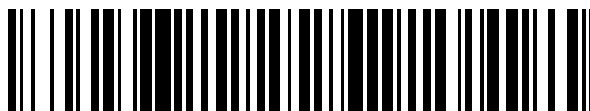


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 278**

51 Int. Cl.:

C07H 19/044 (2006.01)

C07H 7/04 (2006.01)

A61K 36/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2014 PCT/DK2014/050221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2014 E 14757837 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2859007**

54 Título: **Composiciones de alcaloides de la especie Ribes para tratar afecciones asociadas con la función mitocondrial o inhibición de pDE4, PDE5 e IKK-BETA**

30 Prioridad:

14.07.2013 DK 201300427

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

30.07.2019

73 Titular/es:

**OLLE SVENSSONS PARTIAFFÄR AB (50.0%)
P.J. Rösjös Väg 110-2
293 40 Olofström, SE y
TRENSUMS A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SLOTH WEIDNER, MORTEN y
SLOTH WEIDNER, IDA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 721 278 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).

DESCRIPCION

Composiciones de alcaloides de la especie *Ribes* para tratar afecciones asociadas con la función mitocondrial o inhibición de pDE4, PDE5 e IKK-BETA

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo alcaloide derivado de *Ribes* seleccionado preferiblemente entre *Ribes Rubrum* y *Ribes nigrum*; y sus aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas.

Antecedentes de la invención

La comunidad global se enfrenta a un serio desafío con la creciente carga de enfermedades relacionadas con el estilo de vida como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (CVD). La unión de DM2 y CVD es el síndrome metabólico. El síndrome metabólico se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo que incluyen dislipidemia aterogénica, obesidad abdominal, presión sanguínea elevada, resistencia a la insulina ± intolerancia a la glucosa, un estado proinflamatorio y un estado protrombótico [Scott 2004, *Circulation*; 109: 433-438]. La American Heart Association define el síndrome metabólico como la combinación de dislipidemia, obesidad abdominal, hipertensión, y resistencia a la insulina, una constelación de trastornos que ofrecen un riesgo cardiovascular mucho mayor que cualquiera de sus componentes individuales [Grundy 2004, *Circulation*; 109:433-438].

Las CVD son la causa de muerte principal globalmente: cada año mueren más personas por CVD que por cualquier otra causa. Se estima que en 2008 murieron a causa de la CVD 17,3 millones de personas, lo que representa el 30% de todas las muertes globales. De estas muertes, aproximadamente 7,3 millones se debieron a enfermedad cardíaca y 6,2 millones se debieron a una apoplejía. Para 2030, casi 23,6 millones de personas morirán de CVD, principalmente por enfermedades cardíacas y apoplejías. Se proyecta que éstas sigan siendo las causas de muerte principales [Hoja de información de la OMS N° 317, Septiembre de 2011]. La CVD se asocia con dislipidemia que lleva a la formación de placas arteriales que forman la base de la enfermedad cardíaca coronaria y la apoplejía. De los 346 millones de personas con diabetes en el mundo, el 90% tiene DM2. En 2004, se estima que murieron 3,4 millones de personas por las consecuencias del alto nivel de azúcar en sangre. La OMS proyecta que las muertes por diabetes se duplicarán entre 2005 y 2030 [Hoja de información de la OMS N° 312, agosto de 2011]. La DM2 se caracteriza por la resistencia a la insulina y niveles de azúcar en sangre aumentados y está altamente asociada con la CVD [Moller 2001, *Nature*; 414, 821-27]. Ahora se está prestando más y más atención a la dislipidemia aterogénica combinada que se presenta típicamente en pacientes con DM2 y síndrome metabólico.

Un tratamiento fundamental de la CVD así como de la DM2 es la reducción del colesterol en sangre, especialmente el LDL. Los tratamientos para la dislipidemia incluyen estatinas, fibratos, inhibición de la absorción de colesterol, inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado, aumento de la excreción de colesterol e inhibición de la liberación de ácidos grasos libres [Bhatnagar 2008, *BMJ*; 337:503-8]. Tales tratamientos existentes están asociados con una serie de efectos adversos que incluyen dolor muscular y daños que pueden ser potencialmente mortales (rabdmiolisis), así como asociados con daño hepático y efectos secundarios gastrointestinales. Consecuentemente, existe una gran necesidad de principios terapéuticos eficaces adecuados para su aplicación en la población más amplia.

El proceso de curación de heridas es complejo y dinámico, restaurando estructuras celulares y capas de tejido. Las heridas agudas son o traumáticas o quirúrgicas y se mueven a través del proceso de curación a un ritmo predecible desde el trauma hasta el cierre. Las heridas no curativas o crónicas son heridas complejas que no progresan a través de las fases habituales de curación. En las heridas no curativas, se producen cambios dentro del entorno molecular de una herida crónica que no son propicios para la curación, como niveles altos de citoquinas inflamatorias y niveles bajos de factores de crecimiento. Estos cambios terminan el proceso de curación y aumentan el potencial de infecciones bacterianas. Abordar los problemas que podrían ser responsables de los cambios fisiológicos de la herida puede reiniciar la curación y disminuir el riesgo de complicaciones adicionales, y una curación de la herida más rápido disminuye el tiempo de exposición a bacterias y las infecciones posteriores.

El tratamiento de varios tipos de heridas representa una carga enorme para los sistemas de atención médica y los pacientes en todo el mundo y un desafío terapéutico inmenso debido a la falta de un tratamiento eficaz para las heridas crónicas.

Solo en los Estados Unidos se realizaron 71,5 millones de procedimientos quirúrgicos en el 2000. Las heridas agudas no curadas están abiertas a agentes infecciosos y la infección se produce en aproximadamente el 10% de las heridas quirúrgicas, haciendo generalmente ventajoso una curación de heridas más rápida. Además, muchos pacientes quirúrgicos son obesos o tienen enfermedades crónicas que provocan una curación deficiente de la herida, lo que crea una gran necesidad de una curación de heridas mejoradas. Una carga adicional de la cicatrización de heridas agudas es el desafío de las cicatrices que pueden tener consecuencias funcionales,

estéticas y psicológicas duraderas para el paciente. Una cicatriz representa la suma de la lesión, el proceso reparativo y las intervenciones posteriores para mejorar el proceso de cicatrización. Las cicatrices tanto normales como hipertróficas siguen siendo difíciles de tratar e imposibles de prevenir y hay una gran necesidad de principios terapéuticos que avancen la curación de heridas sin cicatrices problemáticas.

5 Las heridas crónicas que no curan representan una epidemia silenciosa que afecta a una gran parte de la población mundial y representa una gran amenaza para la salud pública. Solo en los Estados Unidos, las heridas crónicas afectan a 6,5 millones de pacientes. En los países escandinavos, los costos asociados representan el 2-4% del total de los gastos de atención médica. Los tipos de heridas crónicas principales son las úlceras diabéticas, las
10 úlceras por presión y las úlceras venosas.

Se estima que hay más de 7,4 millones de úlceras por presión en el mundo donde la estimación fue posible, es decir, excluyendo el gran número de países en desarrollo. Durante las dos primeras semanas de ingreso, las
15 úlceras por presión adquiridas en el hospital ocurren en aproximadamente el 9% de los pacientes hospitalizados y tienen lugar casi 60.000 muertes anualmente en los Estados Unidos por úlceras por presión adquiridas en el hospital. Las úlceras por presión pueden ser una fuente principal de infección y llevar a complicaciones como septicemia, osteomielitis, e incluso la muerte. La curación de las úlceras por presión lleva mucho tiempo y son costosas de tratar y requieren mucho tiempo.

