

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 643**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/445** (2006.01)

**A61K 36/42** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/GB2012/000768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13054070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12783253 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2766019**

54 Título: **Compuestos antiinflamatorios**

30 Prioridad:

**11.10.2011 GB 201117490**

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

**10.09.2018**

73 Titular/es:

**PHYTOQUEST LIMITED (100.0%)  
Plas Gogerddan Aberystwyth  
Ceredigion SY23 3EB, GB**

72 Inventor/es:

**NASH, ROBERT JAMES**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

**ES 2 680 643 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos antiinflamatorios

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a procesos para la producción de una composición que comprende ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico de una fuente botánica que comprende plantas del género *Cucumis*.

10 **Antecedentes de la invención**

El pepino (*Cucumis sativus*) es una planta ampliamente cultivada en la familia de las cucurbitáceas, que incluye calabazas. Los pepinos se originaron en la India y se han cultivado desde hace al menos 3000 años en Asia occidental, y probablemente se introdujeron en otras partes de Europa por los romanos. Los registros del cultivo del pepino aparecen en Francia en el siglo IX, en Inglaterra en el siglo XIV y en América del Norte a mediados del siglo XVI.

Se ha reconocido desde hace tiempo que los pepinos y extractos de pepino tienen propiedades antiinflamatorias, y se han usado tópicamente para diversos tipos de problemas de la piel, incluyendo hinchazón debajo de los ojos y quemaduras solares. El pepino era muy popular en las antiguas civilizaciones de Egipto, Grecia y Roma, donde se utilizaba no solo como alimento sino también por sus propiedades curativas.

Sin embargo, el componente o componentes activos no se han indicado.

Recientemente se ha descubierto ahora el ácido iminoazúcar ido-BR1 se encuentra en variedades de pepino más antiguas, pero está ausente en ciertas variedades comerciales modernas. Se ha demostrado que es un componente principal de ciertos frutos de pepino, ciertas calabazas, y es el único ácido de iminoazúcar en el pepino.

Los ácidos aminoazúcares (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 de las plantas (donde pueden desempeñar un papel en la defensa). Mientras que los iminoazúcares están ampliamente distribuidos en las plantas (Watson et al. (2001) *Phytochemistry* 56: 265-2951), los ácidos de iminoazúcar están mucho menos distribuidos.

Por lo tanto, el descubrimiento de que la distribución botánica del ácido iminoazúcar ido-BR1 se correlaciona con plantas medicinales usadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias es de gran importancia.

La síntesis de ido-BR1 ha sido descrita en Fleet et al. (1986) *Tetrahedron Lett.* 27: 3205-3208.

40 **Resumen de la Invención**

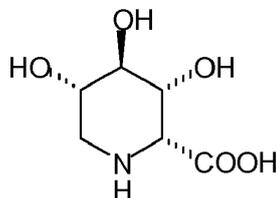
La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la distribución botánica de ido-BR1 está correlacionada con plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, por primera vez se ha identificado ido-BR1 como un principio bioactivo importante en las medicinas herbarias antiinflamatorias establecidas.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona un proceso para la producción de una composición que comprende ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- 50 (a) proporcionar material vegetal a partir de una fuente botánica que comprende plantas del género *Cucumis*;  
 (b) extraer ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico de dicho material vegetal; y después  
 (c) formular dicho ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico con un excipiente o vehículo cosmética, nutracéutica o farmacéuticamente aceptable para producir una composición cosmética,  
 55 nutracéutica o farmacéutica.

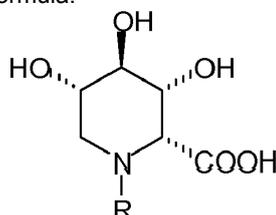
Otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se definen y describen en las reivindicaciones expuestas a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término ido-BR1 pretende definir en sentido estricto un compuesto de la fórmula:



pero también debe interpretarse *sensu lato* que incluye sales, solvatos, metabolitos, profármacos, bioisómeros, derivados y formas protegidas farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los expertos en la técnica apreciarán que es probable que diversos derivados N-sustituídos de ido-BR1 compartan sus propiedades antiinflamatorias y, por lo tanto, los derivados farmacéuticamente aceptables contemplados específicamente incluyen compuestos de la fórmula:



10 en la que R representa alquilo C<sub>1-15</sub> opcionalmente sustituido, alqueno C<sub>1-15</sub> o alquino C<sub>1-15</sub>.

### Descripción detallada de la invención

#### 15 Definiciones

Cuando se usan en el presente documento, y salvo que se indique específicamente otra cosa, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados además de cualquier significado más amplio (o más restringido) que los términos puedan disfrutar en la técnica:

20 A menos que el contexto requiera otra cosa, el uso en el presente documento del singular debe leerse para incluir el plural y viceversa. El término "un" o "una" utilizado en relación con una entidad debe leerse para referirse a una o más de esa entidad. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se usan indistintamente en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, el término "comprender", o variaciones del mismo tales como "comprende" o "que comprende", deben leerse para indicar la inclusión de cualquier número entero mencionado (por ejemplo, una función, elemento, característica, propiedad, etapa de método/proceso o limitación) o grupo de números enteros (por ejemplo, funciones, elemento, características, propiedades, etapas de método/proceso) pero no la exclusión de  
30 ningún otro número entero o grupo de números enteros. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "que comprende" es inclusivo o abierto y no excluye números o etapas método/proceso sin mencionar adicionales.

35 La frase "que consiste esencialmente en" se usa en el presente documento para requerir el número entero o números enteros o etapas que se especifican, así como aquellos que no afectan materialmente al carácter o función de la invención reivindicada.

40 Como se usa en el presente documento, el término "que consiste" se usa para indicar la presencia del número entero mencionado (por ejemplo, una función, elemento, característica, propiedad, etapa de método/proceso o limitación) o grupo de números enteros (por ejemplo, funciones, elemento, características, propiedades, etapas de método/proceso o limitaciones) en solitario.

