causar hipoglucemia y aumento de peso. Los pacientes también pueden dejar de responder a los secretagogos de insulina con el tiempo. Los inhibidores de la metformina y la α -glucosidasa a menudo conducen a problemas gastrointestinales y los agonistas de PPAR tienden a causar aumento de peso y edema. También se informa que la exenatida causa náuseas y vómitos.

La diabetes de tipo 1 (o diabetes dependiente de insulina) se caracteriza por la pérdida de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, dando lugar a una deficiencia de insulina. La causa principal de esta pérdida de células beta es un ataque autoinmune mediado por células T. No se conoce ninguna medida preventiva que se pueda tomar contra la diabetes tipo 1, que comprende hasta un 10% de los casos de diabetes mellitus en Norteamérica y Europa. La mayoría de las personas afectadas son saludables y de peso saludable cuando se produce. La sensibilidad y la capacidad de respuesta a la insulina suelen ser normales, especialmente en las primeras etapas.

El tratamiento principal de la diabetes de tipo 1, incluso desde las etapas más tempranas, es el reemplazo de la insulina combinada con un control cuidadoso de los niveles de glucosa en sangre utilizando monitores de análisis de sangre. Sin insulina, se pueden desarrollar la cetosis y la cetoacidosis diabética y se producirán el coma o la muerte. Aparte de las inyecciones subcutáneas comunes, también es posible administrar insulina por medio de una bomba, lo que permite la infusión continua de insulina 24 horas al día a niveles preestablecidos, y la capacidad de programar dosis (un bolo) de insulina según sea necesario en las comidas. Una forma inhalada de insulina, Exubera, ha sido aprobada recientemente por la FDA.

El tratamiento de la diabetes de tipo 1 debe continuar indefinidamente. Si bien el tratamiento no perjudica las actividades normales, se debe observar una gran conciencia, atención apropiada y disciplina en las pruebas y fármacos.

De este modo, se requieren tratamientos de fármacos antidiabéticos nuevos y/o alternativos, particularmente aquellos que son capaces de restaurar la función de las células β . En particular, existe una necesidad clínica real y sustancial no satisfecha de un fármaco eficaz que sea capaz de tratar tanto la diabetes tipo 2 como la diabetes tipo 1 y las afecciones asociadas con menos efectos secundarios que las terapias farmacológicas existentes, así como los tratamientos para el síndrome metabólico. Tratamientos que son eficaces contra la obesidad y/o niveles elevados de triglicéridos.

Aditivos alimentarios y remedios de hierbas

Actualmente existe un gran interés en el uso de remedios herbales y suplementos y una creciente aceptación de los fabricantes de alimentos, las compañías de salud y la profesión médica que los productos herbales tienen valor y pueden complementar formulaciones y tratamientos establecidos. Los aditivos alimentarios a base de hierbas y los suplementos son ahora ampliamente utilizados. En particular, la demanda de alternativas alimenticias de bajo contenido en carbohidratos y bajo contenido de azúcar ha llevado a un creciente interés por los edulcorantes naturales y los glucósidos de esteviol (responsables del sabor dulce de las hojas de la planta de Stevia) (*Stevia rebaudiana*) están siendo desarrollados por Coca Cola como edulcorantes naturales.

Sin embargo, el control de calidad de los aditivos alimentarios de hierbas es difícil debido a la naturaleza compleja y a la no uniformidad inherente de los materiales vegetales. Los materiales utilizados en los aditivos alimentarios de hierbas y plantas son usualmente plantas enteras o partes o extractos de los mismos. Dado que los materiales vegetales contienen muchos componentes químicos diferentes, los materiales son mezclas complejas. Esto hace que sea muy difícil estandarizar y controlar la calidad de los materiales. Además, muchos aditivos alimentarios de hierbas son mezclas de dos o más componentes a base de vegetales y, por lo tanto, son mezclas de mezclas, introduciendo así un nivel adicional de complejidad. Además, las recetas y métodos de fabricación utilizados a menudo no son uniformes y pueden permanecer no divulgados. Estos factores hacen que sea muy difícil asegurar que dos muestras de un producto dado, obtenidas de fuentes dispares y ostensiblemente idénticas, contengan de hecho la misma mezcla de ingredientes. Este problema, que conduce a dificultades en el control de la calidad de tales materiales, ha limitado el uso de ciertos extractos de hierbas, incluso entre los profesionales de hierbas.

Tales problemas pueden ser particularmente agudos en el caso de productos derivados de *Stevia*, ya que se ha informado que ciertos esteviosidos tienen una posible actividad mutagénica y por lo tanto el fraccionamiento de material vegetal derivado de *Stevia* para eliminar dicho material puede ser de particular importancia.

Otros problemas surgen del hecho de que las plantas utilizadas en la práctica del aditivo alimenticio de hierbas con frecuencia no están disponibles localmente y por lo tanto necesitan ser obtenidas de fuentes que están alejadas del usuario final. Sin embargo, el suministro de tales plantas desde lugares remotos puede ser errático e inexacto, sobre todo porque no existen monografías detalladas, incluidas las normas de identidad y calidad, para muchas de estas plantas. La mezcla compleja de ingredientes encontrados en plantas medicinales varía ampliamente en tipo y concentración dependiendo de muchos factores incluyendo la fuente botánica, la ubicación donde se cultiva la planta, qué otras plantas o microorganismos están creciendo cerca de ella, la época del año cuando la planta se cosecha, las condiciones bajo las cuales el material se almacena y procesa y el procedimiento de extracción utilizado.

Por lo tanto, existe la necesidad de procesos sensibles que puedan perfilar productos de hierbas y así establecer una especificación estándar para un material vegetal medicinal que pueda estar relacionado con la actividad, permitiendo así el control de calidad en la producción de aditivos alimenticios de hierbas e idealmente cuantificando los componentes conocidos o susceptibles de ser activos.

Los ácidos iminoazúcar son análogos de ácidos de azúcar en los que el oxígeno del anillo se reemplaza por un nitrógeno. Aunque los iminoazúcares están ampliamente distribuidos en plantas (Watson et al. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-295), los ácidos iminoazúcar están mucho menos distribuidos. Los presentes inventores han descubierto ahora que la distribución botánica de ácidos iminoazúcar se correlaciona con plantas medicinales utilizadas para el control de la diabetes y la obesidad. Hasta ahora no se han reportado ácidos iminoazúcar de estas plantas, posiblemente porque los compuestos de tipo carbohidrato son difíciles de analizar utilizando los sistemas analíticos convencionales de HPLC y los compuestos que afectan la percepción del azúcar en estas plantas han atraído más interés. De este modo, el análisis cualitativo y/o cuantitativo del material de hierbas para los ácidos iminoazúcar puede constituir la base de los procedimientos de control de calidad durante la obtención, preparación y procesamiento de aditivos alimenticios de hierbas y alimentos/bebidas basados en los mismos, sobre todo estos alimentos y bebidas formulados para formar parte de una dieta baja en calorías o baja en azúcar. En algunas aplicaciones puede ser importante asegurar que los ácidos iminoazúcar están ausentes del material de hierbas con el fin de asegurar que se eliminan las actividades farmacéuticas inadecuadas o indeseables del alimento o bebida suplementado.

Resumen de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la distribución botánica de ácidos iminoazúcar se correlaciona con plantas medicinales utilizadas para el control de la diabetes, la obesidad y otros trastornos asociados con el síndrome metabólico. De este modo, por primera vez se han identificado los ISA como principios bioactivos importantes establecidos en las medicinas naturales contra la obesidad y la diabetes.

5 Por lo tanto, en un aspecto de la invención, como se define en la reivindicación 1 a continuación, la invención proporciona un ácido iminoazúcar aislado para su uso en un método de tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con síndrome metabólico, en donde el ácido iminoazúcar no inhibe la actividad de disacaridasa, presentando un valor de IC₅₀ en el intervalo de μ M o mM o mayor.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un nutracéutico o composición farmacéutica que comprende un ácido iminoazúcar según se define en la reivindicación 1 a continuación.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para la producción de una composición para el tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con el síndrome metabólico (por ejemplo, diabetes tipo 1, tipo 2 y resistencia a la insulina) que comprende las etapas de:

(a) proporcionar el material vegetal;

15 (b) aislar uno o más ácido(s) iminoazúcar, como se define en la reivindicación 1, en este documento a partir de dicho material vegetal (y opcionalmente eliminar o reducir las toxinas potenciales); y entonces

(c) formular dicho(s) ácido(s) iminoazúcar aislados con un excipiente farmacéutico para producir una composición en la que la cantidad y concentración del(los) ácido(s) iminoazúcar aislados es suficiente para tratar la diabetes, la obesidad o los trastornos asociados con el síndrome metabólico en un sujeto humano

20 La invención contempla el uso de análogos sintéticos de los ISA de origen natural descritos en este documento. Tales análogos sintéticos se pueden producir mediante un proceso que comprende las etapas de: (a) aislar uno o más ácido(s) iminoazúcar de material vegetal; (b) determinar la estructura de dicho ISA; y a continuación, (c) sintetizar dicho análogo de ISA sintético.

25 La invención contempla el uso de derivados sintéticos de los ISA de origen natural descritos en este documento. Tales derivados sintéticos se pueden producir mediante un proceso que comprende las etapas de: (a) aislar uno o más ácido(s) iminoazúcar de material vegetal; y a continuación, (b) derivatizar dicho ISA aislado (por ejemplo, química o enzimáticamente) para producir un derivado sintético de ISA.

30 El material vegetal utilizado como material de partida en la etapa (a) preferiblemente se deriva de una fuente botánica seleccionada de: (a) *Stevia* spp. (por ejemplo, *S. rebaudiana*); (b) *Gymnema* spp. (por ejemplo, *G. sylvestre*); (c) *Andrographis* spp. (por ejemplo, *A. paniculata*); (d) especies leguminosas (por ejemplo, *Aspalanthus linearis* (Rooibos), *Baphia* spp., *Glycine max* (soya), *Alexa* spp., *Castanospermum australe*, *Lotus* spp.); (e) plantas de la familia Rutaceae (por ejemplo, *Citrus* spp., por ejemplo, *C. aurantium*), (f) plantas de la Cucurbitaceae (por ejemplo, Asian Pumpkin, *Cucurbita ficifolia* y *Momordica charantia*) o (g) Solanaceae (por ejemplo, *Lycium barbarum*, Goji).

35 El ácido iminoazúcar es preferiblemente de una clase estructural seleccionada entre los ISA de piperidina, pirrolidina, pirrolina, pirrolizidina, indolizidina y nortropano.

40 Un proceso para producir una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la invención puede comprender la etapa de controlar la calidad de dicha composición mediante la detección de la presencia o ausencia o la medición de la cantidad de un ácido iminoazúcar en una muestra de dicha composición. Dichas realizaciones encuentran aplicación particular en procesos para la producción de fármacos antidiabéticos basados en la purificación a partir de fuentes vegetales naturales.

Un método para controlar la calidad de una composición farmacéutica de la invención comprende las etapas de: (a) suministro de una muestra de la composición; y (b) detectar la presencia o ausencia o medir la cantidad de un ácido iminoazúcar en dicha muestra. De nuevo, tales realizaciones encuentran la aplicación particular en procesos para la producción de fármacos antidiabéticos basados en la purificación de fuentes vegetales naturales.

45 Las dos últimas realizaciones encuentran aplicación particular en la producción de fármacos antidiabéticos basados en el aislamiento de *Gymnema* spp. (por ejemplo, de especies *G. sylvestre*, *Aspalanthus*, *Glycine max*, *Lycium*, *Momordica* o *Cucurbita*).

50 Ciertos ISA descritos en este documento son nuevos y algunos de los ISA descritos en este documento son conocidos, como tales, pero no como productos farmacéuticos. De acuerdo con la invención, se reivindica como composiciones farmacéuticas per se tales ISA como conocidos en la técnica pero que no se han descrito previamente para su uso como productos farmacéuticos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y preferencias generales

Cuando se utilizan en este documento y a menos que se indique específicamente lo contrario, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados además de cualquier significado más amplio (o más estrecho) que los términos puedan disfrutar en la técnica:

Como se usa en este documento, el término "enfermedad de utilización de energía" abarca cualquier enfermedad o trastorno que surja de la utilización anormal de energía. El término por lo tanto cubre trastornos y enfermedades de homeostasis, enfermedad metabólica, disfunción del metabolismo del azúcar y trastornos del apetito. El término por lo tanto incluye resistencia a la insulina, diversas formas de diabetes, síndrome metabólico, obesidad, síndromes de desgaste (por ejemplo, caquexia asociada al cáncer), miopatías, enfermedad gastrointestinal, retardo de crecimiento, hipercolesterolemia, aterosclerosis y disfunción metabólica asociada a la edad. El término también cubre afecciones asociadas con síndrome metabólico, obesidad y/o diabetes, incluyendo, por ejemplo, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, glucosuria, acidosis metabólica, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, degeneración macular, glomeruloesclerosis, cardiomiopatía diabética, resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, artritis, hipertensión, hiperlipidemia, osteoporosis, osteopenia, pérdida ósea, síndromes óseos quebradizos, síndrome coronario agudo, infertilidad, síndrome del intestino corto, fatiga crónica, trastornos alimentarios y disfunción de la motilidad intestinal.

Las referencias en este documento al tratamiento del síndrome metabólico se deben interpretar para incluir el tratamiento de cualquiera o todos los trastornos asociados con el síndrome metabólico, incluyendo en particular obesidad (por ejemplo, obesidad central) y triglicéridos en suero elevados y diabetes (incluyendo diabetes tipo 1 y tipo 2 y resistencia a la insulina).

El término ácido iminoazúcar define un análogo de ácido de azúcar en el que el oxígeno del anillo se reemplaza por un nitrógeno. El término N-ácido ISA define un ácido iminoazúcar en donde el grupo ácido carboxílico está situado sobre el nitrógeno del anillo. El término derivado de N-ácido define análogos de iminoazúcar en los que el nitrógeno del anillo está sustituido con un grupo de ácido carboxílico.

Los ISA preferidos se seleccionan de las siguientes clases estructurales: piperidina (incluyendo ácidos (poli) hidroxipípecólicos); pirrolina; pirrolidina (incluyendo (poli) hidroxiprolinas); pirrolizidina; indolizidina y nortropano.

Como se utiliza en este documento, el término polihidroxilado, como se aplica a los ácidos iminoazúcar, define un ISA que tiene al menos 2 (preferiblemente al menos 3) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) sobre el núcleo del sistema de anillo.

El término aislado, como se aplica a los ISA de la invención, se utiliza en este documento para indicar que el ISA existe en un medio físico distinto del que ocurre en la naturaleza (o en el caso de los ISA sintéticos no de origen natural, se purifica). Por ejemplo, el material aislado puede estar sustancialmente aislado (por ejemplo, purificado) con respecto al medio celular complejo en el que ocurre naturalmente.

Cuando el material aislado (por ejemplo, ISA sintético, no natural) se purifica, el nivel absoluto de pureza no es crítico y los expertos en el arte pueden determinar fácilmente niveles apropiados de pureza de acuerdo con el uso al cual el material va a ser puesto. Sin embargo, se prefieren niveles de pureza de 90% p/p, 99% p/p o más. En algunas circunstancias, el ISA aislado forma parte de una composición (por ejemplo, un extracto más o menos crudo que contiene muchas otras sustancias) o un sistema regulador, que puede contener, por ejemplo, otros componentes. En otras circunstancias, el ISA aislado se puede purificar a una homogeneidad esencial, por ejemplo, según se determina por espectrofotometría, por RMN o por cromatografía (por ejemplo, GC-MS de los derivados de trimetilsililo).

El término fitoquímico se usa en este documento en un sentido amplio para abarcar cualquier constituyente químico de una planta, incluyendo macromoléculas y moléculas pequeñas. Ejemplos importantes incluyen alcaloides (por ejemplo, iminoazúcares y ácidos iminoazúcar, por ejemplo, seleccionados de las clases estructurales pirrolidinas, piperidinas, pirrolizidina, indolizidinas, tropanos y nortropanos), análogos de carbohidrato, compuestos fenólicos, terpenoides, inhibidores enzimáticos, glucósidos, nucleótidos, aminoácidos, lípidos y azúcares.

Los términos derivado y derivado farmacéuticamente aceptable tal como se aplican a los ISA de la invención definen los ISA que se obtienen (o pueden obtenerse) mediante la derivación química de los ISA originales de la invención. Los derivados farmacéuticamente aceptables son apropiados para administración o uso en contacto con los tejidos humanos sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebida (esto es, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable). Los derivados preferidos son los obtenidos (o que se pueden obtener) por alquilación, esterificación o acilación de los ISA originales de la invención. Son particularmente preferidos derivados de acilo (por ejemplo, butilo), por ejemplo, derivados de O-acilo (por ejemplo, O-butilo). También se prefieren N-ácido de ácidos iminoazúcar.

Los derivados pueden ser antidiabéticos *per se*, o pueden ser inactivos hasta procesados *in vivo*. En este último caso, los derivados de la invención actúan como profármacos. Los profármacos particularmente preferidos son derivados éster que están esterificados en uno o más de los hidroxilos libres y que se activan por hidrólisis *in vivo*. Los derivados farmacéuticamente aceptables de la invención retienen una parte o la totalidad de la actividad antidiabética del ISA original. En algunos casos, la actividad se incrementa por derivación. La derivación también puede aumentar otras actividades biológicas del ISA, por ejemplo, biodisponibilidad y/o actividad inhibidora de glucosidasa y/o perfil inhibidor de glucosidasa. Por ejemplo, la derivación puede disminuir la potencia inhibidora de glucosidasa y/o aumentar la especificidad.

Los ácidos iminoazúcar de la invención que no inhiben la actividad glucosidasa (o no inhiben la actividad de la glucosidasa en una extensión clínicamente significativa) pueden no mostrar actividad inhibidora detectable o pueden ser inhibidores pobres, por ejemplo, que muestran valores de IC_{50} en los intervalos de μM o mM o mayores. Por lo general, la inhibición de glucosidasa clínicamente significativa sólo surge cuando los compuestos tienen valores de IC_{50} en el intervalo submicromolar. En tales realizaciones, la glucosidasa puede ser una α -glucosidasa de mamífero, por ejemplo, una α -glucosidasa y/o una α -glucosidasa digestiva (por ejemplo, una disacaridasa tal como sacarasa), de modo que el ácido iminoazúcar no pueda presentar actividad inhibidora detectable (o puede presentar valores de IC_{50} en los intervalos de μM o mM o superiores) con respecto a estas clases de enzimas.

Los ácidos iminoazúcar de la invención que no inhiben la actividad glucosidasa (o no inhiben la actividad glucosidasa en un grado clínicamente significativo) pueden ahorrar la actividad de glucosidasa deseable *in vivo* y, en particular, pueden ahorrar la actividad de glucosidasa digestiva en la medida en que se reduzcan o eliminen los efectos secundarios gástricos adversos observados con el uso de agentes iminoazúcar antidiabéticos conocidos (tales como miglitol).

El término sal farmacéuticamente aceptable aplicado a los ISA de la invención define cualquier sal de adición de ácido orgánico o inorgánico no tóxico de los compuestos de base libre que son apropiados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y que sean proporcionales a una razón beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables apropiadas son bien conocidas en la técnica. Ejemplos son las sales con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico), ácidos carboxílicos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, dihidroximaleico, benzoico, fenilacético, 4-aminobenzoico, 4-hidroxibenzoico, antranílico, cinámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico, 2-acetoxibenzoico y mandélico) y ácidos sulfónicos orgánicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico y ácido p-toluenosulfónico). Los fármacos ISA de la invención también se pueden convertir en sales por reacción con un haluro de metal alcalino, por ejemplo, cloruro de sodio, yoduro de sodio o yoduro de litio. Preferiblemente, los ISA de la invención se convierten en sus sales por reacción con una cantidad estequiométrica de cloruro de sodio en presencia de un solvente tal como acetona.

Estas sales y los compuestos de base libre pueden existir en ya sea una forma hidratada o sustancialmente anhidra. También se contemplan las formas cristalinas de los compuestos de la invención y en general las sales de adición de ácido de los ISA de la invención son materiales cristalinos que son solubles en agua y diversos solventes orgánicos hidrófilos y que, en comparación con sus formas de base libre, demuestran puntos de fusión más altos y una mayor solubilidad.

En su aspecto más amplio, la presente invención contempla todos los isómeros ópticos, formas racémicas y diastereómeros de los ISA de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que, debido a los átomos de carbono sustituidos asimétricamente presentes en los ISA de la invención, los ISA de la invención pueden existir y ser sintetizados y/o aislados en formas ópticamente activas y racémicas. De este modo, las referencias a los ISA de la presente invención abarcan los ISA como una mezcla de diastereómeros, como diastereómeros individuales, como una mezcla de enantiómeros, así como en la forma de enantiómeros individuales.

Por lo tanto, la presente invención contempla todos los isómeros ópticos y formas racémicas de los mismos de los ISA de la invención, y a menos que se indique lo contrario (por ejemplo, mediante el uso de fórmulas estructurales de cuña de trazo), los compuestos mostrados en este documento abarcan todos los posibles isómeros ópticos de los compuestos así representados. En los casos en los que la forma estereoquímica del ISA es importante para la utilidad farmacéutica, la invención contempla el uso de un eutómero aislado. Los diastereoisómeros se pueden separar utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía o cristalización fraccionada. Los diversos isómeros ópticos se pueden aislar por separación de una mezcla racémica u otra mezcla de los compuestos utilizando, por ejemplo, cristalización fraccionada o HPLC convencional. Alternativamente, los isómeros ópticos deseados se pueden preparar por reacción de los materiales de partida ópticamente activos apropiados en condiciones que no causen racemización.