20 Se estima que hasta el 25% de todos los diabéticos desarrollarán una úlcera del pie diabético y se estima que el 12% de las personas con una úlcera de pie requerirán amputación. Se realizaron aproximadamente 71.000 amputaciones no traumáticas de extremidades inferiores en los Estados Unidos en personas con diabetes en el 2004. El tratamiento de las úlceras del pie diabético a menudo es una tarea especializada y representa un gran desafío no resuelto en el cuidado de heridas moderno.

25 Las úlceras venosas representan el 70%-90% de las úlceras que se encuentran en la parte inferior de la pierna. Las ulceraciones venosas de la pierna presentan un problema común y recurrente en las personas mayores, creando malestar y angustia para el paciente y un gran costo para los servicios de atención médica. En individuos de 65 años o más, las úlceras venosas de la pierna afectan aproximadamente al 1,69% de la población. Hasta un tercio de los pacientes tratados experimentan cuatro o más episodios de recurrencia. El tratamiento principal incluye el
30 cuidado local de las heridas y la terapia de compresión continua mediante vendaje realizado por personal cualificado o por medias de compresión graduadas. Sin embargo, la terapia de compresión está contraindicada en aquellas personas con enfermedad arterial oclusiva, requiere un personal cualificado para aplicar los vendajes de compresión y el cumplimiento del paciente con las medias de compresión suele ser pobre.

35 Hay disponibles muchos agentes tópicos para mejorar el entorno de curación de heridas. El desbridamiento de heridas elimina el tejido desvitalizado y los desechos acumulados e incluye irrigación, desbridamiento por escisión, desbridamiento enzimático y desbridamiento biológico con terapia con gusanos. La terapia tópica incluye terapia de oxígeno hiperbárico, terapia para heridas de presión negativa, aplicación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, preparaciones tópicas con antisépticos y antimicrobianos, como yodo, clorhexidina, plata y antibióticos. Se usan varios vendajes para heridas para controlar el nivel de humedad en y alrededor de la
40 herida, incluyendo vendajes de gasa, gasa de malla fina impregnada con petróleo, cera de parafina u otras pomadas, películas, espumas, alginatos, hidrocoloides, hidrogeles y vendajes hidroactivos. Debido a la naturaleza misma de los tratamientos tópicos, estos abordan solo los aspectos superficiales de la curación de heridas y han demostrado ser insuficientes para un tratamiento eficaz. No se dispone de terapia oral eficaz que mejore la curación de heridas. Por lo tanto, hay una gran necesidad para un tratamiento oral eficaz que promueva la curación de
45 heridas desde el interior.

50 Para promover la curación de heridas desde el interior, pueden abordarse varios aspectos del proceso de curación de heridas. La curación se explica tradicionalmente en términos de 4 fases superpuestas: hemostasis, inflamación, proliferación y maduración. Durante la hemostasis, las plaquetas desempeñan un papel crucial en la formación de coágulos y en el aspecto inflamatorio inicial de la curación de tejidos secretando citoquinas y quimioquinas inflamatorias que posteriormente atraen a los leucocitos y macrófagos al sitio de la lesión. Estas
55 células desbridan el tejido lesionado y segregan proteasas, citoquinas y factores de crecimiento que propagan diversos aspectos de la curación. Durante la fase proliferativa, se produce epitelización, fibroplasia y angiogénesis, formando tejido de granulación, que incluye células inflamatorias, fibroblastos y neovascularización en una matriz de fibronectina, colágeno, glicosaminoglicanos, y proteoglicanos. Finalmente, durante la fase de maduración, el colágeno forma enlaces cruzados estrechos con otras moléculas de colágeno y de proteína, lo que aumenta la resistencia a la tracción de la cicatriz. Todo el proceso de curación de la herida es altamente complejo y los eventos celulares que llevan desde la herida abierta hasta la formación de cicatrices se superponen. Un suministro rico de sangre es vital para mantener el tejido recién formado y la angiogénesis es un aspecto clave de la curación de
60 heridas. Implica la liberación de numerosas moléculas angiogénicas, entre las cuales el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) secretado por los macrófagos y las células epidérmicas es crítico para la angiogénesis.

65

En relación con la curación de heridas, la inhibición de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) es una estrategia terapéutica muy prometedora. El cAMP es un segundo mensajero involucrado en la producción de citoquinas de células inflamatorias, en la angiogénesis y en las propiedades funcionales de los queratinocitos, todos ellos relevantes en el proceso de curación de heridas. Los niveles intracelulares de cAMP están determinados por las actividades de la adenilato ciclasa que sintetiza cAMP a partir de ATP y PDE4, que hidroliza cAMP a AMP. La PDE4 se expresa en una variedad de células incluyendo células inflamatorias, células del músculo liso, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos [Bäumer 2007, *Inflamm Allergy Drug Targets*, Mar; 6(1):17-26], todos los cuales están presentes en la piel.

Los efectos del cAMP son transducidos por dos receptores de cAMP intracelulares expresados de forma ubicua, la proteína quinasa A (PKA) y la proteína de intercambio activada directamente por cAMP (EPAC) [Whittmann 2013, *P. Dermatol Ther*, 27 de abril;3(1):1-15]. Se ha demostrado que la vía de señalización de cAMP/PKA promueve la formación de brotes y tubos de células endoteliales [Aslam 2013, *Acta Physiologica*; 207(694): O10] y cAMP actúa como un segundo mensajero en la liberación de VEGF, mediado por la prostaglandina E2 (PGE2) a través de la vía de señalización de cAMP/PKA [Ikari 2013, *Am J Respir Cell Mol Biol*, octubre; 49(4):571-81]. Se ha demostrado que la activación de Epac a través de la vía de señalización de cAMP/Epac atenúa la hiperpermeabilidad inducida por trombina en células endoteliales [Aslam 2013, *Acta Physiologica* 2013; 207(694):O10]. Las células progenitoras endoteliales (EPC) están involucradas centralmente en la angiogénesis en la regeneración de la vasculatura y el reclutamiento de estas células está mediado en parte por un gradiente hipóxico en la herida que estimula a las células epidérmicas para mejorar la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor derivado de células estromales 1 α (SDF-1 α) y VEGF [Ceradini 2004, *Nat Med*, agosto; 10(8):858-64], [Tepper 2005, *Blood*, febrero 1; 105(3):1068-77] que, posteriormente, movilizan las EPC de la médula ósea a los sitios isquémicos. En condiciones hipóxicas, como en las heridas, las EPC se estimulan para formar agrupaciones celulares organizadas, que luego forman estructuras vasculares tipo cordón que se canalizan y se conectan a los vasos existentes.

En las heridas crónicas, el proceso de angiogénesis se ve deteriorado, lo que resulta en la formación de tejido de granulación defectuosa, lo que eventualmente provoca fallo del progreso de la curación de la herida a través de la fase de proliferación. Por ejemplo, las heridas diabéticas se caracterizan por una curación de la herida deteriorada asociada con una disminución de la angiogénesis y la expresión de VEGF en la herida [Bitto 2013, *Clin Sci, Dec*; 125(12):575-85], [Gu 2013, *Diabetes Res Clin Pract*; octubre; 102(1):53-9], [Asai 2006, *J Invest Dermatol*, mayo; 126(5):1159-67] y se ha demostrado que el VEGF tópico induce una reparación significativamente acelerada en heridas experimentales en ratones diabéticos y la aplicación exógena de VEGF puede aumentar la angiogénesis temprana y la resistencia a la tracción en las heridas isquémicas en ratas [Sinno 2013, *Plast Surg Int*;2013:1-7]. La inhibición de la fosfodiesterasa-4 aumenta la producción de VEGF en el fibroblasto de pulmón humano inducida por la prostaglandina E2 [Ikari 2013, *Am J Respir Cell Mol Biol*, octubre; 49(4):571-81] y la administración tópica de fosfato de sodio N-6,20-O-dibutilil adenosina-30,50-cíclico (DBcAMP), un análogo estabilizado del cAMP en heridas diabéticas mejora significativamente la cicatrización de heridas [Asai 2006, *J Invest Dermatol*, Mayo; 126(5):1159-67]. Por lo tanto, es muy probable que la inhibición de PDE4 pueda aumentar la secreción de VEGF local y promover la curación de heridas, en particular la curación de heridas deteriorada.