45 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se usa para definir cualquier afección anormal que deteriore la función fisiológica y esté asociada con síntomas específicos. El término se usa ampliamente para incluir cualquier trastorno, enfermedad, anomalía, patología, dolencia, afección o síndrome en el que la función fisiológica se ve afectada, independientemente de la naturaleza de la etiología (o incluso si se establece la base etiológica de la

enfermedad). Por lo tanto, incluye afecciones derivadas de una infección, trauma, lesión, cirugía, ablación radiológica, intoxicación o deficiencias nutricionales.

5 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a una intervención (por ejemplo, la administración de un agente a un sujeto) que cura, mejora o disminuye los síntomas de una enfermedad o elimina (o disminuye el impacto de) su causa o causas (por ejemplo, estados patológicos variegados). En este caso, el término se usa como sinónimo del término "terapia".

10 Adicionalmente, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a una intervención (por ejemplo, la administración de un agente a un sujeto) que previene o retrasa el inicio o el avance de una enfermedad o reduce (o erradica) su incidencia en una población tratada. En este caso, el término tratamiento se usa como sinónimo del término "profilaxis".

15 El término "sujeto" (que debe leerse para incluir "individuo", "animal", "paciente" o "mamífero" cuando el contexto lo permita) define cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que está indicado el tratamiento. Los sujetos mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico, animales de deporte, y animales de compañía. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

20 Como se usa en el presente documento, una *cantidad eficaz* de un compuesto o composición define una cantidad que puede administrarse a un sujeto sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, pero que es suficiente para proporcionar el efecto deseado, por ejemplo, el tratamiento o la profilaxis manifestada por una mejora permanente o temporal en la afección del sujeto. La cantidad variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del  
25 individuo, el modo de administración y otros factores. Por lo tanto, aunque no es posible especificar una cantidad eficaz exacta, los expertos en la materia podrán determinar una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual usando experimentación rutinaria y conocimiento general de antecedentes. Un resultado terapéutico en este contexto incluye la erradicación o disminución de los síntomas, reducción del dolor o la incomodidad, supervivencia prolongada, movilidad mejorada y otros marcadores de mejora clínica. Un resultado terapéutico no ha  
30 de ser una cura completa.

Como se usa en el presente documento, el término "combinación", como se aplica a dos o más compuestos y/o agentes (también denominados en el presente documento los *componentes*), pretende definir un material en el que los dos o más compuestos/agentes están asociados. Los términos "combinado" y "combinación" en este contexto  
35 deben interpretarse en consecuencia.

La asociación de los dos o más compuestos/agentes en una combinación puede ser física o no física. Los ejemplos de compuestos/agentes combinados físicamente asociados incluyen:

- 40 - composiciones (por ejemplo, formulaciones unitarias) que comprenden los dos o más compuestos/agentes en mezcla (por ejemplo, dentro de la misma dosis unitaria);
- composiciones que comprenden material en el que los dos o más compuestos/agentes están unidos químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, mediante reticulación, aglomeración molecular o unión a un resto de vehículo común);
- 45 - composiciones que comprenden material en el que los dos o más compuestos/agentes se empaquetan químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, se disponen sobre o dentro de vesículas lipídicas, partículas (por ejemplo, micro o nanopartículas) o gotitas de emulsión);
- kits farmacéuticos, paquetes farmacéuticos o paquetes de pacientes en los que los dos o más compuestos/agentes se empaquetan conjuntamente o se presentan conjuntamente (por ejemplo, como  
50 parte de una serie de dosis unitarias);

Los ejemplos de compuestos/agentes combinados no asociados físicamente incluyen:

- 55 - material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para la asociación extemporánea de al menos un compuesto/agente para formar una asociación física de los dos o más compuestos/agentes;
- material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para terapia de combinación con los dos o más compuestos/agentes;

- material que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para su administración a una población de pacientes en la que el otro o los demás de los dos o más compuestos/agentes se han administrado (o se están administrando);
- material que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes en una cantidad o en una forma que está específicamente adaptada para su uso junto con el otro o los demás de los dos o más compuestos/agentes.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia de combinación" pretende definir terapias que comprenden el uso de una combinación de dos o más compuestos/agentes (como se ha definido anteriormente).  
 10 Por lo tanto, las referencias a "terapia de combinación", "combinaciones" y el uso de compuestos/agentes "en combinación" en esta solicitud pueden referirse a compuestos/agentes que se administran como parte del mismo régimen de tratamiento global. Como tal, la posología de cada uno de los dos o más compuestos/agentes puede diferir: cada uno puede administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes. Por lo tanto, se apreciará que los compuestos/agentes de la combinación pueden administrarse secuencialmente (por ejemplo, antes o después) o  
 15 simultáneamente, en la misma formulación farmacéutica (es decir, conjuntamente), o en diferentes formulaciones farmacéuticas (es decir, por separado). Simultáneamente en la misma formulación es como una formulación unitaria, mientras que simultáneamente en diferentes formulaciones farmacéuticas es no unitaria. Las posologías de cada uno de los dos o más compuestos/agentes en una terapia de combinación también pueden diferir con respecto a la vía de administración.

20 Como se usa en el presente documento, el término "kit farmacéutico" define un conjunto de una o más dosis unitarias de una composición farmacéutica junto con medios de dosificación (por ejemplo, dispositivo de medición) y/o medios de administración (por ejemplo, inhalador o jeringa), opcionalmente todo contenido dentro embalaje exterior común. En los kits farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los  
 25 compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no unitarias. La dosis unitaria o dosis unitarias pueden estar contenidas dentro de un blíster. El kit farmacéutico puede comprender además opcionalmente instrucciones de uso.