Ácidos iminoazúcar de la invención

Los ácidos iminoazúcar (ISA) son análogos de ácidos de azúcar en los que el oxígeno del anillo se reemplaza por un nitrógeno. Aunque los iminoazúcares están ampliamente distribuidos en plantas (Watson et al. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-295), los ácidos iminoazúcar están mucho menos distribuidos.

Los ácidos iminoazúcar se pueden clasificar estructuralmente en base a la configuración del N-heterociclo. Los ejemplos incluyen ácidos iminoazúcar de piperidina, pirrolina, pirrolidina, pirrolizidina, indolizidina y nortropanos (véanse las figuras 1-7 de Watson *et al.* (2001), cuya divulgación se incorpora en este documento como referencia).

Son particularmente preferidos los ácidos iminoazúcar seleccionados entre las siguientes clases estructurales:

- 5 (a) ISA de piperidina (incluyendo ácidos (poli) hidroxipepecólicos);
- (b) ISA de pirrolina;
- (c) ISA de pirrolidina (incluyendo (poli)hidroxiprolinas);
- (d) ISA de pirrolizidina;
- (e) ISA de indolizidina; y
- 10 (f) ISA de nortropano.

Sin embargo, también se pueden utilizar mezclas de ISA o combinaciones que contienen dos o más ISA diferentes representativos de una o más de las clases enumeradas anteriormente.

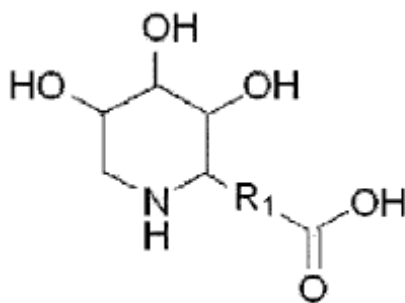
- 15 Se prefieren los ISA polihidroxilados. Se prefieren particularmente los ISA que tienen un peso molecular pequeño, ya que pueden presentar una farmacocinética deseable. De este modo, el ISA puede tener un peso molecular de 100 a 400 Dalton, preferiblemente de 150 a 300 Dalton y más preferiblemente de 200 a 250 Dalton.

También se prefieren los ISA, que son análogos de iminoazúcares sustituidos con hidroximetilo en los que uno o más grupos hidroximetilo están sustituidos por grupos carboxilo.

Ácidos de iminoazúcar de piperidina de ejemplo

- 20 El ISA de la invención puede ser un ISA de piperidina que tiene al menos 3 grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo. Los ISA de piperidina de ejemplo son ácidos hidroxipepecólicos. Los ácidos hidroxipepecólicos particularmente preferidos son ácidos polihidroxipepecólicos que tienen al menos dos (por ejemplo, 3) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo. También se contemplan los derivados de N-ácido de los anteriores y derivados de N- ácidos de iminoazúcar de piperidina tales como 1-desoxinojirimicina.

Los ISA de piperidina de ejemplo de acuerdo con la invención son compuestos de fórmula (I):



25

en donde

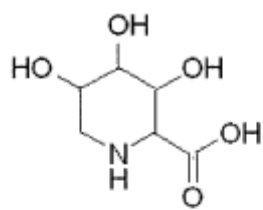
R₁ está ausente o es alquilo C₁-C₆;

la ubicación del grupo carboxilo se puede cambiar del carbono del anillo al nitrógeno del anillo para producir un análogo de N-ácido del compuesto de fórmula (I);

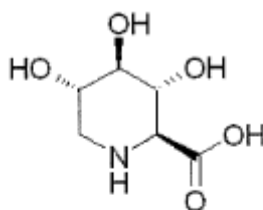
- 30 o un derivado de acilo (por ejemplo, O-acilo) o análogo deshidroxilado en las que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo;

o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de la misma.

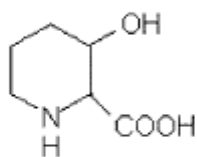
De este modo, los ISA de piperidina de ejemplo de acuerdo con la invención se pueden seleccionar de las estructuras mostradas a continuación:



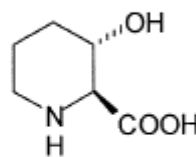
(G1)



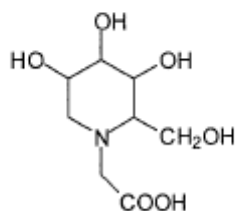
(G2)



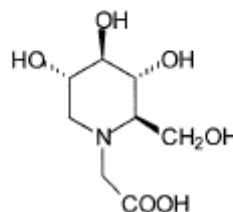
(G3)



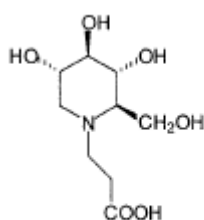
(G4)



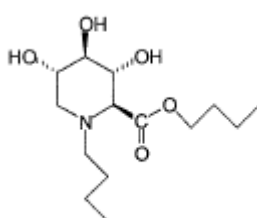
(G5)



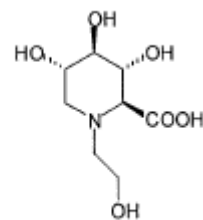
(G6)



T1



T2



T3

5 También se contemplan específicamente: (a) análogos de N-ácido de las estructuras (G1)-(G4) anteriores en las que la ubicación del grupo carboxilo se cambia del carbono del anillo al nitrógeno del anillo; (b) derivados de acilo (por ejemplo, O-acilo) de las estructuras anteriores (o de los análogos de N-ácido de (a)); (c) análogos deshioxilados de las estructuras anteriores (o de los análogos de N-ácido de (a) y (b)) en los que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo.

10 El compuesto de fórmula (G2) se aisló primero a partir de la leguminosa *Baphia racemosa* (Fabaceae) (véase Booth et al., 2007: (2R, 3R, 4R, 5S)-3,4,5-trihydroxypipicolinic acid dihydrate [(2S, 3R, 4R, 5S)-trihydroxypiperidine-2-carboxylic acid dihydrate Acta Crystallographica Section E63, 3783-3784 y sus referencias), pero los presentes inventores han descubierto ahora que es un componente principal de *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). Aunque *G. sylvestre* es ampliamente reivindicado para tener actividad antidiabética y de control de peso, la mayoría de la atención se ha centrado en los ácidos gimnémicos que pueden bloquear temporalmente el sabor azúcar. Estos ácidos gimnémicos y otros glucósidos (saponinas) parecen tener algo de la actividad antidiabética de la planta cuando se probó en modelos de animales. La actividad de estos compuestos parece ser debida a los efectos sobre la permeabilidad de la membrana *in vitro*, aunque debido a propiedades químicas similares, los ácidos iminoazúcar pueden también haber estado presentes sin saberlo, no está claro en nuestra opinión que este efecto sobre la permeabilidad de la membrana afectaría al páncreas *in vivo* (Persaud et al., 1999, J. Endocrinol.: 163:207-12).

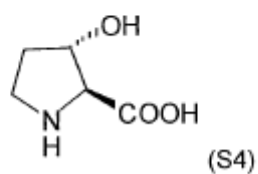
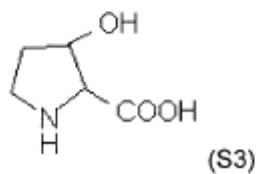
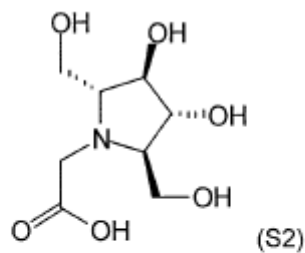
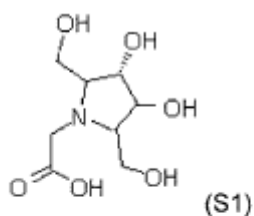
20 Los ISA de piperidina para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar, por ejemplo, de *Gymnema spp.* (por ejemplo, *G. sylvestre*) (véase el ejemplo 1, más adelante).

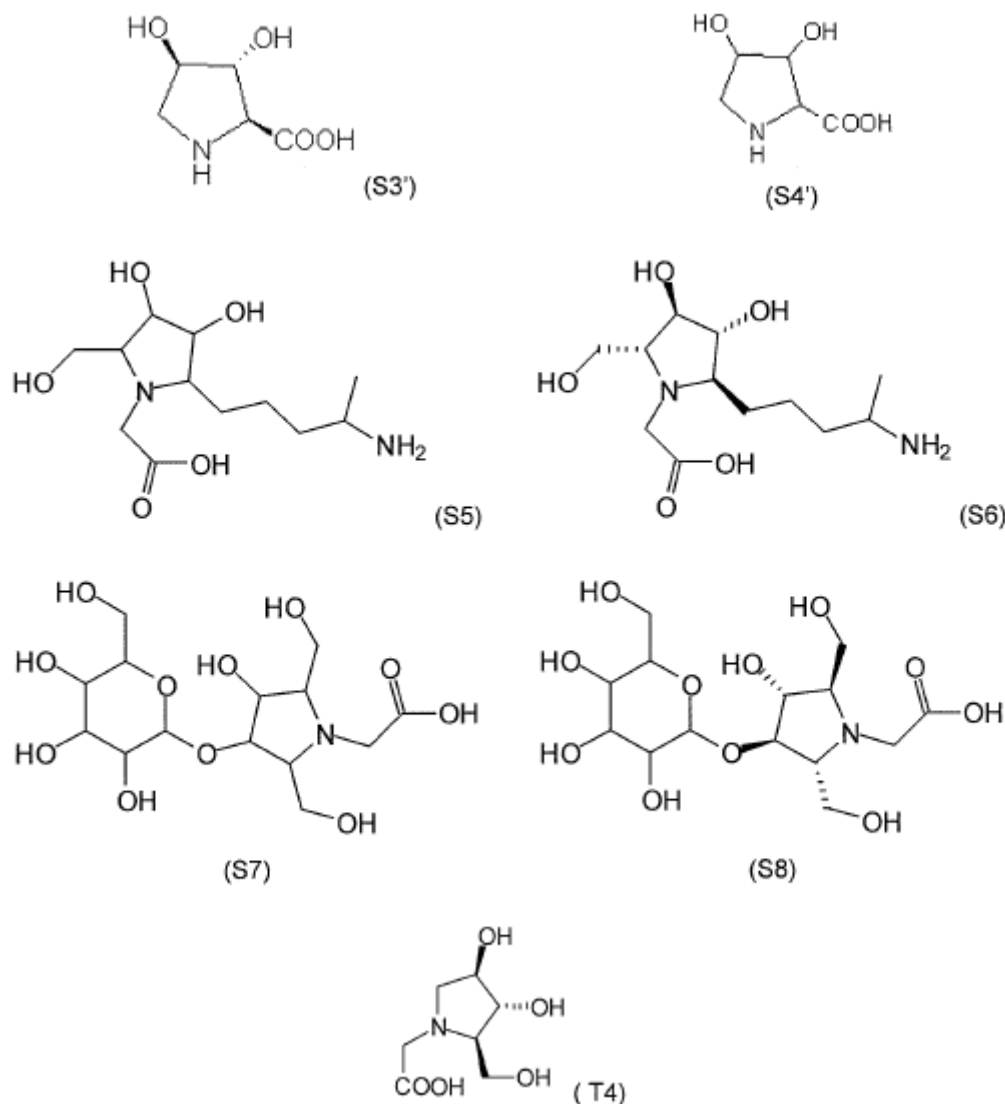
Ácidos iminoazúcar de pirrolidina de ejemplo

5

El ISA de la invención puede ser ISA de pirrolidina que tiene al menos 1 (preferiblemente al menos 2 o 3) grupo hidroxilo libre (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo. Los ISA de pirrolidina preferidas son hidroxiprolinas. Las hidroxiprolinas particularmente preferidas son polihidroxiprolinas que tienen al menos dos (por ejemplo, al menos 3) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo. También se contemplan derivados de N-ácido de los anteriores.

Los ISA de pirrolidina de ejemplo de acuerdo con la invención se pueden seleccionar de las estructuras mostradas a continuación:





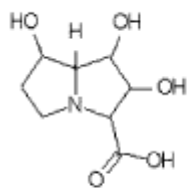
5 También se contemplan específicamente: (a) análogos de N-ácido de las estructuras S3 y S4 anteriores en las que la ubicación del grupo carboxilo se cambia del carbono del anillo al nitrógeno del anillo, por ejemplo, T4; (b) derivados de acilo (por ejemplo, O-acilo) de las estructuras anteriores (o de los análogos de N-ácido de (a)); y (c) análogos deshidroxilados de las estructuras anteriores (o de los análogos N-ácidos de (a) y (b)) en los que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo (excepto que no se contemplan los análogos deshidroxilados de los S3 y S4 monohidroxilados).

10 Los ISA de pirrolidina para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar, por ejemplo, de *Stevia spp.* (por ejemplo, *S. rebaudiana*) (véase el ejemplo 2, más adelante).

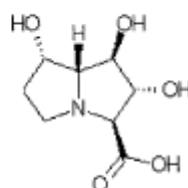
Ácidos de iminoazúcar de pirrolizidina de ejemplo

El ISA de la invención puede ser un ISA de pirrolizidina que tiene al menos 2 (preferiblemente al menos 3, 4 o 5) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo.

15 Los ISA de pirrolizidina de ejemplo de acuerdo con la invención se pueden seleccionar de las estructuras mostradas a continuación:



(C1)



(C2) (epialexaflorina)

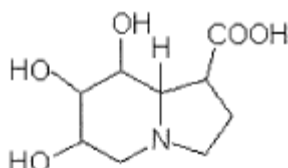
También se contemplan específicamente: (a) derivados de acilo (por ejemplo, O-acilo) de las estructuras anteriores, (b) análogos deshidroxilados de las estructuras anteriores en las que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo.

- 5 Los ISA de pirrolizidina para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar, por ejemplo, de plantas de la familia Rutaceae (por ejemplo, *Citrus spp.*, por ejemplo, *C. aurantium*) (véase el ejemplo 3, más adelante).

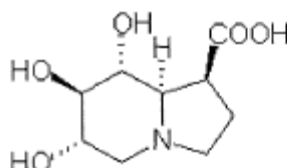
Ácidos iminoazúcar de indolizidina de ejemplo

El ISA de la invención puede ser un ISA de indolizidina que tiene al menos 2 (preferiblemente al menos 3, 4 o 5) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo.

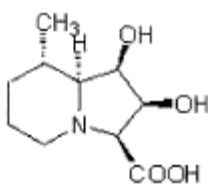
- 10 Los ISA de indolizidina de ejemplo de acuerdo con la invención se pueden seleccionar de las estructuras mostradas a continuación:



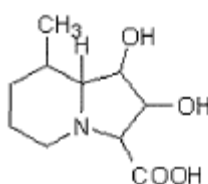
(M1)



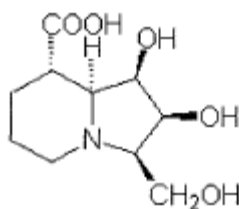
(M2)



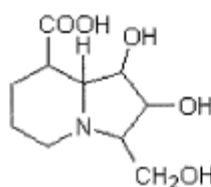
(M3)



(M4)



(M5)



(M6)

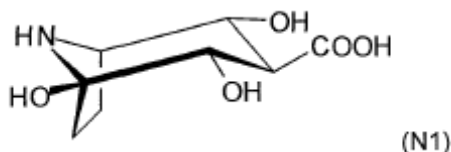
También se contemplan específicamente: (a) derivados de acilo (por ejemplo, O-acilo) de las estructuras anteriores y (b) análogos deshidroxilados de las estructuras anteriores en las que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo.

- 15 Los ISA de indolizidina para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar, por ejemplo, a partir de especie *Citrus* (Rutaceae), especie *Lotus*, especie *Castanospermum* y *Alexa* (Fabaceae); especies de *Eugenia* y *Syzygium* (Myrtaceae) y especie *Cucurbita* (Cucurbitaceae).

Ácidos iminoazúcar de nortropano de ejemplo

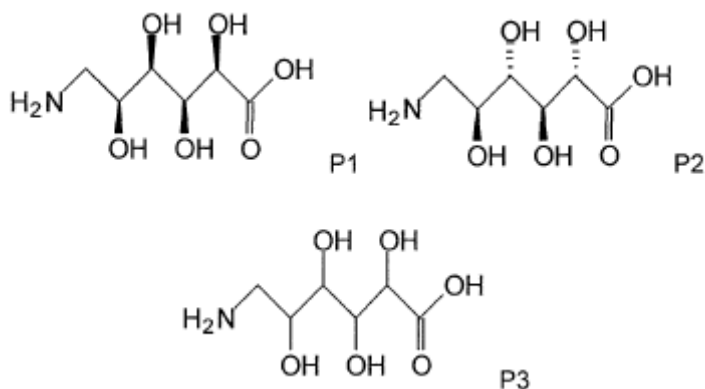
El ISA de la invención puede ser un ISA de nortropano que tiene al menos 2 (preferiblemente al menos 3) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo. También se contemplan derivados de N-ácido de los anteriores. Un ISA de nortropano de ejemplo de acuerdo con la invención tiene la estructura mostrada a continuación:

Los ISA de nortropano para uso de acuerdo con la invención se pueden aislar, por ejemplo, a partir de plantas en el Solanaceae (por ejemplo, especies *Solanum* y *Lycium*) y Moraceae (Mulberry).



Iminoazúcares con anillo abierto de ejemplo

También se consideran ácidos aminoazúcar formados por la apertura del anillo imino tal como el compuesto P1 y P2 (encontrado en especie *Cucurbita*) y P3. Tales compuestos pueden ser también los precursores biológicos de los ácidos iminoazúcar.



Actividades biológicas y atributos funcionales de los ISA de la invención

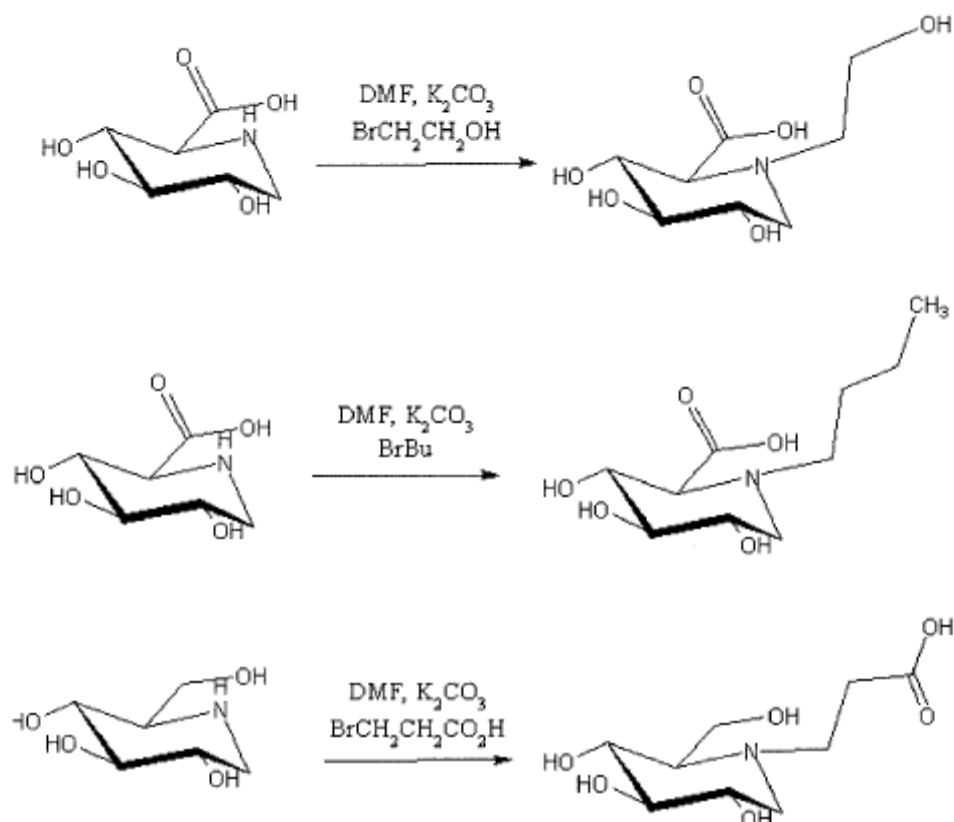
Los ISA de la invención preferiblemente no inhiben la actividad glucosidasa (o no inhiben la actividad glucosidasa en un grado clínicamente significativa). Los ISA de la invención no inhiben la actividad de la disacaridasa. Sin pretender estar limitado por ninguna teoría, se cree que los ISA de la invención pueden estimular, directa o indirectamente, la actividad y/o regeneración de las células β pancreáticas *in vivo*. De este modo, los ISA preferidos para el uso de acuerdo con la invención estimulan, directa o indirectamente, la actividad de las células β pancreáticas y/o la regeneración *in vivo* y mejoran la respuesta a la insulina. En tales realizaciones, los ISA encuentran una aplicación particular en el tratamiento de la diabetes tipo 1 (o insulinodependiente), ya que el ISA puede promover la regeneración funcional de las células β pancreáticas (tal como se informó para los extractos de *Gymnema* extracts by Shanmugasundaram et al. (1990) Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. J Ethnopharmacol. 1990 Oct; 30(3): 281-94).