Otro factor importante en la fase de granulación es el factor derivado de células estromales (SDF)-1 α . El SDF-1 α desempeña un papel crítico y multifacético en el proceso de curación de heridas tanto en entornos normales como diabéticos. Es un factor quimiotáctico que regula la migración de las EPC y la angiogénesis. Por lo tanto, la regulación por incremento de SDF-1 α mejora la curación de heridas [Nakamura 2013, *Biomaterials*, Dec; 34(37):9393-400] y los niveles reducidos de SDF-1 α deterioran la curación al disminuir la migración celular y la angiogénesis. Las heridas diabéticas son deficientes en SDF-1 α y aumentar el nivel de SDF-1 α aumenta la curación de las heridas diabéticas [Bitto 2013, *Clin Sci,Dec*;125(12):575-85],[Bermudez 2011, *J Vase Surg*;53:774-84]. La elevación de cAMP por la administración local de DB-cAMP en heridas diabéticas ha demostrado que aumenta la transcripción y producción de SDF-1 α por macrófagos y células mesenquimales y acelera significativamente la cicatrización de heridas [Asai 2006, *J Invest Dermatol*, Mayo;126(5):1159-67].

La proliferación de células basales epidérmicas es otro aspecto clave de la curación de heridas. El cAMP ha sido considerado durante mucho tiempo como un segundo mensajero y un regulador de la proliferación de queratinocitos humanos. La señalización de cAMP regula la proliferación de queratinocitos modulando la actividad de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Se ha demostrado que DBcAMP promueve la producción de factor de crecimiento transformante β por queratinocitos y fibroblastos, así como la proliferación y migración de queratinocitos [Zhou 2000, *Br J Dermatol*, septiembre; 143(3):506-12], [Onuma 2001, *Arch Dermatol Res*, marzo; 293(3):133-8], [Iwasaki 1994, *J Invest Dermatol*, junio; 102(6):891-7] y acelera la curación y la reepitelización de heridas de espesor completo [Balakrishnan 2006, *Biomaterials*, marzo; 27(8):1355-61]. De manera similar, la elevación de cAMP por la inhibición de PDE4 puede aumentar por tanto la epitelización en el proceso de curación de heridas.

La PDE4 se expresa en células tales como células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos [Baumer 2007, *Inflamm Allergy Drug Targets*, Mar;6(1):17-26] que están presentes en el lecho de la herida durante la curación de la

herida. Se ha demostrado que la aplicación tópica de un inhibidor de PDE4 ejerce efectos antiinflamatorios con expresión reducida de citoquinas y moléculas de adhesión [Ishii 2013, J Pharmacol Exp Ther, julio; 346(1):105-12]. Se ha demostrado que la administración tópica de DBcAMP, otra forma de aumentar la cAMP local, reduce significativamente el edema inflamatorio en el modelo de edema de oído inducido con ácido araquidónico en ratones [Rundfeldt 2012, Arch Dermatol Res, febrero 3(304):313-317]. El papel de los efectos antiinflamatorios provocados por la inhibición de PDE4 en el apoyo a la curación de heridas puede ser más pronunciado en heridas crónicas donde la inflamación crónica es una faceta importante del estado de no curación de la herida y la disminución de la inflamación se asocia con una mayor curación de la herida [Eming 2007, J Invest Dermatol, Mar; 127(3):514-25]. Por lo tanto, la modulación de mediadores pro-inflamatorios por la inhibición de PDE4 puede añadirse a los efectos de curación de heridas ejercidos por la inhibición de PDE4 a través de la propagación de la angiogénesis y la epitelización mejorada.

En conclusión, la señalización de cAMP está involucrada en la regulación de varias funciones de importancia para la curación de heridas incluyendo la angiogénesis, la inflamación y la epitelización. La elevación del cAMP a través de la inhibición de PDE4 es por lo tanto una estrategia terapéutica altamente relevante para la mejora de la curación de heridas agudas y crónicas mediante la modulación de mediadores proinflamatorios, la propagación de la angiogénesis y la epitelización mejorada.

En relación con la curación de heridas mejorada, la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) es otra estrategia terapéutica altamente prometedora. La PDE5 es una fosfodiesterasa capaz de degradar cGMP a 5'-GMP, inhibiendo de este modo la actividad de cGMP. La inhibición de la PDE5 evita la degradación de cGMP, mejorando y/o prolongando de este modo sus efectos. cGMP es un segundo mensajero que puede sintetizarse como resultado de la activación del óxido nítrico (NO) de la guanilil ciclasa soluble. Está involucrado en varios procesos fisiológicos a través de la activación de la proteína quinasa G (PKG). La conversión de cGMP a 5'-GMP por PDE5 inhibe eficazmente la señalización NO/cGMP, mientras que la inhibición de PDE5 restaura la señalización NO/cGMP. NO es un radical pequeño, formado por el aminoácido L-arginina por tres isoformas distintas de sintasa de óxido nítrico. La isoforma inducible (iNOS) se sintetiza en la fase temprana de la curación de heridas por células inflamatorias, principalmente macrófagos. Sin embargo, muchas células participan en la síntesis de NO durante la fase proliferativa después de la herida. Los efectos beneficiosos del NO se han demostrado repetidamente en la curación de heridas, y pueden actuar a través de varios mecanismos que también incluyen vasodilatación, captación de los componentes del estrés oxidativo, mejora de la angiogénesis y promoción de la proliferación de células endoteliales [Farsaei 2012, J Pharm Pharmaceut Sci; 15(4):483-498]. El NO sirve como un mediador importante que regula la expresión y proliferación de genes en los queratinocitos, la regulación de la migración de los fibroblastos y la deposición de colágeno en el tejido herido [Han et al 2012, Am J Pathol, abril; 180(4):1465-73], [Frank et al 2002, Kidney International; 61:882-888]. Se demostró que el NO liberado a través de iNOS regula la formación de colágeno, la proliferación celular y la neutralización de la herida en modelos animales de curación de heridas [Witte 2002, Metabolism, octubre; 51(10):1269-73]. Por consiguiente, la protección y la mejora de la vía de señalización de NO-cGMP-PKG por inhibición de la conversión de PDE5 de cGMP es de hecho beneficiosa para la curación de heridas, como lo confirma la cicatrización de heridas significativamente mejorada con el inhibidor de PDE5 de Sildenafil en 15s estudios de animales diferentes y 2 estudios clínicos en humanos sobre heridas difíciles de curar [Farsaei 2012, J Pharm Pharmaceut Sci; 15(4):483-498]. Además, la inhibición de la PDE5 como estrategia para promover la angiogénesis ha demostrado en relación con el inhibidor de la PDE5 Vardenafil, que regula por incremento la expresión de la proteína de VEGF y aumenta la movilización de EPC en la sangre periférica y la médula ósea, contribuyendo a la neovascularización en un modelo de isquemia unilateral de extremidades posteriores en ratones [Sahara 2010, Arterioscler Thromb Vase Biol, julio; 30(7):1315-24]. Este descubrimiento está respaldado por los descubrimientos in vitro e in vivo de que las células progenitoras endoteliales expresan PDE5; que el inhibidor de la PDE5 tadalafil induce un aumento significativo en el número de EPC mediado por la expresión de CXCR4 aumentada, y que la terapia prolongada con inhibidores de la PDE5 en humanos aumenta la EPC circulante, lo que respalda la noción de una afectación del segundo sistema de mensajero cGMP en la liberación de EPC de la médula ósea y la reendotelización periférica mediada por EPC. [Foresta et al 2005, Int J Impot Res, julio-agosto; 17(4):377-80], [Foresta et al 2009, Clin Endocrinol, Sep;71(3):412-6], [Foresta et al. 2010, Curr Drug Deliv, Oct;7(4):274-82]. En conclusión, la inhibición de PDE5 ha demostrado convincentemente que es una estrategia terapéutica altamente relevante en relación con la mejora de la curación de heridas.