Como se usa en el presente documento, el término "paquete farmacéutico" define un conjunto de una o más dosis  
 30 unitarias de una composición farmacéutica, opcionalmente contenidas dentro del embalaje exterior común. En los paquetes farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no unitarias. La dosis unitaria o dosis unitarias pueden estar contenidas dentro de un blíster. El paquete farmacéutico puede comprender además opcionalmente instrucciones de uso.

35 Como se usa en el presente documento, el término "paquete de paciente" define un paquete, prescrito a un paciente, que contiene composiciones farmacéuticas para todo el transcurso del tratamiento. Los paquetes de paciente usualmente contienen uno o más paquetes de blíster. Los paquetes de paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, donde un farmacéutico divide el suministro de un producto farmacéutico de un paciente de un  
 40 suministro a granel, ya que el paciente siempre tiene acceso al prospecto incluido en el paquete de paciente, que normalmente falta en las recetas del paciente. La inclusión de un prospecto ha demostrado mejorar el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico.

Las combinaciones de la descripción pueden producir un efecto terapéuticamente eficaz con relación al efecto  
 45 terapéutico de los compuestos/agentes individuales cuando se administran por separado. El término *bioisótero* (o simplemente *isótero*) es un término de la técnica utilizado para definir análogos farmacológicos en los que uno o más átomos (o grupos de átomos) se han sustituido por átomos de reemplazo (o grupos de átomos) que tienen características estéricas y/o electrónicas similares a los átomos que reemplazan. La sustitución de un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo por un átomo de flúor es un reemplazo bioisótero comúnmente empleado. La  
 50 sustitución Sila (intercambio de C/Si) es una técnica relativamente reciente para producir isósteros. Este enfoque implica el reemplazo de uno o más átomos de carbono específicos en un compuesto con silicio (para una revisión, véase Tacke y Zilch (1986) Endeavour, New Series 10: 191-197). Los isósteros sustituidos con sila (isósteros de silicio) pueden presentar propiedades farmacológicas mejoradas, y pueden, por ejemplo, tolerarse mejor, tener una semivida más larga o presentar una potencia aumentada (véase, por ejemplo, Englebienne (2005) Med. Chem., 1(3):  
 55 215-226). De forma similar, la sustitución de un átomo por uno de sus isótopos, por ejemplo hidrógeno por deuterio, también puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, por ejemplo, conducir a una semivida más larga (véase, por ejemplo, Kushner et al (1999) Can J Physiol Pharmacol. 77(2):79-88). En su aspecto más amplio, la presente invención contempla todos los bioisósteros (y específicamente, todos los bioisósteros de silicio) de los compuestos de la descripción. Los términos *derivado* y *derivado farmacéuticamente aceptable* según se aplican a

los compuestos de la descripción definen compuestos que se obtienen (o pueden obtenerse) por derivación química del compuesto original de la descripción. Los derivados farmacéuticamente aceptables son, por lo tanto, adecuados para su administración o su uso en contacto con los tejidos humanos sin excesiva toxicidad, irritación o respuesta alérgica (es decir, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable). Los derivados preferidos son aquellos obtenidos (o que pueden obtenerse) por alquilación, esterificación o acilación de los compuestos precursores. Por lo tanto, los derivados farmacéuticamente aceptables del compuesto de la descripción incluyen N-óxidos y ésteres del mismo.

Los derivados farmacéuticamente aceptables de la descripción pueden conservar algunas o todas las actividades biológicas descritas en el presente documento. En algunos casos, la actividad biológica aumenta por derivación. Los derivados pueden actuar como profármacos, y una o más de las actividades biológicas descritas en el presente documento pueden surgir solo después del procesamiento *in vivo*. Los profármacos particularmente preferidos son derivados de éster que están esterificados en uno o más de los hidroxilos libres y que se activan por hidrólisis *in vivo*. La derivación también puede aumentar otras actividades biológicas del compuesto, por ejemplo, la biodisponibilidad y/o el perfil inhibitor de glucosidasa. Por ejemplo, la derivación puede aumentar la penetración del SNC (por ejemplo, la penetración de la barrera hematoencefálica).

El término *sal farmacéuticamente aceptable* define cualquier sal de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxica de la base libre que es adecuada para su uso en contacto con los tejidos humanos y animales inferiores sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y que son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se conocen bien en la técnica. Los 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, hidroximaléico, dihidroximaléico, 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).

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

El término *metabolito farmacéuticamente aceptable* según se aplica a los compuestos de la descripción define un producto farmacológicamente activo producido a través del metabolismo en el cuerpo del compuesto especificado o sal del mismo.

El término *profármaco farmacéuticamente aceptable* según se aplica a los compuestos de la descripción, define cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable que puede convertirse en condiciones fisiológicas, o mediante solvolisis, en el compuesto especificado, en una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, o en un compuesto que comparte al menos parte de la actividad del compuesto especificado.

Los profármacos y metabolitos activos de los compuestos de la descripción pueden identificarse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Bertolini et al., J. Med. Chem., 1997, 40, 2011-2016).

En la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" define una cadena hidrocarburo saturada lineal o ramificada. El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo saturada lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono. El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo saturada lineal o ramificada que tiene de uno a nueve átomos de carbono. El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo saturada lineal o ramificada que tiene de uno a quince átomos de carbono. Se prefiere alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, t-butilo, n-hexilo. Los grupos alquilo de la descripción pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno.