Sin desear estar limitados por ninguna teoría, los compuestos pueden inhibir glucuronidasas, iduronidasa, sialidasa o hexosaminidasas. La reducción de la actividad glucuronidasa puede, por ejemplo, mejorar la función de las células beta, directa o indirectamente, mediante la eliminación mejorada de toxinas como glucurónidos.

Los compuestos que estimulan la actividad de las células β pancreáticas y/o la regeneración *in vivo* se pueden identificar fácilmente por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo ensayos basados en células tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, la liberación de insulina de células aisladas de islotes beta pancreáticos se pueden utilizar como un índice de actividad estimulante y se mide de acuerdo con el siguiente método.

Las ratas Spague Dawley son sacrificadas por dislocación cervical, después la rama del conducto biliar que conduce al hígado y el extremo duodenal del conducto en el páncreas se sujeta. A continuación, se inyecta solución de colagenasa (tipo V, 50 mg/mL) en el conducto biliar, distendiendo el páncreas, que luego se retira y se incuba durante 12 minutos a 37°C. Se adicionan 10 mL de solución reguladora de Hank fría y la suspensión se agita vigorosamente durante 1 min. Después de 5 minutos en hielo, los islotes asentados se lavan tres veces utilizando solución reguladora de Hank helada y los islotes de buen tamaño se seleccionan bajo el microscopio para transferir a un aparato de perfusión (Dickinson et al. 1997. Eur J Pharmacol., 339, 69-76). A continuación, los islotes de varias ratas se agruparon veinte seleccionados

- para cada cámara de perfusión que contenía solución reguladora Gey & Gey oxigenada (95% de O₂/5% de CO₂) con 1 mg/mL de albúmina de suero bovino y glucosa. Los islotes son perfusados durante una hora en medio que contiene glucosa 4 mM para equilibrar luego el perfusato se recoge en intervalos de dos minutos (siendo las primeras cinco fracciones utilizadas para establecer los niveles basales de insulina). El medio en el recipiente de perfusión se cambia entonces a uno que contiene la concentración de glucosa de prueba y el compuesto de prueba con fracciones posteriores que se recogen durante una hora más. A continuación, los niveles de insulina liberados en el perfusante se prueban utilizando un ELISA de 96 pozos.
- Los compuestos para uso de acuerdo con la invención que mejoran la respuesta a la insulina se pueden identificar fácilmente por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo ensayos basados en células tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, la capacidad de los compuestos de la invención para modular la tolerancia a carbohidratos se puede determinar mediante el siguiente ensayo *in vivo* en ratones delgados como modelo.
- Los ratones machos ddy (29-33 g) o C57BL/6J (4-6 semanas) se mantienen en ayunas durante la noche y luego se utilizan para pruebas agudas de carga de carbohidratos. Glucosa (2.5 g/kg de peso corporal), maltosa (2.5 g/kg de peso corporal), sacarosa (2.5 g/kg de peso corporal), isosacarosa (2.5 g/kg de peso corporal) o almidón (1 g/kg de peso corporal) así como los compuestos de prueba se disolvieron en solución de NaCl al 0.9% y se administraron a ratón a través de tubo de estómago. Un grupo de control se carga sólo con solución salina. Las muestras de sangre se toman de la vena de la cola en tubos de litio heparinizados y el plasma se separa por centrifugación tanto en precarga como en diversos momentos después de la carga. La glucosa y la insulina en plasma se miden utilizando kits disponibles comercialmente.
- Los compuestos que tienen una utilidad particular en el tratamiento de la obesidad se pueden identificar fácilmente por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo ensayos basados en células tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, el efecto de los compuestos de la invención en ratones obesos inducidos por la dieta se puede determinar de la siguiente manera.
- Se permite a ratones C57BL/6J machos (4-6 semanas) acceder libremente a una dieta rica en grasas (45% kcal obtenida a partir de grasa, Research Diets USA) y agua. Después de 7 días de aclimatación, los ratones se dosificaron en grupos de diez ratones por vía oral con diferentes concentraciones de compuesto de prueba o vehículo durante 32 días. Una prueba de carbohidratos alimentados y de ayuno utilizando glucosa se realiza a los 28 días con glucosa e insulina en plasma medidas. A continuación, todos los animales se devuelven a una dieta normal. Al final del experimento, se mide la glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol en plasma. Los niveles de grasa corporal, proteína, agua y cenizas de las canales también se miden utilizando técnicas de análisis químico estándar (Dickinson et al 2001. Physiology and Behaviour 74, 425-433).
- Los compuestos que tienen una utilidad particular en el tratamiento de la disfunción metabólica se pueden identificar fácilmente mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo ensayos basados en células tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, los ratones db/db se pueden utilizar como un modelo crónico de disfunción metabólica, como se describe a continuación.
- Se permitió a los ratones db/db obtenidos de Jackson Labs 14 días de aclimatación con acceso a comida estándar de laboratorio y agua, donde se controla el peso corporal antes de la experimentación. Los niveles de referencia de glucosa e insulina en plasma, así como HbA1c se miden para permitir la asignación de grupo y luego los animales se dosifican en grupos de doce ratones por vía oral con diferentes concentraciones de compuesto de prueba o vehículo durante 6 semanas. Mediciones diarias de la ingesta de alimentos y agua, así como el peso corporal se toman con HbA1c controladas semanalmente. Se lleva a cabo una prueba de carbohidratos alimentados y en ayuno utilizando glucosa en diferentes puntos del experimento con glucosa e insulina en plasma medidas.
- Síntesis química
- Los ISA descritos en este documento se pueden preparar por métodos convencionales. Los métodos para fabricar sistemas de anillo heteroaromáticos son bien conocidos en la técnica. En particular, los métodos de síntesis se discuten en Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Vol. 1 (Eds.: AR Katritzky, CW Rees), Pergamon Press, Oxford, 1984 y Comprehensive Heterocyclic Chemistry II: A Review of the Literature 1982-1995 The Structure, Reactions, Synthesis, and Uses of Heterocyclic Compounds, Alan R. Katritzky (Editor), Charles W. Rees (Editor), E.F.V. Scriven (Editor), Pergamon Pr, June 1996. Otros recursos generales que ayudarían a la síntesis de los compuestos de interés incluyen March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Wiley-Interscience; 5th edition (January 15, 2001). A continuación, se muestran algunos esquemas de síntesis de ejemplo para producir ISA para uso de acuerdo con la invención:



5 Se puede encontrar información adicional relevante en las siguientes referencias, cuyo contenido se incorpora en este documento como referencia:

Synthesis of 2S-carboxy-3R,4R,5S-trihydroxypiperidine, a naturally occurring inhibitor of β -D-glucuronidase. Bernotas, Ronald C.; Ganem, Bruce. Dep. Chem., Cornell Univ., Ithaca, NY, USA. Tetrahedron Letters (1985), 26(41), 4981-2

10 Enantiospecific syntheses of 2S,3R,4R,5S-trihydroxypiperidic acid, 2R,3R,4R,5S-trihydroxypiperidic acid, 2S,4S,5S-dihydroxypiperidic acid, and bulgecinine from D-glucuronolactone. Bashyal, B. P.; Chow, H. F.; Fleet, G. W. J. Dyson Perrins Lab., Oxford Univ., Oxford, UK. Tetrahedron Letters (1986), 27(27), 3205-8.

The synthesis of polyhydroxylated amino acids from glucuronolactone: enantiospecific syntheses of 2S,3R,4R,5S-trihydroxypiperidic acid, 2R,3R,4R,5S-trihydroxypiperidic acid and 2R,3R,4R-dihydroxyproline. Bashyal, Bharat P.; Chow, Hak Fun; Fellows, Linda E.; Fleet, George W. J. Dyson Perrins Lab., Oxford Univ., Oxford, UK. Tetrahedron (1987), 43(2), 415-22.

15 Synthesis of deoxymannojirimycin, fagomine, and deoxynojirimycin, 2-acetamido-1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-mannitol, 2-acetamido-1,5-imino-1,2,5-trideoxy-D-glucitol, 2S,3R,4R,5R-trihydroxypiperidic acid and 2S,3R,4R,5S-trihydroxypiperidic acid from methyl 3-O-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-imino- α -D-mannofuranoside. Fleet, George W. J.; Fellows, L. E.; Smith, Paul W. Dyson Perrins Lab., Oxford Univ., Oxford, UK. Tetrahedron (1987), 43(5), 979-90.

20 Preparation of 2-carboxy-3,4,5-trihydroxypiperidines as allergy inhibitors, antiarthritics, and for control of mucous production. Lockhoff, Oswald; Hayauchi, Yutaka. (Bayer A.-G., Fed. Rep. Ger.). Ger. Offen. (1988), 16 pp. CODEN: GWXXBX DE 3628486 A1 19880225 Patent written in German.

25 Synthesis of aza sugars as potent inhibitors of glycosidases. Le Merrer, Yves; Poitout, Lydie; Depezay, Jean-Claude; Dosbaa, Isabelle; Geoffroy, Sabine; Foglietti, Marie-Jose. Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université René Descartes, associé au CNRS, Paris, Fr. Bioorganic & Medicinal Chemistry (1997), 5(3), 519-533.

A new asymmetric synthesis of (2S,3R,4R,5S)-trihydroxypiperidic acid. Tsimilaza, Andriamihamina; Tite, Tony; Boutefnouchet, Sabrina; Lallemand, Marie-Christine; Tillequin, Francois; Husson, Henri-Philippe. Laboratoire de

Pharmacognosie, Faculte des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, UMR 8638 Associee au CNRS, l'Universite Paris-Descartes, Paris, Fr. Tetrahedron: Asymmetry (2007), 18(13), 1585-1588.

- 5 Synthesis of both enantiomers of hydroxypipicolinic acid derivatives equivalent to 5-azapyranuronic acids and evaluation of their inhibitory activities against glycosidases. Yoshimura, Yuichi; Ohara, Chiaki; Imahori, Tatsushi; Saito, Yukako; Kato, Atsushi; Miyauchi, Saori; Adachi, Isao; Takahata, Hiroki. Faculty of Pharmaceutical Sciences, 4-4-1, Komatsushima, Tohoku Pharmaceutical University, Aoba-ku, Miyagi, Sendai, Japan. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008), 16(17), 8273-8286.

Purificación de fuentes botánicas

- 10 Los ISA descritos en este documento se pueden aislar a partir de fuentes naturales. Por ejemplo, se puede usar material vegetal de las siguientes fuentes botánicas como material de partida para el aislamiento y purificación de los ISA para uso de acuerdo con la invención: especies *Stevia*, *Gymnema*, *Citrus*, *Andrographis paniculata*, *Lycium*, leguminous spp. por ejemplo, especies *Aspalanthus linearis* (Rooibos), *Glycine max*, *Lotus* y especies *Castanospermum australe* (Fabaceae) y Cucurbitaceae. Los ISA de la invención son solubles en agua y se puede concentrar mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de intercambio catiónico. También se pueden utilizar métodos de exclusión de tamaño para concentrarlos. De este modo, se apreciará que los expertos en el arte pueden purificar y aislar
- 15 fácilmente los ISA de la invención utilizando técnicas estándar.

Aplicaciones médicas

- 20 La invención encuentra amplia aplicación en el tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con síndrome metabólico, incluyendo por ejemplo, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, glucosuria, acidosis metabólica, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, degeneración macular, glomeruloesclerosis, cardiomiopatía diabética, resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, artritis, hipertensión, hiperlipidemia, osteoporosis, osteopenia, pérdida ósea, síndromes óseos quebradizos, síndrome coronario agudo, infertilidad, síndrome del intestino corto, fatiga crónica, trastornos alimentarios, disfunción de la motilidad intestinal y disfunción del metabolismo del azúcar.
- 25 La invención también se puede usar para suprimir el apetito.

Resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes

- 30 La invención encuentra aplicación en el tratamiento de la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina se caracteriza por una acción reducida de la insulina en el músculo esquelético, los adipocitos y los hepatocitos, de modo que las cantidades normales de insulina resultan inadecuadas para producir una respuesta normal de insulina a partir de las células de estos tejidos. En los adipocitos, la resistencia a la insulina resulta en la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, dando lugar a ácidos grasos libres elevados en el plasma sanguíneo. En los músculos, la resistencia a la insulina reduce la captación de glucosa mientras que en los hepatocitos reduce el almacenamiento de glucosa. En ambos casos se produce una elevación de las concentraciones de glucosa en sangre. Los altos niveles en plasma de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo progresan a síndrome metabólico y diabetes tipo 2.

- 35 La invención encuentra aplicación en el tratamiento del síndrome metabólico (como se define en este documento). El trastorno también se conoce como síndrome (metabólico) X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y CHAOS.

- 40 La invención encuentra aplicación en el tratamiento de enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, incluyendo, por ejemplo: hígado graso (frecuentemente progresando a enfermedad hepática grasa no alcohólica), síndrome de ovario poliquístico, hemocromatosis (sobrecarga de hierro) y acantosis nigricans (parches oscuros en la piel).

- 45 La invención encuentra aplicación en el tratamiento de la diabetes de tipo 2. La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica que se caracteriza por niveles persistentemente elevados de glucosa en la sangre (hiperglucemia). La resistencia a la insulina junto con la alteración de la secreción de insulina de las células β pancreáticas caracteriza la enfermedad. La progresión de la resistencia a la insulina a la diabetes tipo 2 está marcada por el desarrollo de hiperglucemia después de comer cuando las células β pancreáticas son incapaces de producir insulina adecuada para mantener los niveles normales de azúcar en la sangre (euglicemia).

- 50 La invención encuentra aplicación en el tratamiento de la diabetes de tipo 1 (o diabetes dependiente de insulina). La diabetes tipo 1 se caracteriza por la pérdida de las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que conduce a una deficiencia de insulina. La principal causa de esta pérdida de células beta es un ataque autoinmune mediado por células T. No se conoce ninguna medida preventiva que se pueda tomar contra la diabetes tipo 1, que comprende hasta un 10% de los casos de diabetes mellitus en Norteamérica y Europa. La mayoría de las personas afectadas son por otra parte saludables y de peso saludable cuando se produce. La sensibilidad y la capacidad de respuesta a la insulina suelen ser normales, especialmente en las primeras etapas.

De este modo, la invención encuentra amplia aplicación en el tratamiento y/o profilaxis del síndrome metabólico y/o diabetes (incluyendo diabetes tipo 1 y tipo 2 y resistencia a la insulina), incluyendo en particular obesidad (especialmente obesidad central) y niveles elevados de triglicéridos en suero.

- 5 Estas aplicaciones médicas se pueden aplicar a cualquier animal de sangre caliente, incluyendo seres humanos. Las aplicaciones incluyen aplicaciones veterinarias, en las que los ISA se administran a animales no humanos, incluyendo primates, perros, gatos, caballos, ganado vacuno y ovejas.

Aspectos de control de calidad de hierbas

Esta sección describe métodos y técnicas para procesar y caracterizar muestras de materiales vegetales.

- 10 Las muestras se pueden procesar previamente en cualquiera de una amplia variedad de formas antes de la caracterización. El procesamiento previo puede implicar procesamiento previo físico o químico, por ejemplo, pulverización, molienda, congelación, evaporación, filtración, prensado, secado por pulverización, extrusión, extracción de solvente supercrítico y producción de tintura.

- 15 Preferiblemente, la muestra se fracciona antes de la caracterización. Se puede emplear cualquier método de fraccionamiento apropiado, incluyendo la extracción(es) con solvente. En una realización preferida, la muestra se fracciona mediante: (a) cromatografía de intercambio iónico para producir un extracto enriquecido en compuestos polares y un residuo no polar; y luego (b) fraccionamiento cromatográfico del extracto enriquecido de la etapa (a) para producir una o más fracciones polares que comprenden uno o más fitoquímico(s) polar(es). En tales realizaciones, el fraccionamiento cromatográfico comprende preferiblemente cromatografía gas-líquido (GC), por ejemplo, GC-MS. Cuando se utiliza GC, el extracto enriquecido se puede derivar antes de la cromatografía.

- 20 Detección de ácidos iminoazúcar

Se puede emplear cualquier forma apropiada de caracterización de una muestra, incluyendo, sin limitación, caracterización funcional y/o física y/o química, suficiente para detectar la presencia o ausencia o medir la cantidad de ácido iminoazúcar en la muestra.

- 25 Cuando las muestras se caracterizan físicamente, la caracterización se puede seleccionar de: (a) cuantificación del(los) componente(s) fitoquímico(s); y/o (b) medición de la pureza de los constituyentes; y/o (c) determinación del peso molecular (o distribución de pesos moleculares o sus diversas funciones estadísticas en el caso de fracciones que comprenden una pluralidad de diferentes constituyente(s) fitoquímico(s)); y/o (d) determinación de la fórmula molecular (e) (por ejemplo, por resonancia magnética nuclear); y/o (e) análisis espectral.

El análisis espectral es particularmente preferido y puede producir cualquiera o todos los siguientes espectros:

- 30 (a) espectros de masas (por ejemplo, el valor de masa a carga (m/z) frente a la abundancia), y/o
(b) datos cromatográficos (por ejemplo, espectros, tiempos de retención de columnas, perfiles de elución, etc.) y/o
(c) espectros de arreglo de fotodiodos (PDA) (por ejemplo, en rangos tanto UV como visible), y/o
(d) detección electroquímica
35 (e) espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) (por ejemplo, conjuntos de datos espectrales obtenidos mediante ^1H y/o ^{13}C RMN).

Cuando se utiliza de acuerdo con la invención, el análisis espectral se puede acoplar con fraccionamiento de la muestra, por ejemplo, mediante el uso de GC-MS y/o HPLC-PDA-MS.

Particularmente preferido es el uso de GC-MS para detectar la presencia o ausencia o medir la cantidad de ácido iminoazúcar en la muestra.

- 40 Cuando las muestras se caracterizan químicamente, la caracterización se puede seleccionar a partir de mediciones de la reactividad química de lo(s) constituyente(s) fitoquímico(s), de la solubilidad de lo(s) constituyente(s) fitoquímico(s), de la estabilidad y punto de fusión del(los) constituyente(s) fitoquímico(s) o de cualquier combinación de los mismos.

- 45 Cuando las muestras se caracterizan funcionalmente, la caracterización puede comprender un ensayo biológico, por ejemplo, seleccionado de ensayos *in vivo* o *in vitro*, ensayos de inhibición de enzimas (por ejemplo, inhibición de lipasa y/o glucosidasa), ensayos de unión a receptores, ensayos celulares (por ejemplo, la replicación celular, el patógeno celular, la interacción célula-célula y los ensayos de secreción celular), inmunoensayos, ensayos de actividad antimicrobiana (por ejemplo, unión y/o replicación de células bacterianas y víricas), ensayos de toxicidad (por ejemplo, ensayos de LD_{50}) o cualquier combinación de los mismos.

Extracciones de solventes

Los solventes polares apropiados para uso en el proceso de la invención incluyen, sin limitación, solventes orgánicos tales como alcoholes orgánicos. Se prefieren etanol y metanol, así como mezclas de etanol/agua o metanol/agua. Preferiblemente, el solvente polar se selecciona de 51 a 80% de etanol/agua, 31 a 50% de etanol/agua y hasta 30% de etanol/agua. Particularmente preferido es un solvente polar que es aproximadamente 50% de etanol/agua. Los solventes no polares apropiados para uso en el proceso de la invención incluyen, sin limitación, solventes orgánicos tales como hexano y diclorometano (DCM) o cloroformo. Particularmente preferido es el diclorometano. Las condiciones (tiempo, temperatura, grado de agitación, etc.) bajo las cuales se realizan las extracciones se pueden determinar de forma empírica fácilmente y varían de acuerdo con la naturaleza de la muestra, la naturaleza de cualquier procesamiento previo y el sistema de solventes seleccionado.

Fraccionamiento cromatográfico

El fraccionamiento cromatográfico puede comprender cromatografía de gas-líquido. La cromatografía de gas-líquido es un proceso mediante el cual una mezcla compleja de sustancias volátiles se separa en sus constituyentes por partición de la muestra entre un gas inerte bajo presión y una capa delgada de líquido no volátil revestido sobre un soporte inerte dentro de una columna caliente. Con el fin de conseguir una buena separación de compuestos específicos en una mezcla, es crucial utilizar una columna con las características correctas. La naturaleza del soporte sólido, el tipo y la cantidad de fase líquida, el método de empaquetado, la longitud total y la temperatura de la columna son factores importantes.

Los expertos en el arte, mediante ensayo y error de rutina y utilizando conocimientos generales comunes, podrán determinar fácilmente las características de columna apropiadas de acuerdo con las circunstancias, incluyendo, *inter alia*, el extracto en estudio y la naturaleza del solvente utilizado en la extracción y los tipos de productos químicos esperados en esos solventes. Son particularmente preferidas y útiles en muchas circunstancias las columnas capilares revestidas con una fase líquida no polar (fase estacionaria BPX5 de 25 x 0.22 mm id x 0.25 µm, producida por SGE Ltd., o equivalentes de la misma).