Otro objetivo terapéutico prometedor en la curación de heridas es la mitocondria. Las EPC son disfuncionales en condiciones diabéticas dando como resultado un deterioro de la circulación periférica y un retraso en la curación de las heridas. Se ha demostrado que la autofagia mitocondrial y el deterioro mitocondrial son inducidos en EPCs bajo condiciones de alto contenido de glucosa, vinculando de este modo las complicaciones cardiovasculares diabéticas, incluyendo la curación de heridas con las mitocondrias disfuncionales. Por lo tanto, la optimización de la función mitocondrial también podría mejorar la curación de heridas diabéticas [Kim 2014, Biol Pharm Bull; 37(7):1248-52].

En relación con los trastornos y afecciones inflamatorias, la inhibición de PDE4 e IkappaB quinasa β (IKK- β) son estrategias terapéuticas altamente prometedoras. La PDE4 es la enzima de degradación de cAMP predominante en una variedad de células inflamatorias que incluyen eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células T y monocitos, y

puede aumentar la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-17, IL-22 y IFN- γ , y disminuir los mediadores antiinflamatorios como IL-10. La inhibición de PDE4 da como resultado una elevación de cAMP en estas células, que a su vez regula por disminución la respuesta inflamatoria. Los efectos antiinflamatorios de los inhibidores de PDE4 han sido bien documentados tanto *in vitro* como *in vivo* y están mediados en parte a través de la PKA, pero también están asociados con Epac, que parece desempeñar un papel clave en la supresión de la inflamación no deseada [Parnell 2012, *Br J Pharmacol*; 166(2):434-46]. El inhibidor de PDE4 Apremilast tiene profundas propiedades antiinflamatorias en modelos animales de enfermedades inflamatorias, así como enfermedades inflamatorias crónicas humanas como la psoriasis y la artritis psoriásica. Reduce los procesos inflamatorios complejos e interfiere con la producción de leucotrieno B₄, sintasa de óxido nítrico inducible, metaloproteína de matriz y bloquea la síntesis de varias citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 23, CXCL9 y CXCL10 en múltiples tipos de células [Schett 2010, *Ther Adv Musculoskelet Dis*, octubre;2(5):271-8], respaldando la alta relevancia de la inhibición de la PDE4 en varias afecciones inflamatorias crónicas de la piel, las articulaciones, los pulmones y los intestinos, como la artritis, la psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades inflamatorias del intestino. De mayor relevancia para dirigir la PDE4, la deficiencia de PDE4 suprime la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo blanco y reduce la adiposidad, sugiriendo que los inhibidores de la PDE4 podrían tener utilidad en el tratamiento de la obesidad y para la supresión de la inflamación inducida por la obesidad en el tejido adiposo blanco [Ren 2009, *Endocrinology*; 150:3076-3082]. Se ha demostrado que los inhibidores de PDE4 específicos de cAMP aumentan el flujo de salida de colesterol mediado por apolipoproteína A-I (apoA-I) hasta el 80 y 140% en macrófagos de THP-1 humano y J774.A1 de ratón, respectivamente, concomitantes con una elevación de los niveles de cAMP y puede proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares movilizándolo el colesterol de las lesiones ateroscleróticas [Lin 2002, *Biochem Biophys Res Commun*, 18 de enero; 290(2):663-9]. La PDE4 regula los grupos de cAMP que afectan al estado de activación/fosforilación de AMPK y se ha demostrado que la inhibición de PDE4 activa AMPK [Omar 2009, *Cell Signal*, mayo; 21(5):760-6] [Park 2012, *Cell*, 3 de febrero;148(3):421-33]. AMPK es una serina/treonina quinasa fundamental que participa en la regulación de la glucosa, los lípidos así como en el metabolismo de las proteínas y el mantenimiento de la homeostasis energética. Estudios recientes demostraron que AMPK también puede inhibir la NF- κ B, suprimir la expresión de genes inflamatorios y atenuar las lesiones inflamatorias [Yao 2012, *Sheng Li Xue Bao*, 25 de junio; 64(3):341-5]. En el hígado, la activación de AMPK da como resultado una oxidación de los ácidos grasos mejorada así como una producción de glucosa reducida. El sistema AMPK puede ser en parte responsable de los beneficios para la salud del ejercicio y es el objetivo del fármaco antidiabético metformina. Es un actor clave en el desarrollo de nuevos tratamientos para la obesidad, la DM2 y el síndrome metabólico [Towler 2007, *Circ Res*, 16 de febrero; 100(3):328-41]. Por tanto, la inhibición de la PDE4 representa una estrategia terapéutica prometedora para mejorar las condiciones inflamatorias, así como las condiciones metabólicas.

La IKK- β es parte de la cascada de transducción de señales NF- κ B ascendente de la inflamación. La IKK- β fosforila la proteína I κ B e inhibidora dando como resultado la disociación de I κ B de NF- κ B. NF- κ B es ahora libre de migrar a los núcleos y activar la transcripción de una cascada de citoquinas proinflamatorias [Hacker 2006, *Sci. STKE*; 357:13]. La inflamación de bajo grado en diferentes tejidos está involucrada en trastornos metabólicos como DM2 y CVD. En la obesidad, la sobrecarga de ácidos grasos libres, la sobrecarga del retículo endoplasmático y los niveles de glucosa excesivos junto con la infiltración de macrófagos inflamatoria en la grasa visceral da como resultado inflamación crónica, activa la IKK- β , lo que lleva a un círculo vicioso de inflamación continua, inducción de resistencia a la insulina y producción de VLDL-triglicéridos y lipoproteínas mejorada. El resultado a nivel macrofisiológico es hiperglucemia e hipertrigliceridemia [Meshkani 2009, *Clinic Biochem*; 42 (13-14):1331-46], [Tsai 2009, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 296(6):G1287-98], [vDiepen 2011, *J Lipid Res*; 52:942-950], [Solinas, 2010, *J Lipid Res*; 24:2596-2611]. Se ha descubierto que la IKK- β sirve como un enlace molecular crítico entre la obesidad, la inflamación metabólica, y trastornos de la homeostasis de la glucosa. La IKK- β se activa por casi todas las formas de estrés metabólico que se han implicado en la resistencia a la insulina o la disfunción de los islotes. Además, la IKK- β tiene una participación crítica en la promoción de la obesidad inducida por la dieta, la inflamación metabólica, la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta. La hipertrigliceridemia está provocada por la acumulación de partículas de VLDL en el plasma como consecuencia de cambios en el metabolismo de los lípidos que están asociados con la obesidad. La acumulación de lípidos en numerosos tejidos está acompañada de un aumento de los procesos inflamatorios, como la infiltración de macrófagos y la producción de mediadores inflamatorios en el tejido adiposo blanco. En el hígado, la acumulación de grasa aumenta la actividad del NF- κ B proinflamatorio y la activación específica del hígado de NF- κ B induce alteraciones metabólicas [Cai 2005, *Nat Med*; 11:183-90], [Arkan, 2005, *Nat Med*; 11:191 -98]. Las citoquinas proinflamatorias pueden provocar hipertrigliceridemia y, a la inversa, la supresión de la inflamación puede reducir la hipertrigliceridemia [Goldfine 2008, *Clin Transl Sci*; 1:36-43], lo que sugiere un papel causal directo de las vías inflamatorias en el desarrollo de hipertrigliceridemia. La activación específica de las vías inflamatorias exclusivamente dentro de los hepatocitos induce hipertrigliceridemia y la vía IKK- β hepatocítica se ha identificado como un posible objetivo para tratar la hipertrigliceridemia. [Janna 2011, *J Lipid Res*; 52:942-50]. Además, se ha demostrado que la inhibición de IKK- β invierte la resistencia a la insulina [Minsheng 2001, *Science*, 31 de agosto; 293(5535):1673-7]; y la inhibición de la vía IKK- β mejora la degradación de apoB100 hepática, revelando enlaces importantes entre la modulación de la cascada de señalización mediada por IKK- β inflamatoria y la síntesis hepática y la secreción de lipoproteínas que contienen apoB100 [Tsai 2009, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, junio; 296(6):G1287-98]. Por tanto, la inhibición de IKK- β representa una

estrategia terapéutica prometedora para mejorar las condiciones inflamatorias así como la hipertrigliceridemia y las condiciones metabólicas.