En la presente memoria descriptiva, el término "alquenilo" define una cadena hidrocarburo lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El término "alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono. El término "alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a nueve átomos de carbono. El término "alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a quince átomos de carbono. Se prefiere alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos incluyen etenilo, 2-propenilo y 3-hexenilo. Los grupos

- alqueniolo de la descripción pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno. En la presente memoria descriptiva, el término "alqueniolo" define una cadena hidrocarburo lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. El término "alqueniolo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono. El término "alqueniolo C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a nueve átomos de carbono. El término "alqueniolo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>" se refiere a una cadena hidrocarburo insaturada lineal o ramificada que tiene de uno a quince átomos de carbono. Se prefiere alqueniolo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos incluyen eteniolo, 2-propeniolo y 3-hexeniolo. Los grupos alqueniolo de la descripción pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno.
- 10 El término *aislado* según se aplica al ido-BR1 de la descripción se usa en el presente documento para indicar que el ido-BR1 existe en un medio físico distinto del que tiene lugar en la naturaleza (o en el caso del ido-BR1 sintético), se purifica hasta cierto punto). Por ejemplo, el ido-BR1 aislado puede aislarse sustancialmente (por ejemplo, purificarse) con respecto al medio celular complejo en el que se produce naturalmente (o con respecto a algunos o todos los productos de partida, compuestos intermedios, tampones, disolventes, reactantes y/o coproductos a partir de los cuales se sintetiza).

20 Cuando el material aislado (por ejemplo, Ido-BR1 sintético, de origen no natural) se purifica, el nivel absoluto de pureza no es crítico y los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente niveles apropiados de pureza de acuerdo con el uso que se haga del material. Sin embargo, son preferidos los niveles de pureza del 50 % p/p, 60 % p/p, 70 % p/p, 80 % p/p, 90 % p/p, 99 % p/p o superior. En algunas circunstancias, el ido-BR1 aislado forma parte de una composición (por ejemplo, un extracto más o menos en bruto que contiene muchas otras sustancias) o un sistema tampón, que puede contener, por ejemplo, otros componentes. En otras circunstancias, el ido-BR1 aislado puede purificarse hasta la homogeneidad esencial, por ejemplo como se determina espectrofotométricamente, mediante RMN o mediante cromatografía (por ejemplo, GC-MS de los derivados de trimetilsililo).

25 El término *medicina herbaria* se usa en el presente documento para definir una composición farmacéutica en la que al menos un principio activo (por ejemplo, el ido-BR1) no se sintetiza químicamente y es un constituyente fitoquímico de una planta. En la mayoría de los casos, este principio activo no sintético no está aislado (como se define en el presente documento), sino que se presenta junto con otros fitoquímicos con los que está asociado en la planta de origen. Sin embargo, en algunos casos, el *principio o principios bioactivos* derivados de plantas pueden estar en una fracción concentrada o aislados (a veces implicando altos grados de purificación). En muchos casos, sin embargo, la medicina herbaria comprende un extracto más o menos en bruto, infusión o fracción de una planta, o incluso una planta entera sin procesar (o parte de la misma), aunque en tales casos la planta (o parte de la planta) suele al menos secarse y/o molerse.

35 El término *nutracéutico* se usa en el presente documento para definir un producto alimenticio (o aislado del mismo) que proporciona beneficios fisiológicos o protege contra la enfermedad. Los nutracéuticos preferidos de la invención son antiinflamatorios.

40 El término *especificación estándar* se usa en el presente documento para definir una característica, o un perfil fitoquímico, que se correlaciona con una calidad aceptable de la medicina herbaria, cosmética o nutracéutica. En este contexto, el término *calidad* se usa para definir la aptitud general del producto para su uso previsto, e incluye la presencia de ido-BR1 en una concentración apropiada.

#### 45 **Posología**

Los compuestos de la presente descripción pueden administrarse por vía tópica o por vía oral o parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, vías aéreas (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

50 La cantidad 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 el alcance del trastorno tratado, y el compuesto particular seleccionado.

55 Además, los compuestos de la descripción pueden usarse junto con otros agentes que se sabe que son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos que surgen de anomalías del plegamiento de proteínas (como se describe más adelante) y en dichas realizaciones la dosis puede ajustarse en consecuencia.

En general, la cantidad eficaz del compuesto administrado variará generalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a

500 mg/kg al día. Una dosificación unitaria puede contener de 0,05 a 500 mg del compuesto, y se puede tomar una o más veces al día. El compuesto se puede administrar con un vehículo farmacéutico utilizando formas de dosificación unitaria convencionales por vía oral, parenteral o tópica, como se describe a continuación.

- 5 La ruta de administración preferida es la administración oral. En general, una dosis adecuada estará en el intervalo de 0,01 a 500 mg por kilogramo de peso corporal del receptor al día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal al día, y mucho más preferiblemente en el intervalo de 1 a 5 mg por kilogramo de peso corporal al día.
- 10 La dosis deseada se presenta preferiblemente como una dosis única para administración diaria. Sin embargo, también se pueden emplear dos, tres, cuatro, cinco o seis o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. Estas subdosis pueden administrarse en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 0,001 a 100 mg, preferiblemente de 0,01 a 10 mg, y mucho más preferiblemente de 0,5 a 1,0 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria.

15

### **Formulación**

- El compuesto para su uso de acuerdo con la descripción puede adoptar cualquier forma. Puede ser sintético o aislarse de fuentes naturales (por ejemplo, de cualquiera de las fuentes botánicas identificadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, una fuente botánica seleccionada de plantas de la familia *Cucumis*. Particularmente preferidos como fuente botánica son los frutos de las plantas anteriores, por ejemplo pepinos. Cuando se aísla de una fuente natural, el ido-BR1 puede purificarse. Sin embargo, las composiciones de la descripción pueden adoptar la forma de medicinas herbarias, tal como se ha definido anteriormente. Dichas medicinas herbarias preferiblemente se analizan para determinar si cumplen una especificación estándar antes de su uso.