Muchos compuestos no son apropiados para inyección directa en un cromatógrafo de gases debido a su alta polaridad, baja volatilidad o inestabilidad térmica. Los compuestos que son altamente hidroxilados son difíciles de vaporizar debido a la unión intermolecular de hidrógeno. Sin embargo, reemplazando los hidrógenos de hidroxilo con otros grupos químicos, se pueden hacer suficientemente volátiles para el análisis de GC. Los dos medios más populares de derivación de los grupos hidroxilo son acetilación y sililación, donde se forman acetilatos [CH₃CO-O-R] o éteres de sililo, por ejemplo, éteres de trimetilsililo (TMS) [(CH₃)₃Si-O-R]. De este modo, en realizaciones en las que el extracto enriquecido se fracciona cromatográficamente en una escala analítica, los constituyentes fotoquímicos del extracto enriquecido se derivan preferiblemente, por ejemplo, por acilación o sililación. Se prefiere particularmente la derivación de trimetilsililo (TMS).

El fraccionamiento cromatográfico puede comprender también cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio iónico purifica parcialmente las especies iónicas para concentrarlas y eliminar las sustancias contaminantes. Los expertos en el arte, mediante ensayo y error de rutina y utilizando conocimientos generales comunes, podrán identificar fácilmente materiales de empaquetado de columna apropiados y fase(s) móvil(es), que dependerá(n), *inter alia*, de las cantidades a fraccionar, de los extractos estudiados y la naturaleza del solvente utilizado en la extracción. Particularmente preferidos en los métodos de la presente invención son resinas de intercambio catiónico fuertemente ácidas que se pueden utilizar en ya sea la forma de ácido libre o hidrógeno (H⁺) o en la forma de sal de amonio (NH₄⁺). Estas formas adsorben los cationes de la solución y liberan un número equivalente de contraiones en la solución (ya sea iones H⁺ o NH₄⁺, dependiendo de la forma utilizada). También se prefieren resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas que cuando se utilizan en la forma hidróxido (OH⁻) se unen fuertemente a ácidos iminoazúcar. Los ácidos iminoazúcar se pueden liberar entonces mediante el uso de ácidos tales como ácido acético (por ejemplo, una solución 2M).

Caracterización de fracciones

En general, se pueden utilizar cualquiera o todos los siguientes enfoques:

(a) Caracterización funcional

La caracterización funcional puede comprender un ensayo biológico. Los ensayos biológicos se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, y pueden incluir ensayos de inhibición enzimática (por ejemplo, inhibición de la glucosidasa y/o lipasa). Otros ensayos biológicos incluyen ensayos de unión a receptores, ensayos celulares (incluyendo ensayos de replicación celular, interacción de célula-patógeno y célula-célula y secreción celular), inmunoensayos, ensayos de actividad antimicrobiana (por ejemplo, unión y/o replicación de células bacterianas y víricas) y ensayos de toxicidad (por ejemplo, ensayos de LD₅₀).

La caracterización funcional también se puede realizar indirectamente mediante una forma de caracterización que permita la identificación de uno o más índices de actividad biológica.

(b) Caracterización física

- 5 Esto puede tomar la forma de cuantificación del(los) componente(s) fitoquímico(s) presentes en cualquier fracción dada o en cualquier otra etapa del proceso, medición de la pureza de los constituyentes, determinación del peso molecular (o distribución de pesos moleculares o diversas funciones estadísticas del mismo en el caso de fracciones que comprenden una pluralidad de constituyente(s) fitoquímico(s) diferente(s)), determinación de la fórmula molecular (e) (por ejemplo, por resonancia magnética nuclear) y diversos análisis espectrales.

Las características espectrales particularmente útiles incluyen:

- 10 • Espectro de masas (por ejemplo, los valores de masa para carga (m/z) frente a la abundancia), y/o
- Datos cromatográficos (por ejemplo, espectros, tiempos de retención de columnas, perfiles de elución, etc.), y/o
- Espectros de arreglo de fotodiodos (PDA) (por ejemplo, tanto en rangos UV como visible), y/o
- Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) (incluyendo conjuntos de datos espectrales obtenidos mediante ^1H y/o ^{13}C RMN).
- 15 La caracterización espectral se puede acoplar con la etapa de fraccionamiento. Por ejemplo, se pueden utilizar GC-MS y HPLC-PDAMS (como se describe en este documento) para acoplar el fraccionamiento con la obtención de datos espectrales de espectro de masas, espectrales UV-visible y cromatográficos.

Cualquiera o todas las características anteriores se pueden utilizar para definir una "huella digital química" para cualquier muestra dada (o cualquier fracción o constituyente fitoquímico de la misma).

20 (c) Caracterización química

Esto puede tomar la forma de mediciones, *inter alia*, de la reactividad química del(los) constituyente(s) fitoquímico(s), su solubilidad, estabilidad y punto de fusión.

Posología

- 25 Los ISA de la presente invención se pueden administrar por vías oral o parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, de vías aéreas (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual). Se prefiere la administración oral.

La cantidad de ISA administrada puede variar ampliamente de acuerdo con la unidad de dosificación particular empleada, el período de tratamiento, la edad y el sexo del paciente tratado, la naturaleza y magnitud del trastorno tratado y el ISA particular seleccionado.

- 30 Además, los ISA de la invención se pueden utilizar conjuntamente con otros agentes conocidos como útiles en el tratamiento del síndrome metabólico y/o diabetes (incluyendo diabetes tipo 1 y tipo 2 y resistencia a la insulina) y en tales realizaciones la dosis se puede ajustar de acuerdo con lo anterior.

- 35 En general, la cantidad eficaz del ISA administrado generalmente oscilará entre aproximadamente 0.01 mg/kg y 500 mg/kg diarios. Una dosis unitaria puede contener de 0.05 a 500 mg del ISA, y se puede tomar una o más veces al día. El ISA se puede administrar con un portador farmacéutico utilizando formas unitarias de dosificación convencionales ya sea por vía oral, parenteral o tópica, como se describe a continuación.

- 40 La vía de administración preferida es la administración oral. En general, una dosis apropiada estará en el intervalo de 0.01 a 500 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferiblemente en el intervalo de 0.1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día y más preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 mg por kilogramo de peso corporal por día.

- 45 La dosis deseada se presenta preferiblemente como una dosis única para la administración diaria. Sin embargo, también se pueden emplear dos, tres, cuatro, cinco o seis subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. Estas subdosis se pueden administrar en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 0.001 a 100 mg, preferiblemente de 0.01 a 10 mg, y más preferiblemente de 0.5 a 1.0 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Formulación

Las composiciones de la invención comprenden el ISA de la invención, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El ISA de la invención puede adoptar cualquier forma. Puede ser sintética, purificada o aislada a partir de fuentes naturales (por ejemplo, de cualquiera de las fuentes botánicas identificadas en este documento, incluyendo, por ejemplo, una fuente botánica seleccionada de: (a) *Stevia* spp. (por ejemplo, *S. rebaudiana*); (b) *Gymnema* spp. (por ejemplo, *G. sylvestre*); (c) *Andrographis* spp. (por ejemplo, *A. paniculata*); (d) especies leguminosas (por ejemplo, *Aspalanthus* spp., *Baphia* spp., *Glycine max*, *Alexa* spp. *Castanospermum australe*), *Lotus* spp.; (e) plantas de la familia Rutaceae (por ejemplo, *Citrus* spp., por ejemplo, *C. aurantium*); (f) *Lycium barbarum* (Goji) y (g) plantas de la Cucurbitaceae (por ejemplo, *C. ficifolia*, Siam Pumpkin y *Momordica charantia*).

Cuando se aísla de una fuente natural, el ISA de la invención se puede purificar.

En las realizaciones en las que el ISA de la invención se formula junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar cualquier excipiente apropiado, incluyendo, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes apropiados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido alginico son agentes desintegrantes apropiados. Los agentes de unión pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar cualquier forma apropiada e incluyen, por ejemplo, comprimidos, elixires, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, gránulos y aerosoles.

La composición farmacéutica puede tomar la forma de un kit de partes. El kit puede comprender la composición de la invención junto con instrucciones de uso y/o una pluralidad de diferentes componentes en forma de dosificación unitaria.

Los comprimidos para uso oral pueden incluir el ISA de la invención. Los comprimidos pueden contener el ISA de la invención mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes apropiados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido alginico son agentes desintegrantes apropiados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el ISA de la invención se mezcla con un diluyente sólido y cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Para administración oral, el ISA de la invención se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, trociscos, comprimidos para deshacer en la boca, masas fundidas, polvos, gránulos, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones (soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones que pueden ser acuosas o no acuosas). Las formas de dosificación unitarias sólidas pueden ser una cápsula que puede ser del tipo ordinario de gelatina dura o blanda que contiene, por ejemplo, surfactantes, lubricantes y cargas inertes tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. En otra realización, los ISA de la invención se comprimen con bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes desintegrantes destinados a ayudar a la disgregación y disolución del comprimido después de la administración tales como almidón de patata, ácido alginico, almidón de maíz y goma de guar, lubricantes destinados a mejorar el flujo de granulaciones de tabletas y para evitar la adhesión del material del comprimido a las superficies de los troqueles y matrices del comprimido, por ejemplo, talco, ácido esteárico, o estearato de magnesio, calcio o zinc, colorantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes destinados a mejorar las cualidades estéticas de los comprimidos y hacerlos más aceptables para el paciente. Los excipientes apropiados para uso en formas de dosificación líquidas orales incluyen diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes polietilénicos, ya sea con o sin la adición de un surfactante, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable.

Los ISA de la invención también se pueden administrar por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o interperitoneal.

En tales realizaciones, el ISA se proporciona como dosis inyectables en un diluyente fisiológicamente aceptable junto con un portador farmacéutico (que puede ser un líquido estéril o una mezcla de líquidos). Los líquidos apropiados incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionadas, un alcohol (tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico), glicoles (tales como propilenglicol o polietilenglicol), cetales de glicerol (tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol), éteres (tales como poli (etilenglicol) 400), un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un surfactante farmacéuticamente

aceptable (tal como un jabón o un detergente), un agente de suspensión (tal como pectina, carhómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa) o un agente emulsionante y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los aceites apropiados que se pueden utilizar en las formulaciones parenterales de esta invención son los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, vaselina y aceite mineral.

Los ácidos grasos apropiados incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Los ésteres de ácidos grasos apropiados son, por ejemplo, oleato de etilo y miristato de isopropilo.

Los jabones apropiados incluyen sales de metal alcalino graso, amonio y trietanolamina y detergentes apropiados incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, haluros de dimetil dialquilamonio, haluros de alquilpiridinio y acetatos de alquilaminas; detergentes aniónicos, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido y sulfosuccinatos; detergentes no iónicos, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietilenopolipropileno; y detergentes anfóteros, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos y sales de 2-alquilimidazolina de amonio cuaternario, así como mezclas.

Las composiciones parenterales de esta invención contendrán por lo general de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 25% en peso del ISA de la invención en solución. También se pueden utilizar conservantes y soluciones reguladoras. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener un surfactante no iónico que tiene un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de surfactante en tales formulaciones oscila entre aproximadamente 5 a aproximadamente 15% en peso. El surfactante puede ser un componente único que tiene el HLB anterior o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tienen el HLB deseado. Son ilustrativos de los surfactantes utilizados en formulaciones parenterales la clase de ésteres de ácidos grasos de polietilen sorbitano, por ejemplo, monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Cuando se utilizan de manera adjunta, los ISA de la invención se pueden formular para su uso con uno o más otro(s) fármaco(s). En particular, los ISA de la invención se pueden utilizar en combinación con agentes antidiabéticos (como se describe en este documento).

Por ejemplo, los ISA de la invención se pueden utilizar con agentes antidiabéticos seleccionados de las siguientes clases de fármacos: biguanida, sulfonilurea, tiazolidindionas, inhibidores de α -glucosidasa, meglitinidas, análogos de péptidos, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) y agonista de amilina. El uso coadyuvante se puede reflejar en una dosificación unitaria específica diseñada para ser compatible (o sinergizar) con el(los) otro(s) fármaco(s), o en formulaciones en las que el ISA se mezcla con uno o más agente(s) antidiabético(s) (o de otra manera físicamente asociado con el(los) otro(s) agente(s) dentro de una única dosis unitaria). Los usos adjuntivos de los ISA de la invención también se pueden reflejar en la composición de los kits farmacéuticos de la invención, en los que el ISA de la invención está coempaquetado (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias) con lo(s) fármaco(s) antidiabético(s). El uso adjuntivo también se puede reflejar en información y/o instrucciones relacionadas con la coadministración del ISA con fármaco(s) antidiabético(s).

Los ISA de la invención también se pueden formular como nutracéuticos que forman parte de una bebida o alimento.

Ejemplificación

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos. Éstos son meramente de ejemplo y con fines solamente ilustrativos: no están destinados a limitar de ninguna manera el alcance del monopolio reivindicado o de la invención descrita. Estos ejemplos constituyen el mejor modo actualmente contemplado para la puesta en práctica de la invención.

Ejemplo 1: Detección del compuesto de fórmula (G2) en *Gymnema*

Gymnema sylvestre es una liana o planta trepadora con tallos de hasta 8 m de longitud. Crece en bosques abiertos y arbustos a una altitud de 100-1000 m en la India, China, Indonesia, Japón, Malasia, Sri Lanka, Vietnam y Sudáfrica: Tanto la hoja como la raíz se utilizan en la medicina ayurvédica. Debido a su propiedad de abolir el sabor del azúcar se le dio los nombres hindúes Gurmar y Madhunashini significado "que destruye el azúcar". La hierba se utiliza tradicionalmente para el tratamiento del síndrome metabólico y extractos de *Gymnema* se venden en Japón para el control de la obesidad.

Un estudio controlado sobre diabéticos dependientes de la insulina encontró que un extracto de *Gymnema* soluble en agua (400 mg/día) redujo los requerimientos de insulina (aproximadamente 50%) (Shanmugasundaram et al. (1990), J Ethnopharmacol. 30:281-294). Durante la duración del tratamiento, *Gymnema* disminuyó los niveles medios de glucosa en sangre en ayunas (alrededor del 35%), la hemoglobina glicosilada y los niveles de proteína en plasma glicosilada a partir de los valores basales. El colesterol se redujo significativamente y se llevó a niveles casi normales. También disminuyeron los triglicéridos, los ácidos grasos libres y la amilasa sérica. El período de tratamiento varió de 6-30

meses. La disminución significativa de la hemoglobina glicosilada se produjo después de 6-8 meses de tratamiento con *Gymnema*, pero permaneció significativamente más alta que los valores normales. Ninguna de estas reducciones se observó en los pacientes de control en la terapia de insulina sola que fueron estudiados durante un período de 10-12 meses. Los autores sugirieron que *Gymnema* mejoró la producción de insulina endógena, posiblemente por regeneración pancreática, ya que los niveles de péptido C, un subproducto de la conversión de la proinsulina en insulina, aparentemente aumentaron (en comparación con el grupo con insulina sola y sujetos normales).

Un segundo estudio realizado por el mismo grupo de investigación encontró que la misma preparación de *Gymnema* (400 mg/día) produjo resultados similares para diabéticos no dependientes de la insulina (Baskaran et al. (1990) J Ethnopharmacol. 30:295-300). La glucemia en sangre en ayunas, la hemoglobina glicosilada y la proteína en plasma glicosilada se redujeron significativamente en comparación con los valores basales ($p < 0.001$) después de 18-20 meses de tratamiento. Ninguna de estas reducciones se observó en pacientes que recibieron terapia convencional sola que fueron estudiados durante un período de 10-12 meses. Al final del período de tratamiento, los niveles de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres también se redujeron significativamente en comparación con los valores basales en los que recibieron *Gymnema* ($p < 0.001$). Los pacientes de control que recibieron sólo terapia convencional lograron reducciones de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres ($p < 0.05$ - $p < 0.001$). Los niveles de insulina sérica en ayunas y después de la comida aumentaron significativamente en el grupo de *Gymnema* en comparación con los que tomaron sólo fármacos convencionales ($p < 0.01$). Veintiuno de los 22 pacientes fueron capaces de reducir su ingesta de fármacos hipoglucemiantes; 5 de estos fármacos hipoglucémicos descontinuados completamente y mantuvieron su homeostasis de glucosa en sangre con extracto de *Gymnema* solo. La sugerencia de los autores de la regeneración de células beta o la reparación facilitada por *Gymnema* fue apoyada por los mayores niveles de insulina en el suero de los pacientes después de la suplementación con *Gymnema*. La administración de *Gymnema* a voluntarios sanos no produjo ninguna reducción aguda en el nivel de glucosa en sangre en ayunas.

La traza mostrada en la Figura 1(a) es el cromatograma de GC-MS de extracto acuoso de *Gymnema* que muestra el compuesto de fórmula (G2) (derivado de trimetilsililo) como componente principal a 9.26 minutos después de la eliminación de azúcares.

Ejemplo 2. Captación de G2 después de la administración oral de *Gymnema sylvestre*

En un experimento preliminar sobre un voluntario masculino para determinar si el G2 se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal, se bebe un extracto acuoso de hojas de *Gymnema* obtenido comercialmente que contiene 7 mg de G2 y se controla la orina para determinar G2 durante 4 horas (0-2 horas y 2-4 horas). Se adicionó un patrón interno de 1 mg de castanospermina a las dos muestras de orina antes de aplicar a una resina de intercambio catiónico (IR120 en la forma H^+). Después de lavar la resina con agua abundante, el material unido se desplazó utilizando una solución de solución de NH_4^+ 2M en exceso y se secó para análisis de GC-MS. Las muestras se derivaron utilizando Pierce Tri-Sil para producir derivados trimetil-sililo de los iminoazúcar y ácidos iminoazúcar. La GC-MS se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Perkin Elmer TurboMass Gold, con un sistema de filtro de iones cuadrupolo, que se hizo funcionar a 250 °C constantemente durante el análisis. El intervalo de masa del detector se ajustó a 100 a 650 amu. La temperatura de la línea de transferencia (GC a MS) se mantuvo a 250°C. La columna de GC era una columna de sílica fundida de alta polaridad (columna VF-5ms de Varian "Factor Four", 25 m x 0.25 mm de i.d., espesor de fase de 0.25 μm). La velocidad de flujo del gas portador (helio) fue de 1 mL min⁻¹. G2 da un espectro de masas característico como el derivado tms y fue bien resuelto permitiendo la cuantificación.

El G2 se detectó en la orina en ambos períodos de tiempo y los 7 mg parecían recuperarse dentro de las cuatro horas.

El espectro de masas característico (tms) del ácido iminoazúcar G2 se muestra en la figura 1(b).

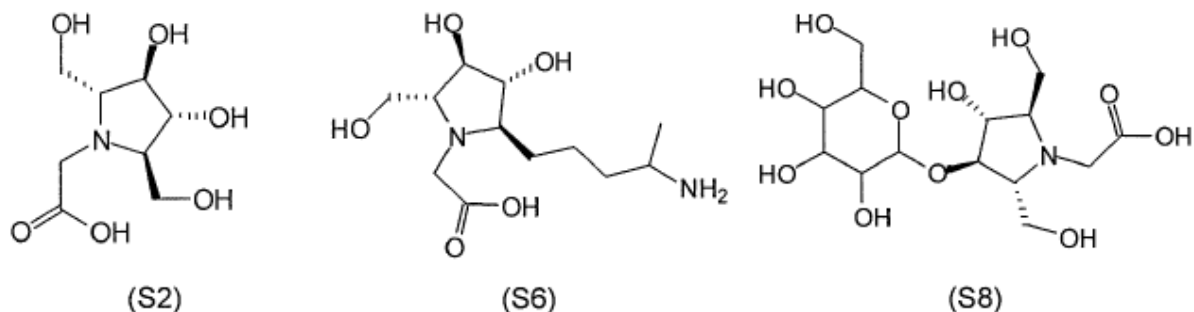
Ejemplo 3: Detección de ISA en *Stevia rebaudiana*

Es bien conocido que la *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) contiene los edulcorantes llamados esteviósidos y compuestos relacionados. La *Stevia* es muy prometedora en la investigación médica para el tratamiento de condiciones tales como la obesidad y la presión arterial alta. Se ha informado que los glucósidos de esteviol tienen un efecto despreciable sobre la glucosa en sangre (véase, por ejemplo, Barriocanal LA et al., 2008, Regul. Toxicol. Pharmacol. 51:37-41), se ha demostrado que el esteviosido induce efectos antihiper glucémicos, insulino trópicos y glucagonostáticos *in vivo* en ratas en varios estudios. Sin embargo, se ha informado de que los propios esteviósidos tienen una posible actividad mutagénica y por lo tanto el fraccionamiento de material derivado de *Stevia* para eliminar los esteviósidos podría mejorar los productos para uso antidiabético u obesidad.

La traza mostrada en la figura 1 (c) es el cromatograma GC-MS de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* después de la eliminación de azúcares que muestran varios ácidos iminoazúcar y un iminoazúcar a 7.29 minutos (DMDP).

Los principales ácidos iminoazúcar en *S. rebaudiana* son nuevas pirrolidinas tales como las mostradas a continuación. También se observa que la longitud de la cadena de carbono ácido sobre el nitrógeno es más larga que la que se muestra con la adición de 14 unidades de masa (CH_2) observadas en los espectros de masas de los compuestos originales identificados. También están presentes piperidinas estructuralmente relacionadas con 1-desoxinojirimicina tal

como se muestra en las estructuras T1 y G6. Las formas O-butilo de los compuestos también existen en Stevia, aunque estas longitudes de cadena de carbono también podrían variar. El iminoazúcar DMDP es el compuesto S2 sin el ácido en el nitrógeno.