Las mitocondrias son orgánulos en células eucariotas con su propio genoma que consumen oxígeno y sustratos para generar el ATP necesario para los procesos que demandan energía. En las células aeróbicas, la mayoría del ATP se produce por fosforilación oxidativa. En las mitocondrias, los electrones que se donan del ciclo de Krebs pasan a través de los cuatro complejos (complejo I-IV) que comprenden la cadena de transporte de electrones, reduciendo eventualmente el oxígeno y produciendo agua. El flujo de electrones crea un potencial electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz de las mitocondrias. Este potencial es utilizado por la ATP sintasa para fosforilar ADP produciendo ATP (fosforilación oxidativa). Las mitocondrias también participan en un amplio intervalo de otros procesos celulares, incluyendo la transducción de señales, la regulación del ciclo celular, la termogénesis y la apoptosis. Son orgánulos altamente dinámicos que se remodelan continuamente a través de la fisión, fusión, autofagia y biogénesis. La biogénesis mitocondrial es la expansión del contenido mitocondrial existente, ya sea a través del crecimiento de la red mitocondrial (aumento en la masa mitocondrial) o la división de mitocondrias preexistentes (incrementos en el número mitocondrial). La biogénesis mitocondrial se activa cuando la demanda de energía excede la capacidad respiratoria, por ejemplo, en respuesta al ejercicio, el estrés, la hipoxia, la disponibilidad de nutrientes, las hormonas incluida la insulina, la producción de oxígeno reactivo y la temperatura.

La capacidad respiratoria de reserva es la diferencia entre el ATP producido por la fosforilación oxidativa en la base y la de la actividad máxima. Bajo ciertas condiciones, un tejido puede requerir una explosión repentina de energía celular adicional en respuesta al estrés o al aumento de la carga de trabajo. Si la capacidad respiratoria de reserva de las células no es suficiente para proporcionar el ATP requerido, las células afectadas corren el riesgo de ser conducidas a la senescencia o a la muerte celular. El agotamiento de la capacidad respiratoria de reserva se ha correlacionado con una variedad de patologías incluyendo enfermedades cardíacas, trastornos neurodegenerativos y muerte celular en el músculo liso [Desler 2012, Journal of Aging Research; 2012:p1-9].

El coactivador 1 α del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) es ampliamente reconocido como un regulador principal de la biogénesis y la función mitocondrial y, por lo tanto, representa un objetivo terapéutico directo o indirecto muy interesante en relación con la modulación de la función mitocondrial. El PGC-1 α coactiva factores de transcripción que regulan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales y también del gen nuclear que codifica el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM), que regula la transcripción del ADN mitocondrial. Por tanto, el PGC-1 α regula la expresión coordinada de las proteínas mitocondriales codificadas en tanto los genes nucleares como los mitocondriales, activando una serie de factores de transcripción que incluyen la activación de los Factores Respiratorios Nucleares 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2) que regulan la transcripción de proteínas en la cadena respiratoria, la activación de PPAR- α que regula las enzimas para la oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación), la activación del factor de transcripción mitocondrial A que activa la expresión del genoma mitocondrial que lleva a la biogénesis mitocondrial, y la coactivación del factor de aumento de miocitos 2A (MEF2A) que lleva a una sensibilidad a la insulina aumentada mediante la translocación del transportador de glucosa a la membrana, lo que lleva a una captación de glucosa mejorada.

La activación de PGC-1 α se ha vinculado a la vía de señalización NO/cGMP que, por lo tanto, representa una estrategia altamente relevante para modular la función mitocondrial [Nisoli 2004, Proc Natl Acad Sci, 23 de noviembre; 101(47):16507-12] a través de la inhibición de la PDE5. La exposición a largo plazo a bajas concentraciones de NO induce la biogénesis mitocondrial mediada por cGMP, e implica una expresión aumentada de PGC-1 α , NRF-1 y factor de transcripción mitocondrial A. [Nisoli 2003, Science, 7 de febrero; 299(5608):896-9]. La biogénesis mitocondrial dependiente de NO/cGMP produce además mitocondrias funcionalmente activas, en términos de función respiratoria y actividad metabólica [Nisoli 2004, Proc Natl Acad Sci, 23 de noviembre; 101(47):16507-12]. Por lo tanto, la inhibición de PDE5, que da como resultado niveles de cGMP aumentados es un objetivo muy interesante para la estimulación de la biogénesis y la funcionalidad mitocondrial. Esto está respaldado por el descubrimiento de que los inhibidores de la fosfodiesterasa selectivos de cGMP estimulan la biogénesis mitocondrial en el tejido renal [Whitaker 2013, J Pharmacol Exp Ther, Diciembre;347(3):626-34] y la inhibición de PDE5 a corto plazo con el inhibidor de PDE5 Sildenafil ha demostrado que reduce la fatiga muscular y aumenta la síntesis de proteínas del músculo esquelético [Sheffield More et al 2013, Clin Transl Sci, Diciembre;6(6): 463-8].

Al igual que la inhibición de PDE5, la inhibición de PDE4 también se ha vinculado con la activación de PGC-1 α y con la estimulación de la biogénesis mitocondrial y la resistencia aumentada, aunque a través de diferentes vías. Por lo tanto, se ha demostrado que el inhibidor de PDE4 Rolipram induce la biogénesis mitocondrial y aumenta la expresión de PGC-1 α , además de inducir una distancia significativamente mayor en una cinta rodante antes del agotamiento en ratones tratados con Rolipram que en ratones de control [Park 2012, Cell, 3 de febrero 148(3):421-33].

Está bien establecido que el entrenamiento con ejercicios de resistencia induce grandes aumentos en las mitocondrias e incluso un único periodo de ejercicio induce un rápido aumento en la biogénesis mitocondrial que está mediada tanto por la activación como por la expresión aumentada de PGC-1 α [Hollzy 2011, Compr Physiol, abril; 1(2):921-40], [Hollsozy 2008, J Physiol Pharmacol, diciembre; 59 Suppl 7:5-18] [Bartlett 2012, J Appl Physiol,

abril; 112(7):1135-43]. La señalización de PGC-1 α controla la biogénesis mitocondrial y la angiogénesis en respuesta al ejercicio de resistencia en el músculo esquelético y se ha demostrado que PGC-1 α aumenta el rendimiento del ejercicio [Tadaishi et al 2011, PLoS ONE, diciembre, Vol. 6, Número 12:1-13] y, en gran medida, los cambios adaptativos en los músculos esqueléticos, como la transformación del tipo de fibra, la biogénesis mitocondrial, la angiogénesis, la sensibilidad mejorada a la insulina y la flexibilidad metabólica inducidas por el entrenamiento de resistencia están regulados por PGC-1 α [Lira 2010, Am J Physiol Endocrinol Metab, agosto; 299 (2):E145-61], [Calvo et al 2008, J Appl Physiol 2008 mayo; 104(5):1304-12]. Por lo tanto, aumentar la función mitocondrial y la biogénesis es una estrategia altamente relevante para mejorar el rendimiento del ejercicio y la resistencia en relación con el deporte.