- Las medicinas herbarias para su uso de acuerdo con la descripción pueden ser material de plantas secas. Como alternativa, la medicina herbaria puede ser material vegetal procesado, implicando el procesamiento preprocesamiento físico o químico, por ejemplo, pulverización, trituración, congelación, evaporación, filtración, prensado, secado por pulverización, extrusión, extracción con disolvente supercrítico y producción de tintura. En los casos en que la medicina herbaria se administra o se vende en forma de una planta completa (o parte de la misma), el material de la planta puede secarse antes de su uso. Se puede usar cualquier forma conveniente de secado, incluyendo liofilización, secado por pulverización o secado al aire.

- 35 El ido-BR1 se puede separar de los componentes de mayor peso molecular tales como proteínas y polisacáridos usando diversas tecnologías de membrana. Estas incluyen microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración. Como alternativa, o además, la electrodiálisis también se puede usar para concentrar el ido-BR1 cargado. Estos métodos usan membranas de tamaños de poro que permiten que solo pasen las moléculas por debajo de cierto tamaño o dependan de las cargas sobre las moléculas para permitir o no que pasen a través de la membrana. También se pueden usar resinas de intercambio aniónico y catiónico para concentrar el ido-BR1.

- Cuando se aísla de una fuente natural, el compuesto para su uso de acuerdo con la descripción puede purificarse. En realizaciones en las que el compuesto se formula junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, se puede usar cualquier excipiente adecuado, incluyendo, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados 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 disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

50

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

- La composición farmacéutica puede adoptar la forma de un kit de partes, cuyo kit puede comprender la composición de la descripción 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 compuesto para su uso de acuerdo con la descripción, mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes

- aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse 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 compuesto para su uso de acuerdo con la descripción se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un aceite como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.
- 10 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen, además del principio activo, vehículos tales como los que son conocidos en la técnica
- 15 como apropiados.
- Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, los compuestos de la descripción generalmente se proporcionarán en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones
- 20 acuosas de acuerdo con la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.
- Los compuestos de la descripción también se pueden presentar como formulaciones de liposomas.
- 25 Para administración oral, el compuesto puede formularse en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, píldoras, comprimidos, trociscos, pastillas, masas fundidas, polvos, gránulos, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones (cuyas soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones pueden ser acuosas o no acuosas). Las formas de dosificación unitaria sólidas pueden ser una cápsula que puede ser del tipo de gelatina de cubierta dura o
- 30 blanda ordinaria que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz.
- En otra realización, los compuestos de la descripción se comprimen con bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes destinados a ayudar a la ruptura y disolución del comprimido después de
- 35 administración, tales como almidón de patata, ácido algínico, almidón de maíz y goma guar, lubricantes destinados a mejorar el flujo de las granulaciones del comprimido y evitar la adhesión del material del comprimido a las superficies de los troqueles de comprimidos, por ejemplo, talco, ácido esteárico o estearato de magnesio, calcio o cinc, tintes, agentes colorantes y agentes saporíferos destinados a mejorar las cualidades estéticas de los comprimidos y
- 40 hacerlos más aceptables para el paciente.
- Los excipientes adecuados para su uso en formas de dosificación líquidas orales incluyen diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un agente tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable.
- 45 Los compuestos de la descripción también pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o interperitoneal.
- En dichos aspectos, el compuesto se proporciona como dosis inyectables en un diluyente fisiológicamente aceptable
- 50 junto con un vehículo farmacéutico (que puede ser un líquido estéril o una mezcla de líquidos). Los líquidos adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol (tales como etanol, isopropanol o hexadecil alcohol), glicoles (tales como propilenglicol o polietilenglicol), glicerol cetales (tal como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol), éteres (tal como poli(etilen-glicol) 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 tensioactivo
- 55 farmacéuticamente aceptable (tal como un jabón o un detergente), un agente de suspensión (tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa), o un agente emulsionante y otros adyuvantes farmacéuticos. Los aceites adecuados que pueden usarse en las formulaciones parenterales de esta descripción son los de origen del petróleo, 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 adecuados incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Los ésteres de ácidos grasos adecuados son, por ejemplo, oleato de etilo y miristato de isopropilo.

Los jabones adecuados incluyen sales grasas de metal alcalino, amonio y trietanolamina y los detergentes adecuados incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio, 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 aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno-polipropileno; y detergentes anfóteros, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, así como mezclas.

10 Las composiciones parenterales de esta descripción contendrán típicamente de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 25 % en peso del compuesto para su uso de acuerdo con la descripción en solución.

Se pueden usar también conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener un tensioactivo no iónico que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones varía de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 15 % en peso. El tensioactivo puede ser un único componente que tiene el anterior HLB o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tienen el HLB deseado. Ilustrativa de los tensioactivos usados en formulaciones parenterales son la clase de ésteres de ácidos grasos de polietilensorbitán, por ejemplo, monooleato de sorbitán 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.

El compuesto para su uso de acuerdo con la descripción también se puede administrar por vía tópica, y cuando se hace así, el vehículo puede comprender adecuadamente una solución, ungüento o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del compuesto de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % p/v (peso por unidad de volumen).

30 Cuando se usa de forma complementaria, el compuesto para su uso de acuerdo con la descripción se puede formular para su uso con uno o más fármacos diferentes. Por lo tanto, el uso complementario puede reflejarse en una dosificación unitaria específica diseñada para ser compatible (o para sinergizar) con el otro u otros fármacos, o en formulaciones en las que el compuesto se mezcla con una o más enzimas. Los usos complementarios también se pueden reflejar en la composición de los kits farmacéuticos de la descripción, en la que los compuestos de la descripción se empaquetan conjuntamente (por ejemplo, como parte de una serie de dosis unitarias) con las enzimas. El uso complementario también se puede reflejar en información y/o instrucciones relacionadas con la administración conjunta del compuesto y/o enzima.

#### Formulaciones cosméticas

40 Las composiciones cosméticas de la descripción se pueden seleccionar, por ejemplo, de composiciones humectantes, composiciones de limpieza, o cualquier composición que pueda proporcionar un beneficio a la piel. Las composiciones cosméticas de la descripción pueden comprender excipientes o vehículos cosméticamente aceptables, por ejemplo seleccionados de los que se describen a continuación.