5 Ejemplo 4: Detección de ISA en *Citrus* spp

Las especies *Citrus* (Rutaceae) contienen ácidos de iminoazúcar de piperidina relacionados con el compuesto de fórmula (G2) con nuevos derivados de N y O-butilo, pero también parece que siempre contienen ácidos de pirrolizidina tales como el compuesto de fórmula (C1) mostrado anteriormente (epiallexafloro). Este ISA se aisló primero de las especies de *Alexa* (Leguminosae) (Pereira et al. (1991): Isolation of 7a-epiallexaflorine from leaves of *Alexa grandiflora*-a unique pyrrolizidine amino acid with a carboxylic acid substituent at C-3. *Tetrahedron* 47 (29): 5637-5640): El ácido pirrolizidínico parece estar omnipresente en especies de *Citrus*. *Citrus* spp. contiene niveles bajos de los ácidos iminoazúcar en comparación con *Gymnema* y *Stevia*. La naranja amarga (*Citrus aurantium*) en China y el pomelo tienen demandas anecdóticas para usos antidiabéticos o de control de peso. Se encontró que el ISA S9 era un componente más importante de las naranjas amargas que el C1.

15 Ejemplo 5: Inhibición de glucosidasas por ISA

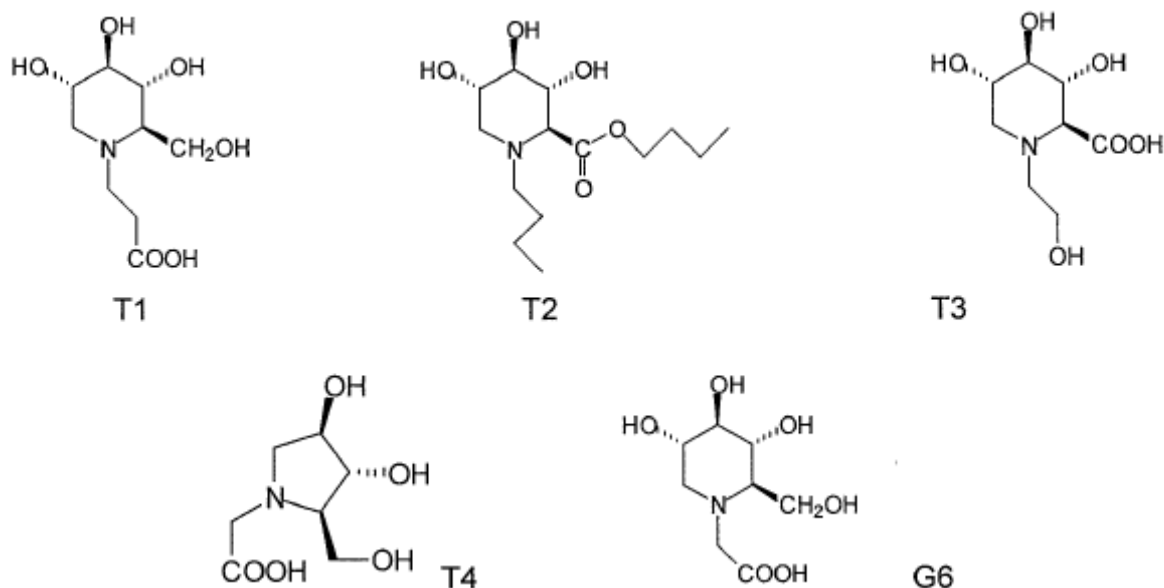
Los resultados tabulados a continuación se obtuvieron utilizando glucosidasas y sustratos de *p*-nitrofenilo comercialmente disponibles utilizando métodos estándar descritos, por ejemplo, por Watson et al (1997) *Phytochemistry* 46 255-259. Todas las enzimas y sustratos se compraron a Sigma. Las soluciones de enzima y sustrato se hicieron utilizando soluciones reguladoras de fosfato de sodio a los valores de pH óptimo. Las enzimas utilizadas fueron α -D-glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus*, *Oryza sativa*), α -D-glucosidasa (almendra), α -D-manosidasa (judía sable), α -D-galactosidasa (granos de café verde), β -D-galactosidasa (hígado de bovino), α -L-flucosidasa (riñón de bovino), N-acetil- β -D-glucosaminidasa (riñón de bovino, judía sable, *Aspergillus oryzae*), Naringinasa (*Penicillium decumbens*) y amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*). Todas las enzimas se usaron con los sustratos *p*-nitrofenilo apropiados (5 mM). La actividad de la amiloglucosidasa se midió utilizando amilopectina (0.1%) (Merck) mezclada con solución reguladora de fosfato de sodio, pH 4.5 en una botella de vidrio y se calentó en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos para disolver con glucosa liberada medida utilizando una solución de detección de glucosa "Trinder" (Sigma).

De particular interés es la capacidad de los ácidos de los inhibidores iminoazúcar de la glucosidasa tales como DAB (1,4-didesoxi-1,4-imino-D-arabinitol) y DNJ (1-desoxinojirimicina) para inhibir la hexosaminidasa de mamífero que los compuestos originales no. Se ha demostrado que los niveles elevados de esta actividad enzimática se producen en la orina de pacientes diabéticos (Yamanouchi et al. (1998) *Diabetes care* 21: 619-624), pero puede ser que la inhibición de la actividad enzimática ayude a controlar los trastornos metabólicos vistos en diabéticos. La inhibición de las alfa-glucosidasas se reduce también mediante la adición del sustituyente ácido a los iminoazúcares (DMDP, DAB y DNJ).

Ensayo	N-etanoico-DMDP S2	N-propanoico-DNJ T1	N-butil-2-butiléster de G2 T2	N-hidroxietil-G2 T3	N-etanoico-DAB T4	N-etanoico-DNJ G6
α -D-glucosidasa (levadura)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
α -D-glucosidasa (<i>Bacillus</i>)	92.7 51.7uM	NI	NI	NI	NI	NI
α -D-glucosidasa (arroz)	NI	99.1	NI	67.2	NI	99.7

		2.4uM		259uM		1.0uM
β -D-glucosidasa (almendra)	55	NI	NI	NI	NI	NI
α -D-galactosidasa. Grano de café verde	NI	NI	NI	NI	NI	NI
β -D-galactosidasa. Hígado de bovino	60	NI	NI	NI	NI	NI
α -L-flucosidasa. Riñón de bovino	NI	NI	NI	NI	NI	NI
α -D-manosidasa. Judía sable	NI	NI	NI	NI	NI	NI
β -D-manosidasa <i>Cellulomonas fimi</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Naringinasa <i>Penicillium decumbens</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (riñón de bovino)	NI	86.1 32.2uM	NI	82.0 12.2uM	81.9 39.6uM	83.6 10.4uM
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (judía sable)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (<i>A. oryzae</i>)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Amilglucosidasa <i>Aspergillus niger</i>	NI	53	NI	NI	NI	NI
β -Glucuronidasa. Hígado de bovino	507uM	50uM	280uM	60uM	160uM	80uM
% de inhibición con los compuestos ensayados a 0.8 mM. NI = menos de 50% de inhibición en la concentración superior Cursiva = IC ₅₀ (la concentración del compuesto que da 50% de inhibición de la enzima)						

De particular interés fue la capacidad de los ácidos iminoazúcar para inhibir la β -Glucuronidasa. El ensayo implicó el uso de β -glucuronidasa de hígado bovino utilizando p-nitrofenilo β -D-glucurónido comprado a Sigma. La enzima se ensayó a 27°C en solución reguladora de fosfato de hidrógeno disódico 0.2 M/ácido cítrico 0.1 M a pH 5.0. La mezcla de incubación consistió en 10 μ L de 3000 unidades/mL de solución de enzima, 10 μ L de solución acuosa de inhibidor de 1 mg/mL y 50 μ L de para-nitrofenilo β -D-glucurónido 5 mM preparado en solución reguladora a pH 5.0. Las reacciones se detuvieron adicionando 70 μ L de glicina 0.4 M (pH 10.4) durante la fase exponencial de la reacción, que se determinó al principio utilizando ensayos sin inhibición en los que el agua sustituía al inhibidor. Las absorbancias finales se leyeron a 405 nm utilizando un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices). Los ensayos se realizaron por triplicado, y los valores dados fueron medias de las tres repeticiones por ensayo. Los resultados se expresan anteriormente como valores de IC₅₀ (la concentración del compuesto que da una inhibición del 50% de la actividad enzimática. Los controles contenían agua en lugar del inhibidor.



Ejemplo 6: Inhibición de enzimas glucosidasas por el compuesto de fórmula (G2)

El DNJ es un potente inhibidor de un intervalo amplio de α -glucosidasas e inhibe las glucosidasas digestivas con valores de K_i en el intervalo bajo o sub- μ M (Watson et al., 2001). Los fármacos antidiabéticos (Glyset and Miglitol) se derivaron de DNJ por Bayer y estos funcionan reduciendo la captación de glucosa en la sangre, pero también tienen efectos secundarios tales como alteración del tracto digestivo. En contraste, G2 es un inhibidor muy débil de α -glucosidasas que sólo alcanza 50% de inhibición a una concentración casi mM y por tanto es poco probable que funcione de la misma manera. G2 también se ha descrito como un inhibidor débil de glucuronidasa e iduronidasa (Booth et al. (2007) Acta Crystallographica Section E63, o3783-o3784 y referencias en el mismo). No está claro si la inhibición de estas enzimas podría estar implicada en el control del peso o el control del síndrome metabólico. Se ha demostrado que la fagomina de iminoazúcar potencia la liberación de insulina, pero el mecanismo es desconocido y podría ser vía inhibición de glucosidasa (Taniguchi et al. (1998) Horm. Metab. Res. 30: 679-683). Aunque existe interés en compuestos tales como DNJ y fagomina como agentes antidiabéticos potenciales, bien puede ser que la inhibición de la glucosidasa no sea de hecho importante para parte de la actividad antidiabética *in vivo* de estos iminoazúcares; la formación de pequeñas cantidades de los ácidos *in vivo* puede dar como resultado compuestos que muestran inhibición de glucuronidasa. Sin pretender estar limitado por ninguna teoría, la inhibición de la actividad de glucuronidasa elevada en el síndrome metabólico puede ayudar a la eliminación de toxinas y mejorar la regulación del metabolismo en general y específicamente la función y el crecimiento de las células beta.

Ensayo	DNJ	Compuesto de fórmula (G2)
α -D-glucosidasa (levadura)	36	NI
α -D-glucosidasa (<i>Bacillus</i>)	100 2uM	49
α -D-glucosidasa (arroz)	100 0.9uM	55
β -D-glucosidasa (almendra)	NI	NI
α -D-galactosidasa. Grano de café verde	NI	NI
β -D-galactosidasa. Hígado de bovino	NI	NI
α -L-flucosidasa. Riñón de bovino	NI	NI
α -D-manosidasa. Judía sable	26	29
β -D-manosidasa <i>Cellulomonas fimi</i>	NI	NI

Naringinasa <i>Penicillium decumbens</i>	20	NI
N-acetil-β-D-glucosaminidasa (riñón de bovino)	NI	NI
N-acetil-β-D-glucosaminidasa (judía sable)	NI	10
N-acetil-β-D-glucosaminidasa (<i>A. oryzae</i>)	NI	NI
Amilglucosidasa <i>Aspergillus niger</i>	32	NI
β-Glucuronidasa. Hígado de bovino	NI	90 107uM
% de inhibición de los compuestos probados a 0.8 mM Cursiva = IC ₅₀ NI = sin inhibición		

Ejemplo 7: Aumento de los niveles en plasma de insulina *in vivo* mediante el compuesto de fórmula (G2)

El estudio comenzó con 42 ratones ob/ob machos de 10 semanas. Los ratones fueron alimentados con una dieta de comida normal durante todo el estudio. Después de una semana de aclimatación, los ratones fueron emparejados basándose en el peso corporal, glucosa e insulina en plasma (después de 4 h de ayuno) y divididos en 3 grupos de 10 animales (t=0 días). Durante los siguientes 6 días, los ratones recibieron vehículo (grupo de control 1) o 5 mg/kg/día (grupo 2) o 50 mg/kg/día (grupo 3) del compuesto de fórmula (G2) (compuesto de prueba) alrededor de 12.00 h por alimentación forzada (5 mL/kg de ratón). En el séptimo día, los ratones se sometieron a ayuno a las 8.00 h y recibieron la última alimentación forzada (vehículo para el grupo 1 o 5 mg/kg/día, compuesto de prueba para el grupo 2 o 50 mg/kg/día del compuesto de prueba para el grupo 3) a las 12.00 h. A las 13.00 h los ratones recibieron posteriormente un bolo de glucosa (2 g/kg de ratón, 5 mL/kg de ratón) por alimentación forzada como inicio de la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). La medición de la glucosa en sangre y la recolección en plasma fue de t=0 (justo antes de la alimentación forzada de glucosa) y en t = 5, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos después del bolo de glucosa. Después de la OGTT, los ratones se sacrificaron con CO₂ y se recogió sangre adicional en tubos revestidos con heparina mediante punción cardíaca (se obtuvo >100 µL de plasma) y se analizaron las muestras de plasma de heparina.

El día 0, los ratones se asignaron al azar en peso corporal y 4 h de ayuno de glucosa en plasma y niveles de insulina (tabla 3.1.a). Se excluyeron 12 de los 42 ratones, para crear grupos más homogéneos con respecto al peso corporal, la glucosa en plasma y la insulina.

Ambos el peso corporal (figura 3.2.1) y la ingesta de alimentos (figura 3.2.2) no se modificaron significativamente tras el tratamiento con 5 mg/kg/día o 50 mg/kg/día de G2, en comparación con el grupo control (vehículo).

Cuando se comparó con el grupo de control, los niveles de insulina en plasma a 0 min (justo antes de la carga oral de glucosa) parecieron reducirse un poco en ambos grupos de tratamiento de compuesto de prueba, aunque esta reducción no fue significativa. No se observaron cambios significativos entre 3 grupos a los 15, 30, 45 y 60 min. Dos horas después del bolo de glucosa, las concentraciones plasmáticas de insulina aumentaron significativamente en los grupos tratados con el compuesto de prueba de 5 mg/kg y 50 mg/kg cuando se compararon con el grupo de control.

Los datos mostraron que los niveles de insulina en plasma aumentaron significativamente en ambos grupos de tratamiento del compuesto de prueba 120 minutos después del bolo oral de glucosa, posiblemente como resultado de una función mejorada de las células β pancreáticas.

Ejemplo 8: Propiedades del compuesto de fórmula (G2)

Propiedades químicas

El compuesto de fórmula (G2) es un ISA de peso molecular 177. Es libremente soluble en agua. El compuesto es estable en todas las condiciones normales de almacenamiento en el laboratorio.

Datos de ocurrencia y exposición

El compuesto de fórmula (G2) es un producto natural que se produce en extractos polares de una gama de plantas que se conocen en ayurveda y en la farmacopea vegetal europea. Los presentes inventores han detectado el compuesto a concentraciones de aprox. 0.2 mg/mL en varios productos medicinales a base de plantas utilizados en el tratamiento de

la obesidad y la diabetes en humanos. Tales productos se consideran generalmente seguros y, a dosis típicas, la exposición al compuesto de fórmula (G2) de su consumo es de aproximadamente 1 mg/día.

Los efectos antidiabéticos y antiobesidad de una formulación herbaria han sido verificados en un modelo animal experimental, en donde las ratas Wistar hiperlipidémicas recibieron ya sea una dosis única equivalente a 0.6 mg de fórmula de compuesto (G2)/Kg o 10 dosis diarias de hasta 0.4 mg/Kg. No se informó toxicidad y los resultados indicaron la capacidad de la formulación de hierbas de reducir la ganancia de peso corporal y concentraciones más bajas de triglicéridos plasmáticos y de glucosa en sangre en ayunas y después de la comida en animales en una dieta de alta energía. En otros estudios, los extractos de hierbas se han administrado diariamente a ratas a dosis estimadas equivalentes a 5-50 mg/Kg durante hasta 52 semanas sin efecto tóxico observable.

10 Cribado de toxicología pronosticado

El compuesto de fórmula (G2) se sometió a un control de toxicidad utilizando un ensayo de toxicidad aguda validado. Los huevos fertilizados se obtuvieron a partir de pares reproductores de pez cebra Tuebingen (Tu) adulto y se dispusieron en la etapa de desarrollo de células 2-4 en placas de cultivo de 24 pozos que contenían una solución fresca de Danieau 0.3X. Las placas se incubaron a 28.5°C en un entorno controlado de humedad antes de la evaluación. Las concentraciones stock del compuesto se produjeron por dilución en serie en DMSO al 100% (concentración final expuesta a larvas, 0.5%). El cribado se realizó a siete dosis (1, 5, 25, 50, 100, 200 y 500 mM) junto con controles internos de VASTox y vehículo. La dosificación del compuesto tuvo lugar a las 72 h después de la fertilización (hpf, momento en el cual se completó la embriogénesis) con evaluación visual de letalidad y morfología macroscópica a 96 hpf (incubación 24h). 14 larvas fueron expuestas a cada dosis del compuesto dando un total de 84 larvas evaluadas (excluidos los controles). A 96 hpf, las larvas fueron observadas y examinadas utilizando un estereomicroscopio de disección para la presencia o ausencia de: (1) latido del corazón; (2) circulación; (3) necrosis; y (4) motilidad (respuesta al tacto). Si se cumplían los cuatro criterios, una larva se clasificaría como muerta. El compuesto se cribó ciego.

Los resultados obtenidos en concentraciones de 1 mM, 5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM mostraron que el compuesto de fórmula (G2) no causaba toxicidad aguda a las larvas de pez cebra cuando se expusieron a través de una dosis acuosa.

Ejemplo 9: Proceso de control de calidad

Se adicionan 10 g de aditivo alimenticio de hierbas secas en un matraz cónico de 250 mL, luego se adiciona suficiente etanol/agua al 50% para sumergir el material vegetal, dejando un solvente adicional de 2 cm en la parte superior. Esto se deja durante 15 horas o durante la noche para extraer. El extracto se filtra utilizando un embudo Buchner. Los componentes menos polares se pueden extraer para el análisis por HPLC, por ejemplo. El material vegetal ya sea se descarta o se mantiene para extracción secuencial con diclorometano (DCM). Preferiblemente se utiliza material fresco para la etapa de DCM, pero si está disponible insuficientemente, se puede llevar a cabo una extracción secuencial o se podría usar para caracterizar más los componentes). La resina HP20 se puede usar para limpiar los extractos para hacerlos más apropiados para el análisis HPLC.

Se prepara resina Dowex 50 (malla 50-100) (o equivalente tal como Amberlite IR120) adicionando exceso de HCl 2 M y remojando durante un mínimo de 15 minutos. Después se lava la resina con agua desionizada en exceso a pH 7. La resina preparada se vierte en columnas de 10 x1 cm y se unen los depósitos. Las columnas se lavan con 25 mL de etanol acuoso al 50% para equilibrar la resina con el mismo solvente que se usó para preparar las muestras de plantas. Para cada columna, el depósito se llena con el extracto que se deja pasar lentamente a través de la resina.

Se controla el pH del eluyente que debe estar alrededor de 1 o 2. Si se eleva a 6 o 7, entonces la resina se agota. Si esto sucede, se adiciona un poco más de resina a la parte superior de la columna y, si es necesario, se aplica de nuevo la muestra completa a la columna para asegurar la unión de todos los componentes iónicos. Después de que toda la muestra se ha aplicado a la columna, se lava con 75 mL de etanol acuoso al 50% seguido de 75 mL de agua. Estos lavados se descartan normalmente para el análisis ISA, pero se pueden analizar para determinar los componentes no retenidos tales como flavonoides y azúcares. El agua se usa para eliminar el alcohol y otros componentes no retenidos antes de eluir los constituyentes unidos.

La columna se eluye con 100 mL de hidróxido de amonio 2M y éste se recoge en un matraz de fondo redondo de 250 mL. Esto se evapora a 3-5 mL en un evaporador rotatorio a menos de 40°C y se transfiere a un vial pesado de 7 mL. El secado se completa soplando con nitrógeno y/o liofilización. Se tiene cuidado de secar las muestras el mismo día y no dejarlas reposar en la solución de amoníaco más de lo necesario (por lo general menos de 15 minutos), ya que de otra manera la degradación del compuesto podría ocurrir. Se colocan 1-3 mg de cada muestra seca en viales de GC y se liofilizan de nuevo antes de la derivación para análisis.

Observaciones

(a) Resina HP-20

5 Diaion HP-20 (fabricado por Sumitomo Ltd) es una resina polimérica de estireno-divinilbenceno. Es hidrofóbica y adsorbe compuestos lipófilos y ácidos débiles. Los adsorbentes sintéticos series HP y SP son polímeros reticulados tridimensionales insolubles con macroporos. No poseen intercambio iónico u otros grupos funcionales, sin embargo, tienen una gran superficie y son capaces de absorber una variedad de sustancias orgánicas por medio de las fuerzas de van der Waals. La matriz polimérica se puede clasificar como tipo aromático (estireno-divinilbenceno) o acrílico (metacrílico).

Una vez adsorbidos los compuestos, se pueden eliminar por lavado de la resina mediante la aplicación de un solvente apropiado. HP-20 se utiliza de la siguiente manera para eliminar cantidades excesivas de grasas y clorofila a partir de los extractos de diclorometano (DCM) de las plantas.