El envejecimiento es un proceso biológico inevitable caracterizado por el deterioro progresivo de una variedad de funciones fisiológicas, lo que hace que la persona que envejece sea cada vez más frágil y susceptible a las enfermedades. El proceso de envejecimiento está vinculado a mitocondrias cada vez más disfuncionales por una disminución en la tasa de fosforilación oxidativa mitocondrial, aumento de la capacidad de las mitocondrias para producir ROS, y deterioro de la oxidación mitocondrial de sustratos específicos. Como resultado, estas alteraciones inducidas por la edad en la función mitocondrial deterioran la producción de energía y aumentan la producción de intermedios de oxígeno reactivos tóxicos [Marcovina 2013, Transl Res. Febrero;161(2):73-84]. La disminución de la capacidad mitocondrial relacionada con la edad para la fosforilación oxidativa y la acumulación de mutaciones del ADN mitocondrial se ha vinculado con la patogénesis de una serie de alteraciones patológicas relacionadas con la edad, incluyendo la alopecia, la osteoporosis, la cifosis, la cardiomiopatía, la anemia, la atrofia gonadal y la sarcopenia [Desler 2012, Journal of Aging Research, 2012:1-9], y la disfunción de las mitocondrias se ha vinculado con la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad, como la neurodegeneración, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.

Las reducciones en la función del músculo esquelético tienen lugar durante el transcurso de un envejecimiento saludable, así como con el reposo en cama o con diversas enfermedades como el cáncer, la distrofia muscular y la insuficiencia cardíaca. La fatiga muscular como síntoma de una función muscular reducida es un síntoma común durante las actividades deportivas y de ejercicio, pero también se observa cada vez más como un resultado secundario en muchas enfermedades y afecciones de la salud durante la realización de las actividades diarias. Sin embargo, no hay terapias farmacológicas aceptadas para mejorar la función deteriorada del músculo esquelético. Por lo tanto, dentro del músculo esquelético envejecido o sedentario, hay una pérdida significativa en el número de fibras y anomalías bioquímicas y morfológicas demostrables. Varios estudios a gran escala en biopsias de músculo esquelético en humanos de edades comprendidas entre 17 y 91 años han demostrado una disminución significativa relacionada con la edad en la capacidad respiratoria mitocondrial. La caída sustancial en la capacidad respiratoria mitocondrial en el envejecimiento muscular puede contribuir a la capacidad de ejercicio reducida en las personas mayores y el riesgo incrementado asociado de enfermedades asociadas con un estilo de vida cada vez más sedentario. Además, los cambios mitocondriales pueden subyacer no solo a la pérdida de la función muscular con la edad, sino también a otras patologías asociadas con la edad comunes que aumentan el riesgo de enfermedades como la infiltración de lípidos ectópicos, la inflamación sistémica y la resistencia a la insulina. [Desler 2012, Journal of Aging Research, 2012:1-9], [Scheibye-Knudsen et al. 2013, Aging, marzo, Vol.5, Nº 3:192-208], [Peterson et al 2012, Journal of Aging Research, p1-20], [Boffoli et al 1994, Biochim Biophys Acta., 12 de abril;1226(1):73-82]. Como se ha mencionado anteriormente, el PGC-1 α es un regulador clave de la biogénesis y la función mitocondrial, y se ha demostrado que el entrenamiento de por vida conserva el ADN mitocondrial y PGC-1 α mientras que el comportamiento sedentario de por vida reduce tales marcadores de contenido mitocondrial. Además, se ha demostrado que a pesar de la disfunción mitocondrial observada con el envejecimiento sedentario, los músculos de personas mayores sedentarias conservan la capacidad de activar las vías de señalización agudas asociadas con la regulación de los procesos tempranos de la biogénesis mitocondrial [Cobley 2012, Biogerontology. 13(6):621-631]. Por lo tanto, la mejora de la biogénesis y la función mitocondrial, por ejemplo, a través de la activación de PGC-1 α mediante la inhibición de PDE4 y PDE5 en ancianos, así como durante el reposo en cama o enfermedades o afecciones que perjudican la función muscular, es altamente relevante.

El sistema nervioso central es particularmente propenso a la disfunción mitocondrial y el aumento de la función mitocondrial puede desempeñar un papel fundamental en una variedad de trastornos del SNC. El agotamiento de la capacidad respiratoria de reserva de una neurona puede tener consecuencias fatales. Las neuronas en reposo utilizan aproximadamente el 6% de su capacidad respiratoria máxima, mientras que las neuronas activadas utilizan hasta el 80%. Por lo tanto, las disminuciones relacionadas con el envejecimiento sutiles en la capacidad respiratoria de reserva aumentan la vulnerabilidad neuronal hacia el agotamiento bioenergético, predisponiendo el tejido a enfermedades. Por lo tanto, las anomalías mitocondriales tienen lugar en personas con varias enfermedades neurodegenerativas y las anomalías mitocondriales distintas son características de trastornos particulares. Este es el caso de los trastornos relacionados con la edad comunes, como la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es un problema importante en la población de edad avanzada mundial, con más de 25 millones de personas afectadas por demencia, la mayoría de las cuales padecen la enfermedad de Alzheimer. Solo en los Estados Unidos, la enfermedad de Alzheimer afecta a aproximadamente 5,4 millones de personas y se proyecta que la cantidad alcance los 12-16 millones para el año 2050. En los Estados Unidos en 2011, el costo de la atención médica, la atención a largo plazo y los servicios de hospicio para las personas de 65 años de edad y

mayores con enfermedad de Alzheimer y otras demencias, se espera que sean 183 billones de \$. La evidencia creciente relaciona la enfermedad de Alzheimer con la disfunción mitocondrial. Los modelos de roedores de la enfermedad de Alzheimer neurodegenerativa muestran que la deficiencia en la respiración mitocondrial antecede a la patología de la enfermedad. La enfermedad de Alzheimer también va acompañada de la expresión y actividad reducidas de las enzimas implicadas en la bioenergética mitocondrial. Correspondientemente, una disminución del metabolismo cerebral es detectable en pacientes con enfermedad de Alzheimer tan pronto como una década antes del diagnóstico. Además de los cambios funcionales, la extensa bibliografía indica que también se alteran las dinámicas estructurales mitocondriales en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Otras enfermedades neurodegenerativas que también están vinculadas con la disfunción mitocondrial son la enfermedad de Parkinson, la degeneración de neuronas motoras ALS y la enfermedad de Huntington [Lezi 2012, Adv Exp Med Biol; 942:269-286],[Desler 2012, Journal of Aging Research;2012:1-9].

Ribes es un género de aproximadamente 150 especies de plantas con flores nativas en todas las regiones templadas del hemisferio norte. Habitualmente se trata como el único género de la familia *Grossulariaceae*. Las especies *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* se cultivan ampliamente debido a su producción de grosellas comestibles, grosellas negras, grosellas verdes y grosellas blancas. Se reconocen una variedad de subespecies y numerosos cultivares. Estas bayas tienen una utilidad generalizada en las industrias de alimentos y bebidas, por ejemplo, en forma de zumo.