45 En un aspecto, la composición cosmética es una composición limpiadora. Las composiciones de limpieza adecuadas son sólidas o semisólidas a temperatura ambiente. Los ejemplos de composiciones de limpieza útiles incluyen, pero sin limitación, jabones de ácidos grasos, incluyendo jabones de glicerina, detergentes sintéticos y mezclas de los mismos. Las composiciones de limpieza sólida se muestran ampliamente en Soap Technology durante la década de 50 1990. Es deseable que la composición de limpieza sea fluida.

En un aspecto de la descripción, la composición de limpieza comprende jabón de glicerina. Los ejemplos de jabones de glicerina útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Pat. de Estados Unidos N.º 4.405.492 y 4.879.063. Los ejemplos de jabones de ácidos grasos adecuados incluyen jabones derivados de longitudes de cadena de hidrocarburo de aproximadamente 10 a 22 (que incluyen carbono carboxílico) y pueden ser saturadas o insaturadas. El jabón puede ser, por ejemplo, la sal de sodio, sal de potasio, sal de amonio, sal de trietanolamonio y mezclas de las mismas.

Los detergentes sintéticos adecuados incluyen los conocidos en la técnica para el propósito deseado. Los ejemplos

de detergentes útiles para la limpieza personal incluyen los isetionatos, sarcosinatos y gliceril éter sulfonatos que pueden ser variantes de longitud de cadena pura o los derivados de aceites comerciales tales como aceite de coco. Otros detergentes adecuados incluyen acil sarcosinatos aniónicos, metil acil tauratos, N-acil glutamatos, alquilsulfosuccinatos, ésteres de alquil fosfato, ésteres de alquil fosfato etoxilados, trideceth sulfatos, condensados de proteínas, mezclas de alquilsulfatos etoxilados y óxidos de alquilaminas, betaínas, sultaínas y mezclas de los mismos. Se incluyen los alquil éter sulfatos con 1 a 12 grupos etoxi, especialmente lauril éter sulfatos de amonio y sodio.

La composición cosmética puede ser una composición hidratante.

10

Otros componentes opcionales de las composiciones cosméticas de la descripción incluyen, pero sin limitación, perfumes, fragancias, conservantes, colorantes, tintes, agentes antiaglutinantes e ingredientes para el cuidado personal, incluyendo, pero sin limitación, ingredientes para el cuidado de la piel y del cabello.

15 Los ejemplos de ingredientes adecuados para el cuidado personal útiles en la presente descripción incluyen, pero sin limitación, cantidades seguras y eficaces de: humectantes, protectores solares, calmantes para la piel, antiirritantes, antiinflamatorios, emolientes, agentes acondicionadores, humectantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes de bronceado artificiales, agentes antimicrobianos, agentes antiacné, agentes antiarrugas, agentes antiatofia de la piel, agentes reafirmantes de la piel, agentes contra la picazón, agentes antifúngicos, anestésicos tópicos, agentes vesicales para el tono de la piel, principios naturales activos, agentes para minimizar la apariencia o retrasar el rebrote del vello no deseado, modificadores de la textura de la piel, y agentes de limpieza adicionales.

25 En una realización, el ido-BR1 puede usarse a partir de un extracto de agua o de agua alcohólica usando una emulsión de agua en aceite (w/o) tal como se emplea, por ejemplo, en el tratamiento de pieles secas y aplicaciones emolientes.

30 Los emolientes funcionan por su capacidad para permanecer en la superficie de la piel o en el estrato córneo para actuar como lubricantes, reducir la descamación y mejorar la apariencia de la piel. Los emolientes típicos incluyen ésteres grasos, alcoholes grasos, aceite mineral, copolímeros de poliéter siloxano y similares. Los ejemplos de emolientes adecuados incluyen, pero sin limitación, polipropilenglicol ("PPG")-15 estearil éter, PPG-10 cetil éter, esteareth-10, oleth-8, PPG-4 lauril éter, acetato de vitamina E, cocoato de glicerilo PEG-7, lanolina y combinaciones de los mismos. Se prefieren acetato de vitamina E, cocoato de glicerilo PEG-7 y combinaciones de los mismos.

35 Los ejemplos de humectantes adecuados incluyen alcoholes polihídricos. Los alcoholes polihídricos adecuados incluyen, pero sin limitación, glicerol (también conocido como glicerina), polialquilenglicoles, alquilenpolioles y sus derivados, incluidos propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol y derivados de los mismos, sorbitol, hidroxipropil sorbitol, hexilenglicol, 1,3-dibutilenglicol, 1,2,6, -hexanotriol, glicerol etoxilado, glicerol propoxilado y mezclas de los mismos.

40

Los calmantes para la piel adecuados incluyen, pero sin limitación, pantenol, bisabolol, alantoína, aloe y combinaciones de los mismos.

45 Los agentes acondicionadores adecuados incluyen, pero sin limitación, dimeticona propil PG-betaína, copolioles de dimeticona, poliuretano-10, guar, derivados de guar y combinaciones de los mismos. Los principios activos antiacné adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido salicílico, azufre, ácido láctico, ácido glicólico, ácido pirúvico, urea, resorcinol, N-acetilcisteína, ácido retinoico, peróxido de benzoilo, octopirox, triclosan, ácido azelaico, fenoxietanol, fenoxipropanol, flavonoides, derivados de los mismos y combinaciones de los mismos. Se prefieren ácido salicílico y peróxido de benzoilo.

50

### **Ejemplos**

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos.