10 El extracto solubilizado se seca bajo vacío sobre la resina. La resina se eluye con metanol que contiene cantidades crecientes de acetona (hasta 30% de acetona). Esto es suficiente para eliminar todos los compuestos de interés mientras deja grasas y clorofilas adsorbidas sobre la resina HP-20. La resina HP-20 se limpia para su reutilización lavando con acetona y hexano. Esto elimina todos los compuestos no deseados y la resina se puede usar una vez más después de un lavado final con metanol.

15 (b) Cromatografía de intercambio iónico

Las muestras se procesan inicialmente por extracción utilizando alcohol acuoso al 50%, que separa los constituyentes polares de los componentes más no polares de cada planta y desnaturaliza cualquier proteína que pueda estar presente en el extracto. Los extractos se procesan a continuación mediante cromatografía de intercambio iónico que separa y concentra los compuestos iónicos en cada extracto (predominantemente alcaloides, aminoácidos y aminas pequeñas) de los compuestos no iónicos que también estarían presentes en los extractos (principalmente azúcares, grasas y más de los compuestos fenólicos). Las muestras se analizan a continuación en ensayos enzimáticos, por GC-MS o HPLC.

25 Los extractos filtrados se cargan en resina Dowex 50W-X8, que es una resina de poliestireno reticulada con divinilbenceno. Es un intercambiador catiónico fuertemente ácido que se pueden utilizar tanto en la forma de ácido libre como en la forma de hidrógeno (H^+) o en la forma de sal, por ejemplo, sal de amonio (NH_4^+). Ambas formas de la resina adsorben los cationes de la solución y liberan un número equivalente de contraiones en la solución (iones H^+ o NH_4^+ , dependiendo de la forma de la resina utilizada). En la forma H^+ , la resina Dowex 50W-X8 adsorbe todos los compuestos iónicos de la solución (excepto los ácidos muy fuertes), independientemente de su carga, y esta es la forma preferida.

30 En la adsorción de cationes del extracto, los protones se desplazan de la resina haciendo que el pH del eluido caiga de pH 6.0 (el pH del agua destilada utilizada para enjuagar la resina antes de su uso) a aproximadamente pH 2.0, dependiendo de la concentración de la muestra. Cuanto más diluida es la muestra, menor es la caída del pH. Sin embargo, una vez que se ha alcanzado la capacidad de resina, la carga continua de la muestra hace que el pH aumente hasta el del propio extracto en bruto.

35 La resina Dowex 50W-X8 (tamaño de malla 50-100) se prepara para su uso mediante lavado con HCl 2M para asegurar la conversión completa a la forma H^+ . El exceso de ácido se elimina por lavado extensivo con agua destilada. Después de que el extracto crudo se haya cargado sobre la resina, la columna se lava con agua destilada para eliminar cualquier material no unido hasta que el pH del eluato ascienda al de la propia agua. Los compuestos unidos se eluyen con una solución 2M de hidróxido de amonio ($NH_4^+OH^-$). La columna se lava hasta pH 6.0 con agua y el amoníaco se separa de la muestra por evaporación a presión reducida a 40°C, utilizando un evaporador rotatorio.

40 Los ISA de la invención se pueden purificar adicionalmente uniéndolas a una resina de intercambio aniónico tal como Amberlite CG400 en forma de hidróxido. Los ISA se pueden desplazar con ácidos tales como ácido acético 1M y secarse. La resina se prepara para su uso mediante remojo durante 1 hora en NaOH 1M antes de lavar con agua a pH 8.

(c) Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

45 La cromatografía de gas-líquido es un proceso mediante el cual una mezcla compleja de sustancias volátiles se separa en sus constituyentes dividiendo la muestra entre un gas inerte a presión y una capa delgada de un líquido no volátil revestido sobre un soporte inerte dentro de una columna calentada. Con el fin de conseguir una buena separación de compuestos específicos en una mezcla, es crucial utilizar una columna con las características correctas. La naturaleza del soporte sólido, el tipo y la cantidad de fase líquida, el método de empaquetado, la longitud total y la temperatura de la columna son factores importantes. Preferiblemente se utilizan columnas capilares recubiertas con una fase líquida no polar (25m x 0.22mm id x fase estacionaria BPX5 de 0.25µm, producida por SGE Ltd.) o equivalentes de las mismas.

55 Muchos compuestos no son apropiados para la inyección directa en un cromatógrafo de gases debido a su alta polaridad, baja volatilidad o inestabilidad térmica. Los compuestos que son altamente hidroxilados son difíciles de vaporizar debido a la unión intermolecular de hidrógeno. Sin embargo, reemplazando los hidrógenos de hidroxilo con otros grupos químicos, se pueden hacer suficientemente volátiles para el análisis de GC. Los dos medios más populares de derivación de los grupos hidroxilo son acetilación y sililación, donde se forman acetilatos [$CH_3CO-O-R$] o éteres de

5 sililo, por ejemplo, éteres de trimetilsililo (TMS) $[(CH_3)_3Si-O-R]$. Se prefiere la sililación de muestras antes del análisis utilizando Sigma Sil A (una mezcla de trimetilclorosilano, hexametildisilazano y piridina 1:3:9) producida por la Sigma Chemical Company. Una alternativa es Pierce Tri-Sil. La derivación se consigue mediante la adición de 100 μ L del reactivo de trimetilsililación a cada mg de material secado en un vial sellado (el reactivo se degrada en presencia de agua) y la reacción se completa calentando las muestras a 60°C durante 15 minutos.

Los éteres trimetilsilílicos en cada muestra derivada se separan en la columna utilizando un programa de temperatura. Se utiliza un programa de temperatura, ya que permite la separación rápida de compuestos de un intervalo de ebullición muy amplio.

10 En la espectrometría de masas por impacto de electrones, el efluente del cromatógrafo de gases, que contiene los compuestos separados y vaporizados, se hace pasar en la cámara de iones del espectrómetro de masas que está bajo un alto vacío. Las moléculas son bombardeadas por un haz de electrones acelerado desde un filamento que ioniza y los fragmenta. Inicialmente, se elimina un electrón de cada molécula para formar un ion molecular cargado positivamente (M^+ , esto es, un catión radical). La ruptura de los enlaces en relación con la resistencia de unión se produce rápidamente en el ion molecular para generar iones fragmentos. La manera en que las moléculas se fragmentan es altamente característica y se puede utilizar como forma de la identificación de la "huella digital". Los diversos iones se aceleran en la parte del analizador del espectrómetro de masas donde se clasifican de acuerdo con sus relaciones masa/carga (valores m/z) que son equivalentes a los pesos moleculares de los fragmentos. La señal iónica se amplifica mediante un multiplicador de electrones y el espectro de masas se representa desde baja hasta alta masa. Los valores m/z se representan contra la abundancia relativa de los iones para dar la "huella digital" visual.

20 (d) HPLC-PDA/MS/ELS (detección evaporativa de dispersión de la luz)

Con esta técnica, las muestras se disuelven en un solvente apropiado y se separan en una columna utilizando una mezcla de solventes que se bombea bajo presión a través de la columna. Se utilizan tres detectores; un espectrómetro de masas, como se describió anteriormente, y un sistema de arreglo de fotodiodos que mide si los compuestos absorben luz en longitudes de onda tanto en los rangos UV como en los visibles y un detector de dispersión de luz (ELS). El ELS es particularmente apropiado para detectar los ácidos de iminoazúcar e iminoazúcares que por lo general carecen de un cromóforo.

30 Se utilizó un sistema Waters Integrity™ HPLC-PDA/MS equipado con una columna de HPLC C_8 de fase inversa (50 mm x 2.1 mm id x 3.5 μ m, Waters) para analizar los compuestos no polares extraídos mediante DCM y limpiados utilizando resina HP20. La velocidad de flujo de solvente a través de la columna fue de 0.35 mL/min y se utilizó un gradiente lineal comenzando con 90% de agua y 10% de acetonitrilo (conteniendo 0.01% de ácido trifluoroacético), aumentando hasta 100% de acetonitrilo durante 6 minutos y manteniéndose durante 6.5 minutos adicionales.

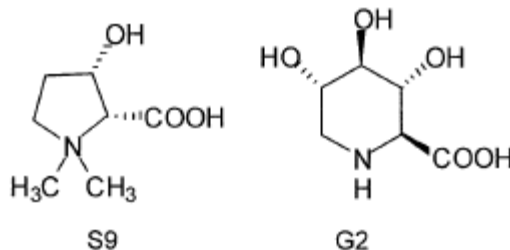
35 Se recogieron datos de absorbancia (arreglo de fotodiodos-PDA) de 200-600 nm y datos espectrales de masa recogidos entre 71 y 600 m/z . Los ácidos iminoazúcar no están bien resueltos o detectados por tales sistemas de HPLC, pero muchos otros grupos de fitoquímicos son que pueden coocurrir con ácidos iminoazúcar en preparaciones de hierbas. La detección ELS permite observar los iminoazúcares y los ácidos iminoazúcar. Sin embargo, están disponibles otras formas de HPLC que son más adecuadas para la detección de carbohidratos e iminoazúcares y ácidos iminoazúcar; ejemplos son los sistemas HPLC de hidratos de carbono Dionex y HILIC (cromatografía de interacción hidrófila) acoplados, por ejemplo, a detectores electroquímicos, espectrómetros de masas o detectores ELS.

40 Un ejemplo de un sistema HILIC apropiado para iminoazúcares y ácidos iminoazúcar es un HPLC equipado con una columna HPLC SeQuant (empaquete ZIC-HILIC, 150x4.6 mm, tamaño de partícula de 3.5 μ m, tamaño de poro 200Å) con una fase móvil de 40:55:5 de agua:acetonitrilo:acetato de amonio 100 mM pH 5.7 y una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La detección utilizando un Polymer Laboratories PL-ELS 1000 (detector de dispersión de luz) dio una buena resolución de iminoazúcares y ácidos iminoazúcar.

45 Tabla que muestra ejemplos de separación de aminoácidos, iminoazúcares y ácidos de iminoazúcares utilizando un sistema de HPLC HILIC

Nombre del compuesto	Tiempo de retención en minutos
Ácido aspártico	3.53
Adenina	4.00
Fenilalanina	4.20
Tirosina	4.72

Valina	4.88
Ácido iminoazúcar S9	4.97
Prolina	5.20
Ácido iminoazúcar G2	5.27
Alanina	5.37
Asparagina	5.59
6-epi-castanospermina	6.49
Castanospermina	6.55
DNJ	11.23
Casuarina	11.61
Swainsonina	14.33
DMDP	14.64
3,7-diepicasuarina	14.81
Australina	16.26
DAB	17.19



Un sistema de HPLC Dionex utilizado para separar y detectar iminoazúcares y ácidos iminoazúcar consistía en una columna Dionex ION PAC CS10 de 4x250 mm con una columna de protección ION PAC CG10 de 4x50 mm y una fase móvil de ácido metano sulfónico diluido a 80 mM y agua. La bomba era una Dionex P680, para proporcionar el eluyente A (MSA 80 mM) y el eluyente B (AGUA, ultrapura) según se requiera, a una velocidad de flujo total de 1 mL/min. El inyector era un inyector manual Rheodyne y el horno, un Dionex LC30, se usó para mantener la columna y el protector a 30°C. Se utilizó un controlador neumático (Dionex PC10, (gas He, ~1.5 mL/min de NaOH a 60 psi) para adicionar NaOH 300 mM al flujo de eluyente entre la columna y el detector. El detector era un detector electroquímico Dionex ED40 y los datos se analizaron utilizando software Dionex Chromeleon.

Ejemplo 10: Falta de inhibición de glucosidasas digestivas por el compuesto G2

La desoxinojirimicina (DNJ), el N-butil-DNJ (Zavesca®) y el derivado *N*-hidroximetilo (Miglitol, Glyset®) desarrollado por Bayer para el tratamiento de la Diabetes tipo 2 son potentes inhibidores de las glucosidasas (véase Watson et al., 2001, *Phytochemistry* 56: 265-295). La inhibición de las glucosidasas es responsable tanto de la alteración gastrointestinal (efectos secundarios de los fármacos) como de los beneficios para los pacientes diabéticos que toman Glyset® que actúa a través de la disminución de la liberación y captación de glucosa en el tracto GI, controlando de este modo los niveles de glucosa en sangre después de la comida. Los ácidos iminoazúcar de la invención tales como G2 tienen la ventaja de poder controlar los niveles de glucosa en sangre a través de un mecanismo que no implica inhibición de glucosidasas digestivas y, por lo tanto, evita los efectos secundarios de DNJ y fármacos derivados del mismo.

Efecto inhibidor de G2 y DNJ sobre glucosidasas intestinales de rata

Valor IC ₅₀ µM		
	G2	DNJ*
Maltasa	LI	0.36
Isomaltasa	NI	0.3
Sucrasa	NI	0.21
Cellobiasa	NI	ND
Lactasa	NI	ND
Trehalasa	NI	ND
ND = no determinado; * de Yasuda et al., 2002, J. Nat. Prod. 65, 198-202. LI = inhibición que no alcanza el 50% a 1 mM; NI = no inhibición a 1 mM Las actividades enzimáticas se prepararon a partir de membranas del borde en cepillo de intestino delgado de rata utilizando disacáridos como sustratos como se describe por Yasuda et al. 2002.		

También se ha descrito que la acarbosa, otro inhibidor de la glucosidasa usado para la diabetes tipo 2 que reduce la liberación y captación de glucosa, es un potente inhibidor de la maltasa del intestino delgado de rata (IC₅₀ 0.16 µM) y sacarasa (IC₅₀ 2.9 µM) (Kato et al., 2008, J. Agric. Food Chem. 56, 8206-8211).

- 5 También se ha hecho una comparación de la actividad sobre disacaridasas digestivas de conejo de compuestos de la invención G2, S2, T1 y T2 y DNJ y Zavesca. Los resultados de esta comparación se muestran en la siguiente tabla. G2, S2 y T2 no mostraron ninguna inhibición de las disacaridasas a 0.8 mM mientras que T1 mostraron una inhibición muy débil de la maltasa y la sacarasa en comparación con DNJ y Zavesca. La inhibición de isomaltasa no se determinó para S2 y T1.

- 10 Efecto inhibidor de compuestos de la invención y DNJ y Zavesca sobre glucosidasas intestinales de conejo

	sacarosa	maltasa	isomaltasa
	IC ₅₀ (uM)	IC ₅₀ (uM)	IC ₅₀ (uM)
Zavesca	0.22	0.97	0.19
DNJ	0.09	0.18	0.02
G2	NI	NI	NI
S2	NI	NI	ND
T1	6.1	19	ND
T2	NI	NI	NI

Método de ensayo de inhibición de disacaridasa de conejo

- 15 Se hicieron sustratos de sacarosa (8.3 mM), maltosa (5 mM) e isomaltosa (6,3 mM) utilizando solución reguladora Maclvaine (citrato-fosfato) 0.2M, pH 6.0. El reactivo de detección de glucosa se preparó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Megazyme Ltd). La linealidad de la evolución de la reacción entre el reactivo de detección de glucosa y la glucosa se probó utilizando una serie de diluciones de glucosa.

Preparación de disacaridasa de mamífero

El método para la preparación de disacaridasas mucosas de intestino delgado de mamífero se basó en Griffiths (1998), omitiendo etapas de fraccionamiento de sulfato de amonio. El intestino delgado se disecó de una hembra de conejo

silvestre, y se abrió longitudinalmente con un bisturí. La capa mucosa se raspó utilizando el borde de una lámina de microscopio limpia y se colocó en 3 mL de dH₂O. La suspensión de la capa mucosa se centrifugó a aproximadamente 1000 rpm durante 30 segundos para sedimentar restos de tejido. Se eliminó el sobrenadante (6 mL) y se centrifugó de nuevo a 3500 rcf durante 1 minuto para separar las partículas finas de la suspensión. El sobrenadante se diluyó para dar 0.2-0.25 mg/mL de proteína y se almacenó a -30°C.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo utilizando 5-15 µL de preparación enzimática, 5 µL de compuesto de prueba (o dH₂O para los controles) y 15-25 µL de solución de sustrato. Las reacciones se cubrieron utilizando una lámina de película selladora de placa, y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. La glucosa (a partir de la hidrólisis de disacárido) se cuantificó adicionando 200 µL de reactivo de detección de glucosa e incubando las reacciones durante otros veinticinco minutos. La absorbancia se midió a 510 nm frente a blancos de control.

De esta manera se pudo determinar la inhibición enzimática de la sucrosa, maltasa e isomaltasa de la mucosa del intestino delgado de mamífero.

Ejemplo 11: Correlación de la presencia de ácidos iminoazúcar en plantas reivindicada por tener actividad antidiabética

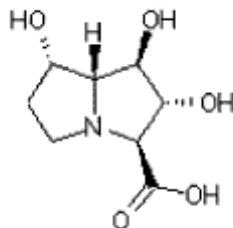
Los ácidos iminoazúcar son raros en plantas, pero también se han identificado en especies de *Lotus* (Fabaceae), Pumpkin (especies de Cucurbita), *Aspalanthus linearis* (Rooibos), especies de *Alexa* y *Castanospermum australe* (Fabaceae), especies *Eugenia* y *Syzygium* (Myrtaceae), *Lycium barbarum* (Goji, Solanaceae) y *Andrographis paniculata* (Acanthaceae). *Gymnema sylvestre* es una planta reivindicada por tener actividad antidiabética o antiobesidad y tiene evidencia clínica de actividad (por ejemplo, véase Baskaran et al., 1990, Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Ethnopharmacol. 30:295-300 y Shanmugasundaram et al., 1990, Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus J Ethnopharmacol. 30:281-94). Los presentes inventores han descubierto ahora que las hojas, semillas y tallos de *Gymnema sylvestre* contienen el ácido iminoazúcar G2. Los productos comercializados para la pérdida de peso, como las cápsulas Floressance "Citrus, Garcinia, *Gymnema* concentrate" también contienen G2 (2.4 mg por cápsula en el Lote 8205CC). La presencia de G2 u otros ácidos iminoazúcar en *Gymnema* no ha sido reportada por otros investigadores. Hasta la fecha la investigación publicada se ha concentrado en otros componentes de *Gymnema* que afectan el sabor dulce, como los ácidos gimnémicos, que a diferencia de G2 no se muestra que sean disponibles por vía oral.

También hemos descubierto que la planta Gurana (también llamada Guarana) *Paullinia cupana* contiene una forma de N-metil-3-desoxi de G2 también reportada como glabrina de *Pongamia glabra* (esta estructura no tenía estereoquímica informada). Gurana tiene reivindicaciones de pérdida de peso, por ejemplo, véase Anderson T and Foght J, 2001, Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. J. Hum. Nutr. Diet 14, 243. Aunque es bien conocido que Gurana contiene la cafeína que se reivindica para dar una cierta protección contra el desarrollo de la diabetes tipo 2, los ácidos del iminoazúcar relacionados con el compuesto G2 son componentes claves de Gurana con actividad antidiabética y antiobesidad. La pongamia es tóxica por vía oral debido a otros componentes.

Los presentes inventores también han aislado ácidos iminoazúcar de la estructura de pirrolidina de otras especies de plantas reivindicada por tener actividad antidiabética tales como naranja amarga que contiene varias estaquidrininas como ejemplos mostrados a continuación.



Los presentes inventores también han aislado recientemente de Citrus un compuesto identificado como un ácido de un alcaloide de pirrolizidina y relacionado con epialexaflorina (véase Watson et al., 2001) que se muestra a continuación. También contiene compuestos que son derivados de N y O-butilo de derivados G2 y derivados de O-butil-N-ácido de compuestos de tipo desoxinojirimicina (por ejemplo, T3) probados por semisíntesis y análisis GC-MS de los compuestos y los extractos de Citrus como derivados de trimetilsililo.

**epialexaflorina**

Se reivindica que la calabaza china (o Siam Pumpkin) aumenta las células beta en ratas diabéticas, Xia, T., 2007, Journal of Science and Food and Agriculture 87, 1753-1757. Los presentes inventores han demostrado que los compuestos de ácido iminoazúcar de cadena abierta (por ejemplo, el ejemplo P3) están presentes en semillas y fruto de la calabaza europea (*Cucurbita pepo*). Varias especies de Cucurbitaceae tienen reivindicaciones de actividad antidiabética, incluyendo melón amargo (*Momordica charantia*) que muestra varios ácidos iminoazúcar potenciales en la fracción unida a CG400 OH analizada por GC-MS y por actividad característica en ensayos de glucuronidasa y hexosaminidasa.

La asociación terapéutica de ácidos imino-azúcares y diabetes o control de peso también se muestra mediante el ejemplo de *Stevia rebaudiana* que ha demostrado controlar los niveles de glucosa en sangre y modular los niveles de insulina. Mientras que el esfuerzo de investigación de otros se ha centrado en esteviosidos y rebaudiosidos y glucósidos relacionados, éstos parecen no tener actividad farmacológica, por ejemplo, véase Barriocanal LA et al., 2008, Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 51:37-41. La planta, sin embargo, ha demostrado actividad anti-glucémica y se usó tradicionalmente para tratar la diabetes en América del Sur, por ejemplo, véase Ferreira EB et al., 2006, Comparative effects of Stevia rebaudiana leaves and stevioside on glycemia and hepatic gluconeogenesis. Planta Med. 72:691. El descubrimiento de ácidos iminoazúcar tales como S2 en *Stevia* sugiere por lo tanto que la eliminación de estos compuestos elimina la actividad antidiabética de *Stevia*.