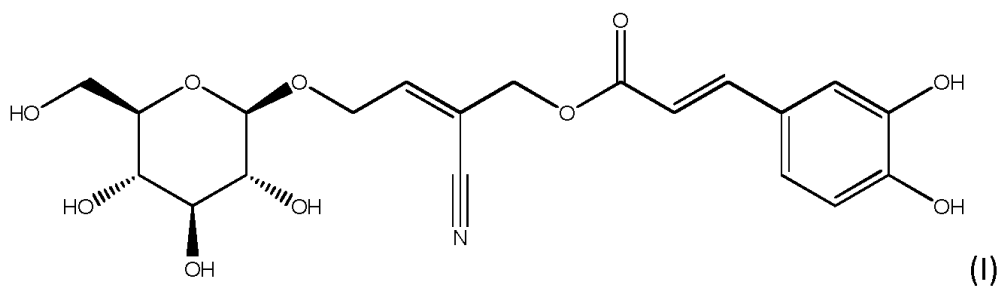
En 2002, Lu et al descubrieron los dos alcaloides de nitrilo *nigrumin-5-p-coumarate* [nombre sistemático (E)-(E)-2-ciano-4-(β-D-glucopiranosiloxi)but-2-en-1-il 3-(4-hidroxifenil)acrilato] y *nigrumin-5-ferulato* [nombre sistemático (E)-(E)-2-ciano-4-(β-D-glucopiranosiloxi)but-2-en-1-il 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato] en las semillas de *Ribes nigrum* [Lu 2002, Phytochemistry; 59(4):465-8].

En 2007, Schwartz et al descubrieron los dos alcaloides de nitrilo con los nombres sistemáticos (E)-2-ciano-4-(β-D-glucopiranosiloxi)but-2-en-1-il 4-hidroxi-3-metoxibenzoato y (E)-2-ciano-4-(β-D-glucopiranosiloxi)but-2-en-1-il '4-hidroxibenzoato junto con los alcaloides de indol con los nombres sistemáticos ácido 1-β-D-glucopiranosil-1H-indol-3-acético y éster metílico de ácido 1-β-D-glucopiranosil-1H-indol-3-acético, que se observó que contribuyen al sabor amargo de las grosellas rojas [Schwarz 2007, J Agric Food Chem;55:1405-1410].

Ninguno de los alcaloides encontrados en las especies *Ribes* mencionadas ha sido atribuido a ninguna propiedad medicinal.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de un nuevo alcaloide de nitrilo altamente bioactivo con el nombre sistemático (E)-(E)-2-ciano-4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)but-2-en-1-il 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato (en lo sucesivo denominado "Ribetril A"):



Los inventores han aislado el compuesto de varias especies de *Ribes*.

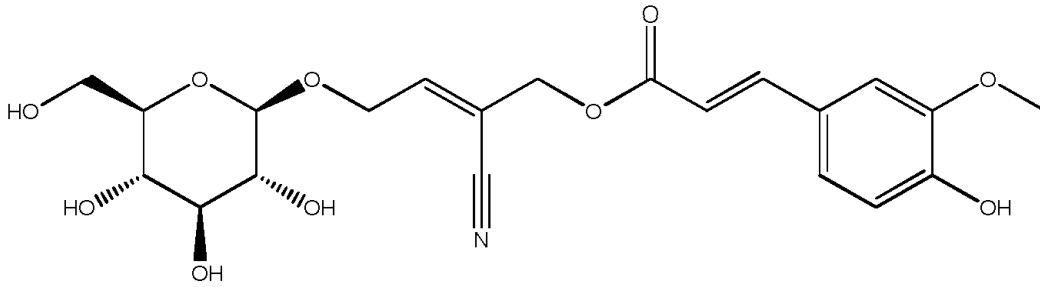
El nuevo alcaloide Ribetril A muestra una bioactividad sorprendentemente fuerte y, como se demuestra en el ejemplo 3, muestra una concentración activa 48 y 118 veces menor (IC-50) en comparación con los dos análogos estructurales conocidos con el mismo esqueleto de ácido fenil-acrílico.

La presente descripción se refiere además al sorprendente descubrimiento de que se pueden obtener fracciones de alcaloides altamente bioactivos de las bayas y hojas de *Ribes*, por ejemplo, *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum*. Tales fracciones de alcaloides que se pueden obtener de *Ribes* muestran fuertes efectos inhibidores sobre IKK-β, PDE4 y PDE5 in vitro a bajas concentraciones, como se demuestra en el ejemplo 3, el ejemplo 4 y el ejemplo 5. Además, los experimentos celulares han demostrado un efecto estimulante altamente sorprendente en la biogénesis mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva como se demuestra en los ejemplos 6, 7 y 8.

Además del Ribetril A, las fracciones de alcaloides bioactivos de la invención comprenden opcionalmente

los 4 alcaloides de nitrilo descritos anteriormente:

5

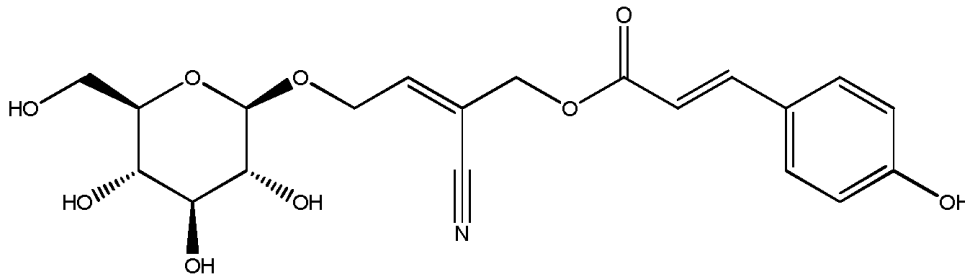


10

Nombre sistemático: (E)-(E)-2-ciano-4-(beta-D-glucopiranosilo)but-2-en-1-il 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato (en lo sucesivo denominado "Ribetril B")

15

20

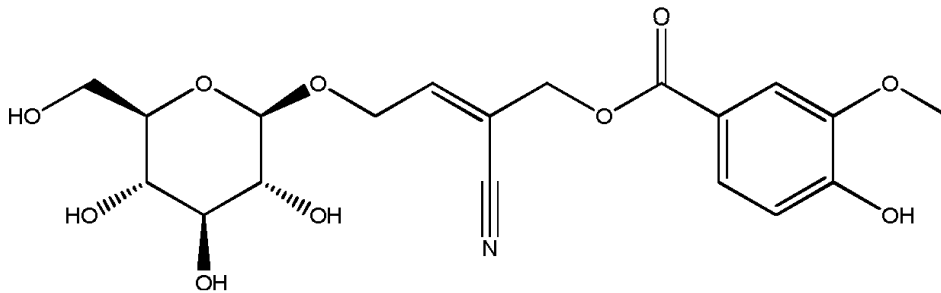


25

Nombre sistemático: (E)-(E)-2-ciano-4-(beta-D-glucopiranosilo)but-2-en-1-il 3-(4-hidroxi)fenil)acrilato (en lo sucesivo denominado "Ribetril C")

30

35

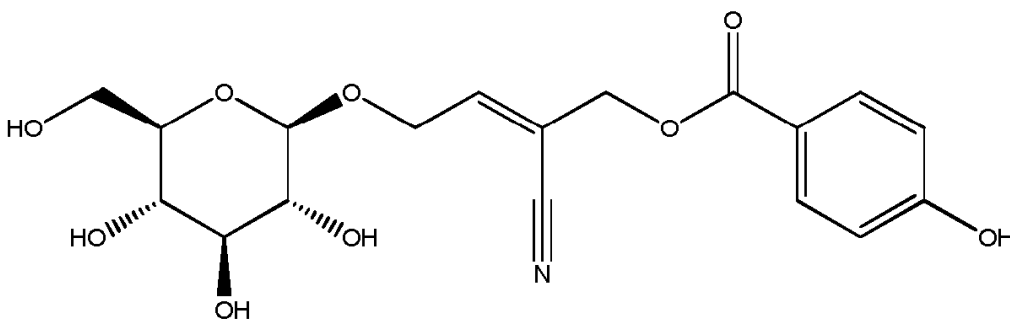


40

Nombre sistemático: (E)-2-ciano-4-(beta-D-glucopiranosilo)but-2-en-1-il 4-hidroxi-3-metoxibenzoato (en adelante denominado "Ribetril D")