#### **55 Ejemplo 1: Identificación de ido-BR1 en pepino**

La extracción de los frutos del pepino en agua o disolventes acuosos, tal como etanol ac. al 70 %, es eficaz para extraer el ido-BR1. Las resinas de intercambio catiónico tales como resina IR120 o Dowex 50 en la forma H<sup>+</sup> (o forma similar seleccionada por los expertos en la técnica) proporcionarán una fracción concentrada que contiene ido-

BR1 junto con aminoácidos. El uso de una resina de intercambio aniónico tal como CG400 o Dowex 1 en la forma OH<sup>-</sup> (o una forma similar seleccionada por los expertos en la técnica) también proporcionará una fracción enriquecida con ido-BR1.

## 5 GC-MS

Todas las muestras de columnas de intercambio iónico se liofilizaron antes de la derivación. Se prepararon derivados de trimetilsililo (TMS) usando una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano en piridina (reactivo de sililación Pierce "Tri-Sil", HMDS:TMCS:piridina en una relación de 2:1:10). Las muestras se calentaron a 60 °C durante 15 minutos y luego se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 60 minutos. Los productos de reacción insolubles se sedimentaron por centrifugación, y el sobrenadante se transfirió a viales nuevos usando una jeringa.

El análisis se realizó mediante GC-MS usando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL con una columna de sílice fundida de alta polaridad (columna Varian "Factor Four" VF-5ms, 25 m x 0,25 mm de d.i., espesor de fase 0,25 µm). El caudal del gas portador (helio) fue de 1 ml min<sup>-1</sup>. Los derivados de trimetilsililo (TMS) se separaron usando un programa de temperatura que comenzó a 160 °C durante 5 minutos seguido de un aumento lineal a 300 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>. La espectrometría de masas de impacto electrónico del eluyente de columna se realizó usando un espectrómetro de masas Perkin Elmer TurboMass Gold, con un sistema de filtro de iones cuadrupolar, que se hizo funcionar a 250 °C constantemente durante el análisis. El volumen de inyección fue de 1 µl.

Ido-BR1 proporciona un espectro de masa distintivo como el derivado de trimetilsililo con fragmentos principales vistos a 147, 217, 258, 330 y 420 amu. Es claramente distinguible en extracto de pepino a concentraciones comparables a los aminoácidos primarios, tal como ácido aspártico. Usando el método GC descrito, ido-BR1 tiene un tiempo de retención de 10,45 minutos con los aminoácidos comunes observados a los 3 a 5 minutos. El tiempo de retención de ido-BR1 es comparable al de los derivados de trimetilsililo de glucosa. La eliminación de glucosa por los métodos de intercambio iónico descritos permite la determinación de ido-BR1 por GC-MS. No hay otros iminoazúcares o ácidos de iminoazúcar en los frutos del pepino.

### Ejemplo 2: Confirmación de la estructura de ido-BR1

La purificación del pepino ido-BR1 se complica por los aminoácidos comunes que están presentes a concentraciones similares en el fruto. Sin embargo, después de la concentración usando cromatografía de intercambio catiónico y aniónico, es posible purificar adicionalmente el ido-BR1 pasándolo por una columna de óxido de alúmina neutra y eluyendo con agua para obtener un compuesto casi puro (JH0808/155/agua) que podría usarse para RMN de protón y carbono para confirmar la estructura en comparación con ido-BR1 sintético.

### Ejemplo 3: Ensayos de glicosidasa

Todas las enzimas y sustratos de *para*-nitrofenilo se adquirieron en Sigma, con la excepción de beta-manosidasa que procedía de Megazyme. Las enzimas se ensayaron a 27 °C en tampones de ácido cítrico 0,1 M/fosfato de hidrógeno disódico 0,2 M al pH óptimo para la enzima. La mezcla de incubación consistía en 10 µl de solución enzimática, 10 µl de 1 mg/ml de solución acuosa de muestra y 50 µl del sustrato de *para*-nitrofenilo 5 mM apropiado constituido en tampón al pH óptimo para la enzima. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 70 µl de glicina 0,4 M (pH 10,4) durante la fase exponencial de la reacción, que se había determinado al principio usando ensayos no inhibidos en los que el agua reemplazaba el inhibidor. Las absorbancias finales se leyeron a 405 nm usando 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. El método se realizó como se describe en Watson et al. (1997) *Phytochemistry* 46 (2): 255-259.

La tabla siguiente muestra el porcentaje de inhibición provocado por DNJ, BR1 e ido-BR1 cuando se ensaya en un panel de glucosidasas a 0,2 mM. Un valor negativo sugiere una estabilización de la enzima o promoción de la actividad enzimática (quizás uniéndose a un sitio no catalítico). DNJ muestra una potente inhibición de glucosidasas, pero BR1 es un mal inhibidor e ido-BR1 un inhibidor muy débil de las dos glucosidasas en las que se ensayó. BR1 es un buen inhibidor de la glucuronidasa, pero ido-BR1 no es inhibidor. Ido-BR1 parece promover ligeramente la actividad de la alfa-manosidasa. A partir de estos resultados, se sugiere que ido-BR1 no inhibirá significativamente las glucosidasas digestivas y, por lo tanto, tendrá un mejor perfil farmacológico que DNJ para los trastornos inflamatorios.