Ejemplo 12: Medición de las actividades de glucosidasa de ácidos iminoazúcar en plantas reivindicadas por tener actividad antidiabética o antiobesidad

Los ácidos de iminoazúcar pueden mostrar una inhibición distintiva de las actividades de glucuronidasa y/o hexosaminidasa que no se muestran por otros iminoazúcares tales como desoxinojirimicina (DNJ), Miglitol y DAB (1,4-didesoxi-1,4-imino-D-arabinitol); estos compuestos de iminoazúcar parecen presentar una actividad terapéutica potencial en la diabetes o la obesidad a través de la inhibición de glucosidasas y glucógeno fosforilasa, pero por lo tanto también tienen efectos secundarios causados por la inhibición de la actividad disacaridásica digestiva.

El compuesto G2 de la invención tiene una IC_{50} contra la glucuronidasa de mamífero de 107 μM mientras que el derivado de N-hidroxietilo de G2 es más potente contra la glucuronidasa (IC_{50} 60 μM) y la β -N-acetilglucosaminidasa de mamífero (IC_{50} 12.2 μM). DNJ no es inhibidor de la actividad enzimática a 0.8 mM, pero la DNJ N-propionico es inhibidor tanto de la glucuronidasa (IC_{50} 50 μM) como de la hexosaminidasa (IC_{50} 32 μM).

Tabla que muestra la comparación del perfil de inhibición de la glicosidasa de los iminoazúcares DNJ y Miglitol con tres ácidos de iminoazúcar de la invención (inhibición mostrada como % de inhibición a valores de IC_{50} de 0.8 mM en cursiva)

Ensayo	DNJ	Miglitol	G2	S2	T3
α -D-glucosidasa (levadura)	36	NI	NI	NI	NI
α -D-glucosidasa (<i>Bacillus</i>)	100	83	49	<i>51.7 μM</i>	NI
α -D-glucosidasa (arroz)	100	100	55	NI	<i>259 μM</i>
β -D-glucosidasa (almendra)	64	99	NI	55	NI
α -D-galactosidasa. Grano de café verde	NI	19	NI	NI	NI
β -D-galactosidasa. Hígado de bovino	NI	87	NI	60	NI

α -L-flucosidasa. Riñón de bovino	6	-5	NI	NI	NI
α -D-manosidasa. Judía sable	27	7	29	NI	NI
β -D-manosidasa <i>Cellulomonas fimi</i>	-19	NI	NI	NI	NI
Naringinasa <i>Penicillium decumbens</i>	21	26	NI	NI	NI
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (riñón de bovino)	NI	NI	NI	NI	12.2uM
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (judía sable)	NI	NI	10	NI	NI
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (<i>A. oryzae</i>)	NI	NI	NI	NI	NI
Amilglucosidasa <i>Aspergillus niger</i>	32	78	NI	NI	NI
β -Glucuronidasa. Hígado de bovino	NI	NI	107uM	507uM	60uM
Inhibición a valores de IC ₅₀ 0.8 mM en cursiva)					
N.B. La inhibición del 50% o inferior a 0.8 mM indica una inhibición muy débil.					

Se evaluaron varias plantas reivindicadas por tener actividad antidiabética para la capacidad de inhibir la actividad de glucuronidasa o hexosaminidasa de mamífero. Las plantas contienen muchos componentes aromáticos tales como flavonoides y polifenoles que pueden tener actividad de unión a proteínas no específicas o que tienen colores fuertes haciendo imposible el uso de ensayos de glucosidasa colorimétrica estándar. Los extractos acuosos de etanol de las plantas se fraccionaron por lo tanto utilizando una combinación de métodos de intercambio catiónico y aniónico para purificar los componentes de ácido iminoazúcar. Los métodos son familiares a los experimentados en la técnica e implican la unión de los aminoácidos y alcaloides a una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida (por ejemplo, IR120 en la forma H⁺), lavado con agua, desplazamiento de los componentes unidos con solución de amoníaco 2M, concentración bajo concentración presión reducida, para eliminar el amoníaco y luego unir los ácidos iminoazúcar a una resina de intercambio aniónico fuertemente básica (por ejemplo, Amberlite CG400 en la forma OH⁻) y a continuación, de lavar con agua, desplazar los ácidos iminoazúcar con ácido acético 1M. Después de la eliminación del exceso de acetato estas fracciones son adecuadas para ensayos de glicosidasa.

Métodos de ensayo de glicosidasa

Todas las enzimas y sustratos de para-nitrofenilo se adquirieron de Sigma, con la excepción de beta-manosidasa que provenía de Megazyme. Las enzimas se ensayaron a 27°C en soluciones reguladoras de fosfato de hidrógeno disódico 0.2 M/ácido cítrico 0.1 M a el pH óptimo para la enzima. La mezcla de incubación consistió en 10 μ L de solución de enzima, 10 μ L de solución acuosa de extracto a 1 mg/mL y 50 μ L del sustrato de para-nitrofenilo 5 mM apropiado formado en solución reguladora al pH óptimo para la enzima. Las reacciones se detuvieron por adición de 70 μ L de glicina 0.4 M (pH 10.4) durante la fase exponencial de la reacción, que se había determinado al principio utilizando ensayos sin inhibición en los que el agua sustituyó al inhibidor. Las absorbancias finales se leyeron a 405 nm utilizando un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices). Los ensayos se realizaron por triplicado, y los valores dados son medias de las tres repeticiones por ensayo. (Véase Watson, A.A., Nash, R.J., Wormald, M.R., Harvey, D.J., Dealler, S., Lees, E., Asano, N., Kizu, H., Kato, A., Griffiths, R.C., Cairns, A.J. and Fleet, G.W.J. (1997). Glycosidase-inhibiting pyrrolidine alkaloids from Hyacinthoides non-scripta. Phytochemistry 46 (2): 255-259.)

La siguiente tabla da detalles de las enzimas utilizadas y las condiciones de los ensayos individuales.

Enzima	Fuente	Sustrato (5 mM)	pH	Solución sotck de trabajo [enzima] (U/mL)	Condiciones de reacción (min)
α -D-glucosidasa	Saccharomyces cerevisiae	PNP- α -D-glucopiranosido	6.8	0.5	15
α -D-glucosidasa	Bacillus sterothophilus	PNP- α -D-glucopiranosido	6.8	0.25	15
α -D-glucosidasa	Arroz	PNP- α -D-glucopiranosido	4.0	7.5	20
β -D-glucosidasa	Almendra	PNP- β -D-	5.0	0.125	15

		glucopiranosido			
α -D-galactosidasa	Grano de café verde	PNP- α -D-galactopiranosido	6.5	0.2	15
β -D-galactosidasa	Hígado de bovino	PNP- β -D-galactopiranosido	7.3	0.1	15
α -L-flucosidasa	Riñón de bovino	PNP- α -L-fucopiranosido	5.5	0.4	15
α -D-manosidasa	Judía sable	PNP- α -D-manopiranosido	4.5	0.4	10
β -D-manosidasa	<i>Cellulomonas fimi</i>	PNP- β -D-manopiranosido	6.5	1	15
Naringinasa	<i>Penicillium decumbens</i>	PNP- α -L-ramnopiranosido	4.0	0.05	15
N-acetil- β -D-glucosaminidasa	Riñón de bovino	PNP-N-acetil- β -D-glucosaminida	4.25	0.35	15
N-acetil- β -D-glucosaminidasa	Judía sable	PNP-N-acetil- β -D-glucosaminida	5.0	0.25	20
N-acetil- β -D-hexosaminidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	PNP-N-acetil- β -D-glucosaminida	5.0	0.125	15
Amilglucosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	PNP- α -D-glucopiranosido	4.5	20	30@32
β -Glucuronidasa	Hígado de bovino	PNP- β -D-glucurónido	5.0	3000	20

Resultados

Las fracciones unidas a la resina de intercambio aniónico (CG400 OH-) de las plantas *Stevia rebaudiana* y *Gymnema sylvestre* dan completa inhibición de la actividad glucuronidasa a 1.43 mg/mL. Esta inhibición se debe probablemente a la alta concentración de compuesto G2 en *Gymnema* y compuestos tales como S2 en *Stevia*.

Ejemplos de otras plantas estudiadas con reivindicaciones de actividad antidiabética y/o antiobesidad son las frutas Goji (*Lycium barbarum*), *Theobroma cacao* nibs, *Aspalanthus linearis* (té Rooibos), *Hoodia gordonii*, Korean Ginseng (*Panax ginseng*) y soya (*Glycine max*). Estos fueron todos fraccionados en fracciones unidas a CG400 OH- antes de los ensayos. Los resultados en las dos tablas siguientes se expresan como % de inhibición en 1.43 mg/mL, excepto para la cafeína que se hizo funcionar a 143 μ g/mL como compuesto de control para las semillas de cacao.

% de inhibición media mostrada por la fracción ácida de iminoazúcar de los fragmentos de cacao y la cafeína

Enzima	Fuente	Cafeína 143 ug/mL	Fragmentos de cacao DT0181/121/2
N-acetil- β -D-glucosaminidasa	Riñón de bovino	1.3	19.6
β -Glucuronidasa	Hígado de bovino	-2.4	30.5

% de inhibición media mostrada por fracciones ácida de iminoazúcar de plantas que se afirma tener propiedades antidiabéticas o de control de peso

Enzima	Fuente	Comprimidos de Hoodia	Ginseng coreano	Ginseng coreano DT	Goji	Rooibos	Soja
--------	--------	--------------------------	-----------------	-----------------------	------	---------	------

		DT0181/143/1	AM0241/119/2	XCD01			
N-acetil-P-D-glucosaminidasa	Riñón de bovino	73.8	-16.1	7.8	25	5	88
β-Glucuronidasa	Hígado de bovino	41.2	72.9	36	3	27	87

Se puede observar a partir de los resultados obtenidos con las plantas anteriores que muestran cierta inhibición de ya sea glucuronidasa o hexosaminidasa bovina. El análisis GC-MS de las fracciones unidas a CG400 OH- (resina de intercambio aniónico) mostró que los niveles de ácidos iminoazúcar posibles en estas muestras no eran tan altos como en Stevia o Gymnema y había muchos otros componentes importantes tales como aminoácidos proteicos que han diluido los inhibidores en tales mezclas complejas. Sin embargo, las semillas de soja, por ejemplo, muestran una inhibición sorprendentemente fuerte de ambas actividades enzimáticas. Rooibos y bayas de Goji muestran un nivel relativamente bajo de inhibición de las enzimas, pero ambos muestran una actividad. El Ginseng coreano muestra una fuerte inhibición de la actividad glucuronidasa en dos muestras diferentes ensayadas, mientras que Hoodia da inhibición de ambas actividades enzimáticas. Se necesita más trabajo de purificación y aislamiento para caracterizar completamente los componentes en estas fracciones de ácido imino-azúcar que proporcionan las inhibiciones. Una vez purificada, la intensidad de la inhibición debería aumentar considerablemente.

Ejemplo 13: Actividad *in vivo* del incremento del compuesto G2 de los niveles de insulina en ratones ddy

Método

Los ratones ddy de 7 semanas (peso 30-31 g) se dividieron en 4 grupos (grupos 1 a 4). Cada grupo tenía 3-4 ratones. Todos los ratones de ensayo se dejaron en ayuno, durante 16 horas antes de administrarles los compuestos de prueba.

El objetivo de este experimento fue determinar si G2 (codificado en este documento BR1) puede estimular la liberación de insulina.

Grupo 1: Control. Ratones no tratados (sin glucosa y G2).

Grupo 2: Administración oral de glucosa sola.

Grupo 3: Administración oral de G2 solo.

Grupo 4: Administración oral de G2 con glucosa.

Los niveles en suero de insulina se midieron después de 30 minutos (véase la Figura 2).

Resultados

Comparando los grupos 1 (sin tratar) y el grupo 3 (administración oral de G2 solo) está claro que G2 no afectó el nivel de insulina. Sin embargo, la combinación de glucosa y G2 es mucho más efectiva que la glucosa sola. Estos resultados sugieren que G2 no afecta a la liberación de insulina en sí, pero parece mejorar los niveles.

Figura 3. Efectos de G2 (BR1) (100 mg/kg de peso corporal) sobre los niveles en suero de insulina.

Las concentraciones séricas de insulina de ratón macho ddy después de 30 minutos más tarde una carga oral con o sin D-glucosa (2.5 g/kg de peso corporal). Cada valor representa la media $\pm$ SEM (n = 3-4). * P<0.05, **P<0.01.

Ejemplo 14: Actividad *in vivo* del compuesto G2-control de los niveles de glucosa en sangre en ratones ddy

Método

Ratones ddy de 7 semanas (peso 30-31 g) se dividieron en 4 grupos (del grupo 1 a 4). Cada grupo tenía 5 ratones. Todos los ratones de ensayo se dejaron en ayunas durante 16 horas para este experimento.

El objetivo de este experimento era mostrar si G2 (codificado en este documento como BR1) podría suprimir una hiperglucemia después de una comida. De este modo, la maltosa se eligió como azúcar de carga tal como se usó para el inhibidor glucosidasa de Bayer Glucobay. Se puede utilizar ya sea maltosa (2.5 g/kg) o sacarosa (2.5 g/kg) o almidón (1.0 g/kg), pero la maltosa es la más popular.

La hipótesis era que si G2 puede suprimir el nivel de glucosa en sangre puede:

- 1) inhibir la maltasa (inhibir para cambiar de maltosa a glucosa).
- 2) inhibir el transporte de glucosa.
- 3) estimular la liberación de insulina.
- 4) inhibir la glicógeno fosforilasa.
- 5) otra actividad

De este modo, había 4 grupos (véase la figura 4).

Grupo 1: Control. Carga de maltosa sola (sin la condición G2).

Grupo 2: administración oral de G2 con maltosa (mismo tiempo).

10 Grupo 3: inyección intraperitoneal de G2 y administración oral de maltosa (mismo tiempo).

Grupo 4: administración oral de G2 30 minutos antes de la carga de la maltosa. (Glucobay se toma 30 minutos antes de las comidas).

Resultados

Se demostró que G2 puede suprimir la hiperglucemia en cada grupo.

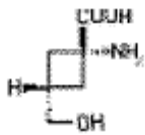
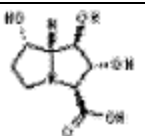
15 La curva del grupo 2 (p.o.) y del grupo 3 (i.p.) es casi la misma. Este resultado es muy importante porque si el mecanismo de inhibición de G2 es "inhibición de la maltasa" y/o "inhibición del transportador de glucosa", la ruta i.p. no inhibiría la hiperglucemia. De este modo, el sitio de acción de G2 no está en el tracto intestinal y tal vez en el páncreas. Además, este resultado mostró que el G2 es absorbido en la sangre muy rápidamente.

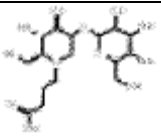
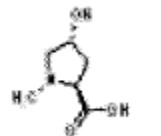
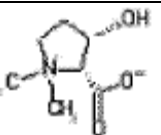
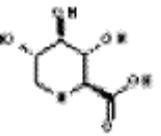
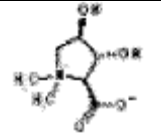
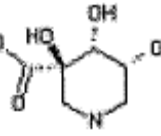
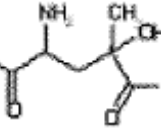
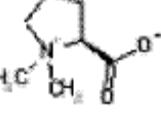
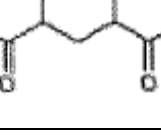
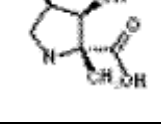
Véase la figura 5 para los efectos de G2 (BR1) sobre los niveles de glucosa en sangre.

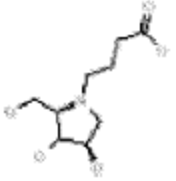
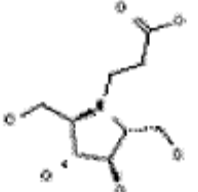
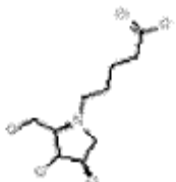
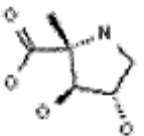
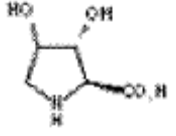
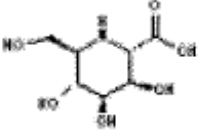
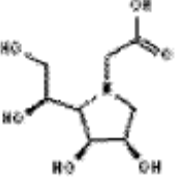
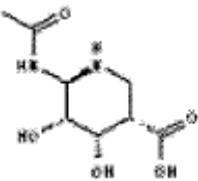
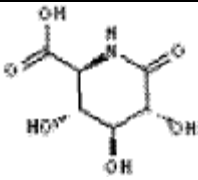
20 Ejemplo 15 Inhibición de la β -glucuronidasa de mamífero y la β -N-acetilglucosaminidasa por los ácidos iminoazúcar

Las siguientes tablas muestran el porcentaje comparativo de inhibición de β -glucuronidasa (hígado) y β -N-acetilglucosaminidasa (riñón) de bovino comercialmente disponibles (Sigma) por ácidos imino-azúcares y aminoácidos a aproximadamente 0.8 mM. Cuando se observó fuerte inhibición se calcularon los valores de IC_{50} y se muestran como μ M junto a los valores de % de inhibición. Se puede observar que la capacidad de inhibir las actividades de glucuronidasa y hexosaminidasa no se encuentra en muchos compuestos de este grupo distintos de los ácidos iminoazúcar. Los ensayos se realizaron utilizando sustratos de p-nitrofenilo como se describió anteriormente.

25

	% de inhibición de glucuronidasa a 0.8 mM	% de inhibición de N-acetil glucosaminidasa a 0.8 mM
Estructura	Hígado de bovino	Riñón de bovino
	-2.2	7.1
	-2.3	5.1

	3.9	49.4
	-3.7	-4.7
	-4.4	-0.6
	88.9 107uM	2.4
	3.8	8
	58.6 531uM	4.8
	-3.2	-4.2
	-1.7	2.3
	-1.6	0.8
	1.4	2.9

	-2	17
	85.3 81 uM	90.1 5.1uM
	0.8	8
	0.6	7.6
	13.8	6.6
	3.3	25.8
	4	82.3 137uM
	97.9 7.3uM	57.9
	99.6 0.04uM	-5.2

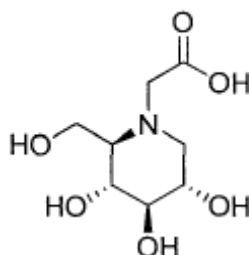
Ejemplos 16 a 21: Síntesis de ácidos iminoazúcar

Procedimiento general de alquilación

5 Se adicionaron haluro de alquilo (0.46 mmol) y K_2CO_3 (0.61 mmol) a una solución de iminoazúcar (0.31 mmol) en DMF (2 mL) y la mezcla de reacción resultante se agitó a 60°C, durante 16 h. El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una combinación de cartuchos Dowex-50WX8-400 y SPE tales como POH o isolate SCX -2.

Los siguientes compuestos se prepararon utilizando el procedimiento general de alquilación:

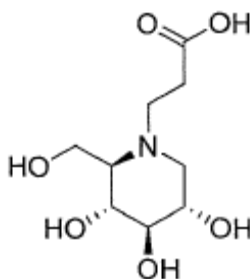
Ácido 2-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-Trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidin-1-il)acético (G6)



10

1H -RMN (D_2O): 3.78 (1 H, dd, J 2.7 Hz, J 13.2 Hz), 3.72 (1 H, dd, J 2.4 Hz, J 13.2 Hz), 3.59-3.51 (1 H, m), 3.41 (1 H, t, J 9.5 Hz), 3.33 (2H, s), 3.23 (1 H, t, J 9.3 Hz), 3.05 (1 H, dd, J 5.0 Hz, J 11.6 Hz), 2.70-2.58 (2H, m); ^{13}C -RMN (D_2O): 176.6, 77.8, 69.0, 68.2, 65.6, 56.8, 56.7, 56.4; MS ($M+H^+$): 222.3

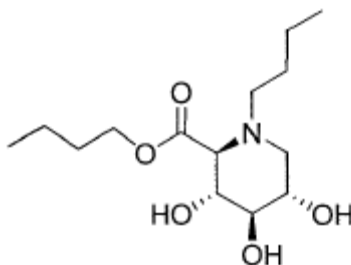
Ácido 2-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-Trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidin-1-il)propanoico (T1)



15

1H -RMN (D_2O): 3.92 (2H, s), 3.63-3.59 (1 H, m), 3.49 (1 H, t, J 5.9 Hz), 3.35-3.29 (3H, m), 3.12 (1H, m), 2.79 (1H, m), 2.70 (1H, m), 2.49-2.46 (2H, m); ^{13}C -RMN (D_2O): 76.6, 68.1, 67.0, 65.3, 54.9, 53.6, 49.2, 31.0; MS ($M+H^+$): 236.0

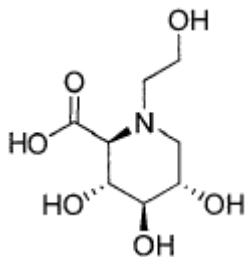
(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-Butil 1-butil-3,4,5-trihidroxipiperidina-2-carboxilato (T2)



20

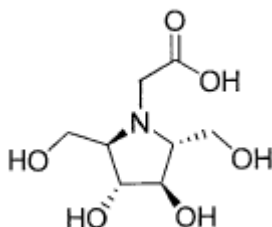
1H -RMN (D_2O): 4.20-4.07 (2H, m), 3.54-3.48 (1 H, m), 3.47 (1 H, t, J 5.8 Hz), 3.19 (1 H, t, J 5.6 Hz), 3.04 (1 H, dd, J 2.9 Hz, J 6.9 Hz), 2.91 (1 H, d, J 5.9 Hz), 2.39 (1 H, dt, J 3.2 Hz, J 6.8 Hz), 2.25 (1 H, m), 2.07 (1 H, t, J 6.6 Hz), 1.57 (2H, m), 1.43 (1 H, m), 1.30 (3H, m), 1.15 (2H, m), 0.81 (3H, t, J 4.5 Hz), 0.77 (3H, J 4.4 Hz); ^{13}C -RMN (D_2O): 77.1, 72.2, 71.2, 68.8, 66.2 (2x), 54.8, 29.8, 26.4, 19.9, 18.5, 13.0 (2x); MS ($M+H^+$): 290.3

Ácido (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-Trihidroxi-1-(2-hidroxietil)piperidina-2-carboxílico (T3)



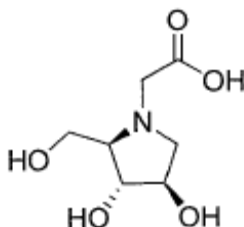
¹H-RMN (D₂O): 3.80-3.67 (3H, m), 3.55 (1 H, t, *J* 5.8 Hz), 3.40 (1 H, m), 3.32 (1 H, t, *J* 5.6 Hz), 3.10 (1H, m), 3.03 (1H, m), 2.84 (1H, m), 2.59 (1H, m); MS (M+H⁺): 222.5

5 Ácido 2-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidin-1-il)acético (S2)



¹H-RMN (D₂O): 4.13 (2H, dd, *J* 0.9 Hz, *J* 3.2 Hz), 3.95 (1 H, d, *J* 9.8 Hz), 3.91 (5H, m), 3.66 (2H, bs). ¹³C-RMN (D₂O): 74.2 (2x), 69.8 (2x), 56.6 (2x), 52.1; MS (M+H⁺): 222.3.

Ácido 2-((2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-Dihidroxi-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)acético (T4)



10

¹H-RMN (D₂O): 4.27 (1 H, m), 4.05 (1 H, m), 3.69 (1 H, d, *J* 9.8 Hz), 3.91 (2H, m), 3.76 (1 H, d, *J* 9.8 Hz), 3.72 (1H, m), 3.55-3.52 (2H, m). ¹³C-RMN (D₂O): 76.0, 73.6 (x2), 59.7, 57.8, 57.6; MS (M+H⁺): 192.3.

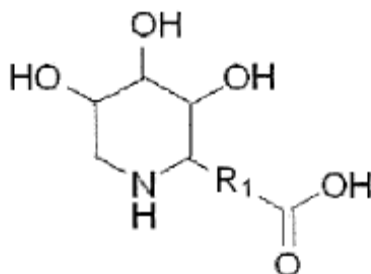
Equivalentes

15

La descripción anterior detalla las realizaciones actualmente preferidas de la presente invención. Se espera que ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la práctica de las mismas para los expertos en el arte tras la consideración de estas descripciones. Se pretende que dichas modificaciones y variaciones estén incluidas dentro de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Un ácido iminoazúcar aislado para uso en un método de tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con síndrome metabólico, en donde el ácido iminoazúcar no inhibe la actividad disacaridasa, presentando un valor IC_{50} en el intervalo μM o mM o superior.
- 5 2. Una composición farmacéutica o nutracéutico que comprende un ácido iminoazúcar aislado como se define en la reivindicación 1.
3. Un proceso para la producción de composición para el tratamiento de diabetes, obesidad o trastornos asociados con el síndrome metabólico que comprende las etapas de:
(a) proporcionar el material vegetal;
10 (b) aislar uno o más ácido(s) iminoazúcar como se define en la reivindicación 1, a partir de dicho material vegetal; y a continuación
(c) formular dicho(s) ácido(s) iminoazúcar aislados con un excipiente farmacéutico para producir una composición en la que la cantidad y concentración del(los) ácido(s) iminoazúcar aislados es suficiente para tratar la diabetes, la obesidad o los trastornos asociados con el síndrome metabólico en un sujeto humano
- 15 4. El proceso de la reivindicación 3, en donde el material vegetal se deriva de una fuente botánica seleccionada de:
(a) *Stevia* spp. (por ejemplo, *S. rebaudiana*); (b) *Gymnema* spp. (por ejemplo, *G. sylvestre*); (c) *Andrographis* spp. (por ejemplo, *A. paniculata*); (d) especies leguminosas (por ejemplo, *Aspalanthus linearis* (Rooibos), *Baphia* spp., *Glycine max*, *Alexa* spp.), *Castanospermum australe*, *Lotus* spp.; (e) plantas de la familia Rutaceae (por ejemplo, *Citrus* spp., por ejemplo, *C. aurantium*), (f) plantas de la Cucurbitaceae (por ejemplo, Asian Pumpkin, *Cucurbita ficifolia* y *Momordica charantia*) o (g) Solanaceae (por ejemplo, *Lycium barbarum*, Goji).
- 20 5. El ácido iminoazúcar de la reivindicación 1, nutracéutico o composición de la reivindicación 2 o proceso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el ácido iminoazúcar es de una clase estructural seleccionada entre piperidina, pirrolidina, pirrolizidina, indolizidina y nortropano.
6. El ácido iminoazúcar, nutracéutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido iminoazúcar es polihidroxilado.
- 25 7. El ácido iminoazúcar, nutracéutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido iminoazúcar es un ácido iminoazúcar de piperidina.
8. El ácido iminoazúcar, nutracéutico, composición o proceso de la reivindicación 7 que es: (a) un ácido pipecólico o hidroxipepecólico; (b) un ISA de piperidina que tiene al menos 3 grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) sobre el núcleo del sistema de anillo; o (c) derivados de N-ácido de (a) o (b); o (d) un ácido polihidroxipepecólico que tiene al menos dos (por ejemplo, 3) grupos hidroxilo libres (o hidroxialquilo) en el núcleo del sistema de anillo.
- 30 9. El ácido iminoazúcar, nutracéutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido iminoazúcar es de fórmula (I):



35 en donde

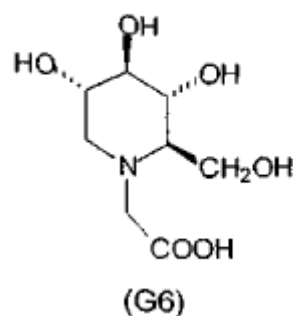
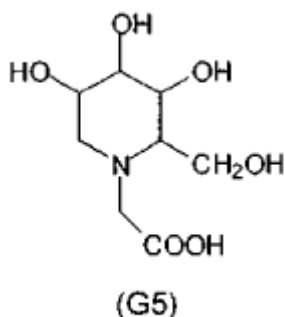
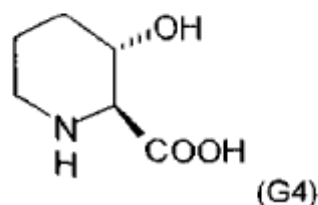
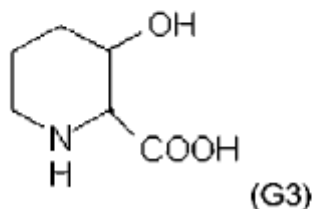
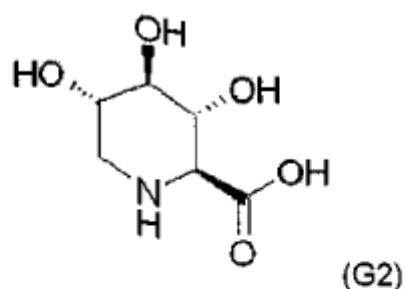
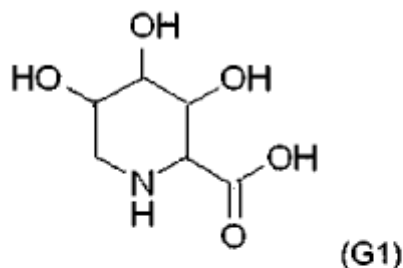
R_1 está ausente o es alquilo C_1-C_6 ;

la ubicación del grupo carboxilo se puede cambiar del carbono del anillo al nitrógeno del anillo para producir un análogo de N-ácido del compuesto de fórmula (I);

o un derivado de acilo (por ejemplo, O-acilo) o análogo deshidroxilado en el que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo;

o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de la misma.

- 5 10. El ácido iminoazúcar, nutraceutico, composición o proceso de la reivindicación 9, en donde el ácido iminoazúcar se selecciona entre las estructuras mostradas a continuación:

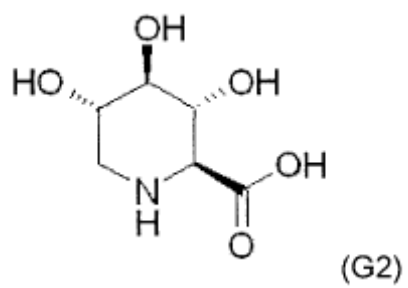


- 10 o (a) análogos de N-ácido de las estructuras (G1)-(G4) anteriores en las que la ubicación del grupo carboxilo se cambia del carbono del anillo al nitrógeno del anillo; (b) derivados de acilo (por ejemplo, O-acilo) de las estructuras anteriores (o de los análogos de N-ácido de (a)); (c) análogos deshidroxilados de las estructuras anteriores (o de los análogos de N-ácido de (a) y (b)) en los que están ausentes uno o más hidroxilo(s) del anillo.

- 15 11. El ácido iminoazúcar, nutraceutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en un método de tratamiento de hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, glucosuria, acidosis metabólica, cataratas, neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, degeneración macular, glomerulosclerosis, cardiomiopatía diabética, resistencia a la insulina, metabolismo alterado de la glucosa, artritis, hipertensión, hiperlipidemia, osteoporosis, osteopenia, pérdida ósea, síndromes óseos quebradizos, síndrome coronario agudo, infertilidad, síndrome del intestino corto, fatiga crónica, trastornos alimentarios y disfunción de la motilidad intestinal.

- 20 12. El ácido iminoazúcar, nutraceutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en un método de tratamiento o prevención de la diabetes tipo 2.

13. El ácido iminoazúcar, nutraceutico, composición o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el ácido iminoazúcar tiene la fórmula (G2):



y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Figura 1

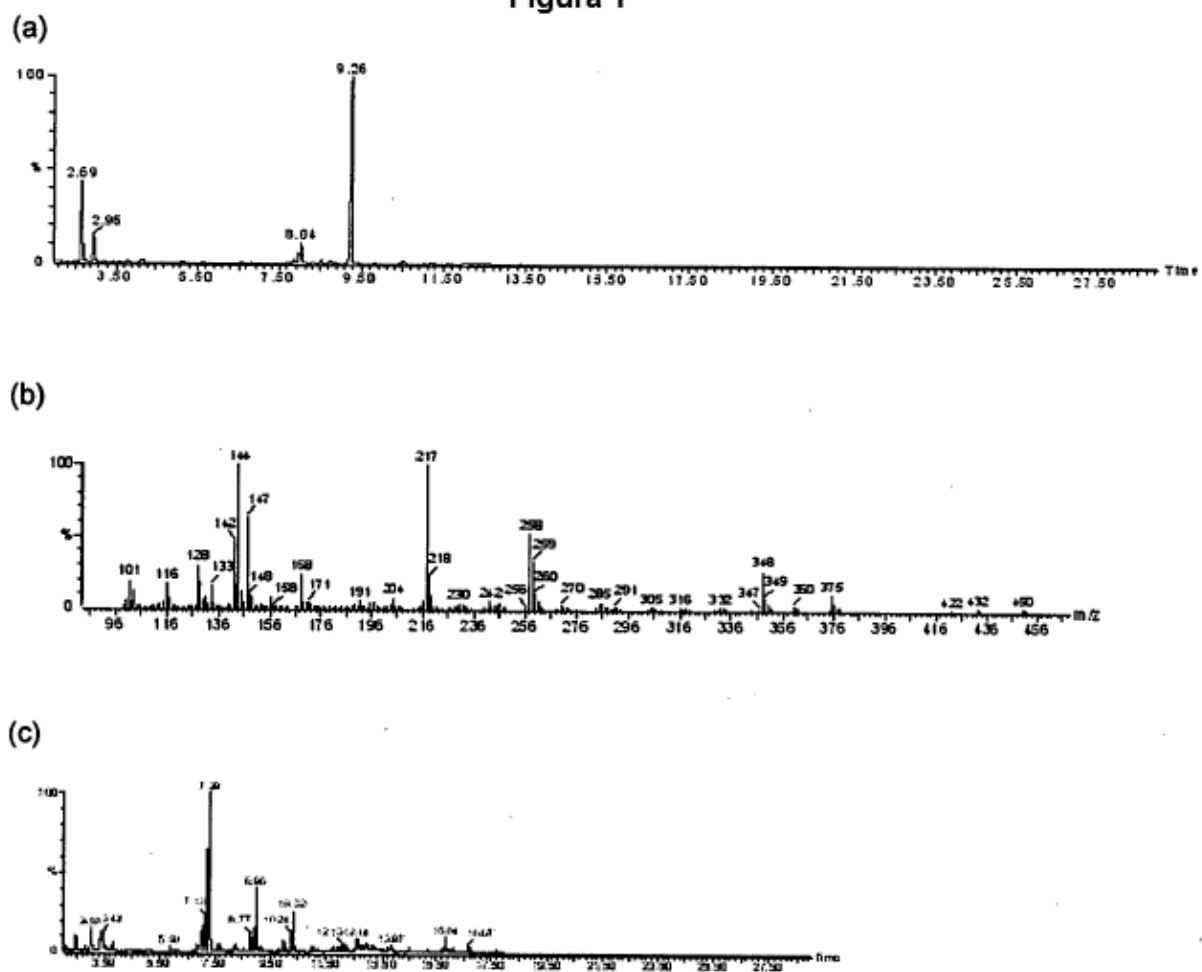


Figura 2

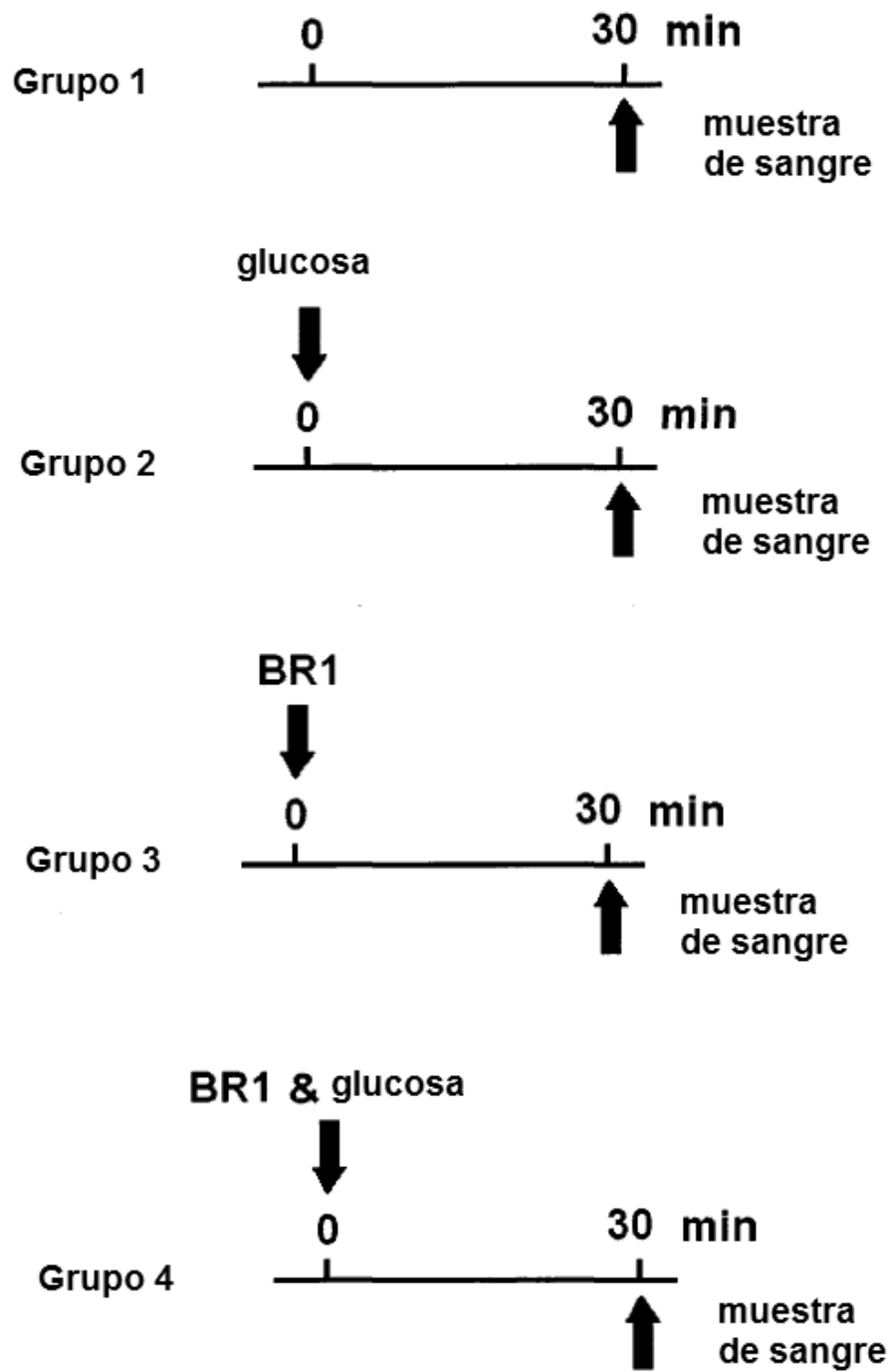


Figura 3

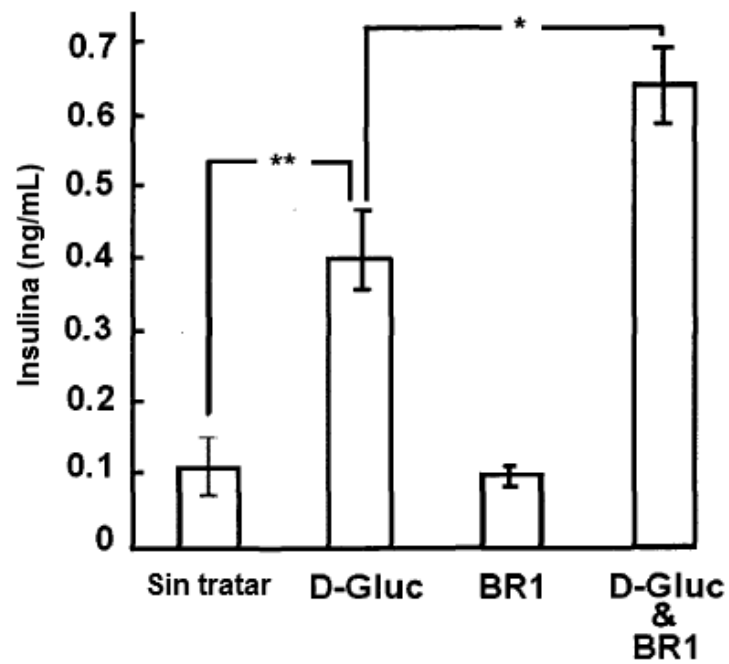


Figura 4

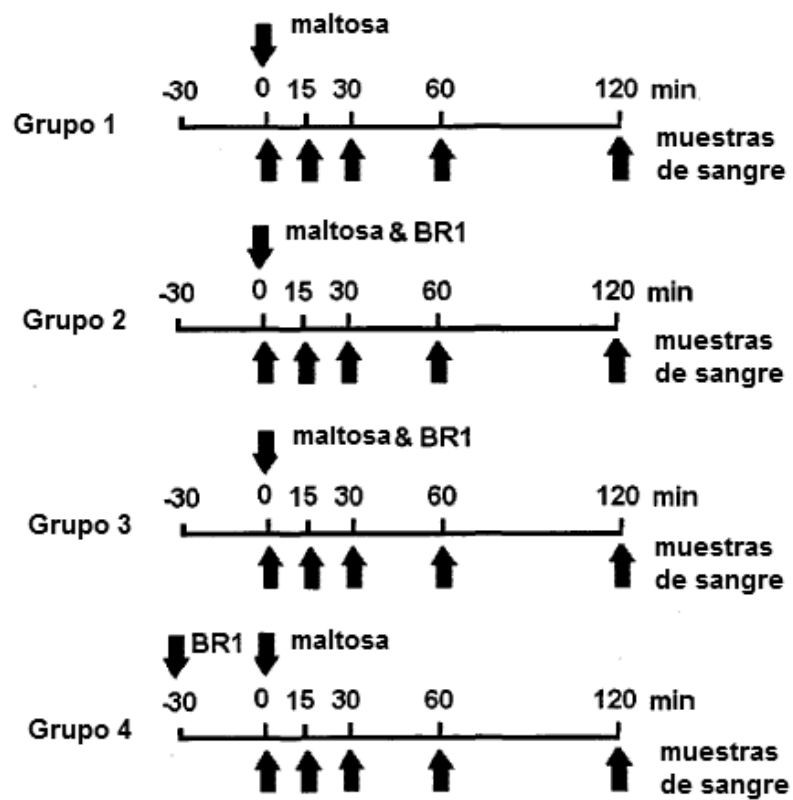


Figura 5