Ensayo	DNJ	BR1	6-epi-BR1
<b><math>\alpha</math>-D-glucosidasa</b> (Levadura)	35,7	4,9	4,7
<b><math>\alpha</math>-D-glucosidasa</b> ( <i>Bacillus</i> )	99,5	49,2	26,4
<b><math>\alpha</math>-D-glucosidasa</b> (Arroz)	99,6	55,2	-
<b><math>\beta</math>-D-glucosidasa</b>	63,7	6,7	6,1
<b><math>\alpha</math>-D-galactosidasa</b>	-3,3	-6,3	-2,7
<b><math>\beta</math>-D-galactosidasa</b>	0,4	6,2	1,0
<b><math>\alpha</math>-L-fucosidasa</b>	5,9	1,6	-
<b><math>\alpha</math>-D-manosidasa</b>	26,6	28,9	-28,4
<b><math>\beta</math>-D-manosidasa</b>	-19,0	7,8	-4,4
<b>Naringinasa</b>	20,8	1,4	-
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-D-gluc</b> (Riñón bovino)	-0,8	2,4	5,5
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-D-gluc</b> (Alubia)	2,8	10,4	-4,5
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-D-hexosaminidasa</b>	-5,5	-1,1	-
<b>Amiloglucosidasa</b>	31,7	5,5	-
<b><math>\beta</math>-glucuronidasa</b>	-	88,9	2,5

#### Ejemplo 4: Ido-BR1 anula la inflamación 24 h después de la estimulación en un modelo *in vitro*

Se ensayó la eficacia de ido-BR1 como agente antiinflamatorio en un modelo de inflamación de la mucosa. El modelo utilizado se optimizó y se estableció previamente (DM Nash, E A. Lane, S Herath e IM Sheldon (2008) Endometrial Explant Culture for Characterizing Equine Endometritis. American Journal of Reproductive Immunology. 59: 105-117). El modelo está compuesto por un sistema de cultivo de tejido de explante endometrial equino *in vitro*. Existen varias ventajas de usar tejido uterino recogido de caballos: área de superficie uterina grande para cosechar abundante tejido que permite varios tratamientos y replica en un solo experimento (asegura robustez estadística); directamente representativo de la inflamación clínica de todo el animal en el caballo (la inflamación uterina es una causa importante de subfertilidad), e indirectamente de otras especies (por ejemplo, bovinos y seres humanos) e inflamación en otras superficies de la mucosa (por ejemplo, intestino y pulmón).

Se recogió tejido uterino de yeguas en un matadero, se diseccionó la superficie endometrial (mucosa), se homogeneizó y se colocó en cultivo como explante. Para estimular la inflamación sinónima de lo que ocurre con la infección uterina natural en todo el animal, se añadió el antígeno O de *E. coli*, lipopolisacárido (LPS), a los explantes cultivados. La inflamación se indicó midiendo la secreción de un marcador establecido de inflamación, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ), por explantes de los medios de cultivo. La secreción de PGF $_{2\alpha}$  se mide 24 y 72 h después de la estimulación con LPS para representar la respuesta inmune innata y crónica, respectivamente.

Los explantes se trataron con control (solo medio) o, para determinar si ido-BR1 afectaba a la PGF $_{2\alpha}$  espontánea, 0,5, 25 o 100  $\mu$ g/ml de ido-BR1 solo. Con el fin de ensayar la capacidad de ido-BR1 para anular la respuesta inflamatoria, los explantes se trataron con 3,0  $\mu$ g/ml de LPS solo, o 3,0  $\mu$ g/ml de LPS en presencia de 0,5, 25 o 100  $\mu$ g/ml de ido-BR1. La secreción de PGF $_{2\alpha}$  se midió 24 y 72 h después de aplicar los tratamientos. Los explantes se recogieron de 4 animales diferentes (n = 4) y cada tratamiento se realizó usando explantes cultivados por triplicado para cada animal.

Veinticuatro horas después del tratamiento, los explantes que se expusieron a la ido-BR1 en solitario (sin LPS) secretaron concentraciones de PGF $_{2\alpha}$  que eran similares (no significativamente diferentes) al control. Por lo tanto, el propio ido-BR1 no estimuló inadvertidamente la inflamación en los explantes. Los explantes tratados con LPS en solitario secretaron concentraciones de PGF $_{2\alpha}$  que fueron significativamente mayores que las del control, lo que indicaba que la inflamación fue estimulada por LPS. Los explantes que se trataron con LPS e ido-BR1 secretaron al mismo tiempo concentraciones de PGF $_{2\alpha}$  que no fueron significativamente diferentes al control.

Por lo tanto, ido-BR1 anuló la inflamación en los explantes. La anulación de la inflamación por ido-BR1 se produjo de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, el efecto, aunque muestra un patrón similar, no fue significativo en 72 h.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la producción de una composición que comprende ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
  - 5 (a) proporcionar material vegetal a partir de una fuente botánica que comprende plantas del género *Cucumis*;
  - (b) extraer ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico de dicho material vegetal; y después
  - 10 (c) formular dicho ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico con un excipiente o vehículo cosmética, nutracéutica o farmacéuticamente aceptable para producir una composición cosmética, nutracéutica o farmacéutica.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la fuente botánica comprende plantas de la especie *Cucumis sativus*.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la fuente botánica comprende un fruto.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la fuente botánica comprende pepinos.
- 20 5. El proceso de la reivindicación 4, en el que la fuente botánica comprende pepinos de plantas de la especie *Cucumis sativus*.
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico extraído está presente en la composición a un nivel de al menos: 1 % p/p, 5 % p/p, 10 % p/p; 15 % p/p; 20 % p/p; 25 % p/p; 30 % p/p; 35 % p/p; 40 % p/p; 45 % p/p; 50 % p/p, 60 % p/p, 70 % p/p, 80 % p/p, 90 % p/p, 99 % p/p (en base al peso seco).
- 25 7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-5, en el que el ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico extraído está presente en la composición a un nivel de hasta el 5 % p/p (en base al peso seco).
- 30 8. El proceso de la reivindicación 7, en el que el ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico extraído está presente en la composición a un nivel de hasta el 1 % p/p (base en peso seco).
- 35 9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la etapa de controlar la calidad de dicha composición detectando la presencia o ausencia o midiendo la cantidad de ácido (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxipiperidin-2-carboxílico en una muestra de dicha composición.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición de la etapa
- 40 (c) es una composición cosmética.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición de la etapa (c) es una composición nutracéutica.
- 45 12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición de la etapa (c) es una composición farmacéutica.