45

50



55

Nombre sistemático: (E)-2-ciano-4-(beta-D-glucopiranosilo)but-2-en-1-il 4-hidroxi)benzoato (en lo sucesivo denominado "Ribetril E")

60

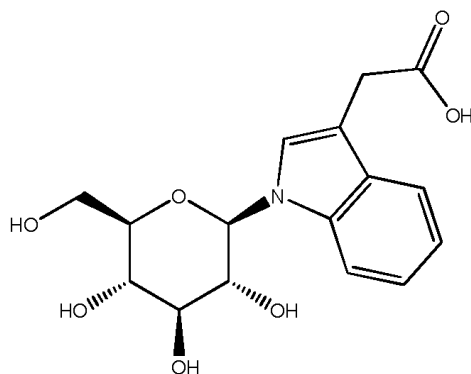
Además, las fracciones de alcaloides de la invención pueden comprender los siguientes alcaloides de indol descritos anteriormente:

65

5

10

15



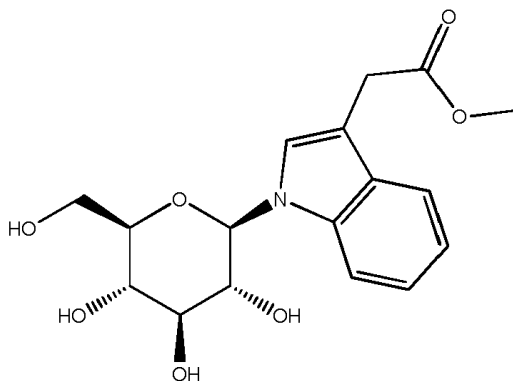
20

Nombre sistemático: ácido 2-(1-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-indol-3-il)acético (en lo sucesivo denominado "Glucoindol A")

25

30

35



40

A ninguno de estos alcaloides se la ha atribuido anteriormente efectos medicinales o efectos promotores de la salud. Como se demuestra en el ejemplo 1, los alcaloides están presentes solo en cantidades insignificantes en las bayas de *Ribes* en la forma natural, por ejemplo, típicamente 0-0,8 ppm de Ribetril A y 0,5-1,5 ppm de Ribetrilos A, B, C, D y E en total. Se encuentran niveles insignificantes similares de Glucoindoles, por ejemplo, típicamente 3,2-6,9 ppm.

45

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que tales fracciones alcaloides de *Ribes* tienen efectos promotores de la salud fuertes cuando se administran en cantidades suficientes a mamíferos *in vivo*, que los inventores conjeturan están relacionados con los efectos inhibidores anteriormente mencionados sobre IKK- β , PDE4 y PDE5, o el efecto estimulante sobre la biogénesis mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva.

50

Por consiguiente, los inventores han descubierto que las fracciones de alcaloides muestran fuertes propiedades de curación de heridas. Aunque los tratamientos existentes se aplican predominantemente de manera tópica, las fracciones de alcaloides de *Ribes* parecen ser agentes de curación de heridas sistémicos eficaces, sin descartar la aplicación tópica.

55

60

65

Esto se demuestra y confirma de manera convincente en el ejemplo 11, en el que una fracción alcaloide de *Ribes* administrada oralmente de la invención corresponde a una dosis diaria de 112 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetril A y 492 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetrilos total, así como 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Glucoindoles total proporcionó una curación significativamente más rápida de heridas por escisión cutáneas grandes en grupos de ratones en comparación con ratones de control tratados con vehículo en dos experimentos idénticos con un resultado muy similar. Tres días después de la lesión por escisión, el grado de cierre de la herida era de un 78% mayor en el grupo tratado con alcaloide de *Ribes* en comparación con el grupo tratado con vehículo y después de 5 días el grado de cierre de la herida era más del doble en el grupo tratado con alcaloide de *Ribes* en comparación al grupo tratado vehículo. En el primer experimento, el tiempo medio para cerrar la mitad de la herida fue de 5,9 días en el grupo tratado con alcaloide de *Ribes* en comparación con 8,3 días en el grupo de control. En el segundo experimento, el tiempo medio de cierre de media herida fue de 6,0 días en el

grupo tratado con alcaloide de *Ribes* en comparación con 8,2 días en el grupo de control tratado con vehículo. Todos estos efectos fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

En el ejemplo 12, se indicó una relación de respuesta a la dosis de los alcaloides de *Ribes* en la curación de heridas, ya que se comparó una preparación de alcaloides de dosis alta que proporciona una dosis diaria de 492 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetrilos total y 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Glucoindoles en comparación con una preparación de alcaloides que proporciona 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetrilos total, así como 97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Glucoindoles total. Después del pretratamiento, ambos grupos proporcionaron un efecto estadísticamente significativo en el tiempo medio para el cierre de media herida (7,1 días en la dosis alta y 7,9 días en la dosis baja en comparación con los 9,3 días en el grupo tratado con vehículo, lo que indica una relación de respuesta a la dosis).

En el ejemplo 13, se indicó un efecto potencialmente sinérgico de dos fracciones de *Ribes* diferentes, ya que una combinación 50/50 en peso de un concentrado derivado de *Ribes rubrum* (perfil químico dominado por glucoindol) y un concentrado derivado de *Ribes nigrum* (perfil químico dominado por Ribetril), realizó un efecto de curación de la herida aún más pronunciado (tiempo medio para el cierre de media herida 6,4 días) que los concentrados de alcaloides de *Ribes* individuales (el tiempo medio para el cierre de media herida de 7,2 días y 7,1 días) y el control del vehículo (tiempo medio para el cierre de media herida 7,9 días).

En el ejemplo 14, se demostró un efecto significativo de curación de heridas en un modelo de heridas crónicas en ratones diabéticos mediante dos formulaciones de alcaloides de *Ribes* diferentes.

En el ejemplo 15, se demostró que el efecto de curación de heridas de los extractos de alcaloides de *Ribes* administrados oralmente se puede encontrar a través de variaciones de especies y de género.

En el ejemplo 17, se demostró que también puede encontrarse un inicio impresionante rápido y un efecto de curación de heridas estadísticamente significativo en heridas agudas en un sujeto humano que sirve como su propio control y que recibe un producto nutritivo oral que comprende una fracción de alcaloide de *Ribes* como se prepara en el ejemplo 16. El grado de mejora de la curación de heridas fue comparable al efecto observado en los modelos de roedores.

Por tanto, los inventores han descubierto que los alcaloides de la invención pueden usarse como agentes de curación de heridas en heridas difíciles de curar tanto agudas como crónicas, y tienen la ventaja significativa de ser activos tras la administración oral. La curación de heridas más rápida de las heridas agudas es muy relevante, ya que el riesgo de infección y el desarrollo de heridas difíciles de curar disminuyen con el aumento de la velocidad de curación de la herida. Además, la curación más rápida de las heridas crónicas representa una solución muy buscada para el desafío del tratamiento principal y la enorme carga económica para el sistema de atención médica del tratamiento de las heridas crónicas..

En el ejemplo 9, se probó la composición de alcaloide de *Ribes* para un posible efecto hipocolesterolémico en cobayas hiperlipidémicas inducidas por una dieta alta en grasas. La fracción de alcaloide de *Ribes* a 112 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetril A y 492 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetrilos, así como 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Glucoindoles total y el compuesto de referencia positivo Atorvastatin a 10 mg/kg se administraron por vía oral una vez al día durante 28 días consecutivos. La sangre se extrajo los días 1 antes de la primera dosificación, 15 y 29 de animales en ayunas durante la noche para las mediciones de colesterol total en suero, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y niveles de triglicéridos. Sorprendentemente, después de solo 15 días, los animales tratados con alcaloide de *Ribes* mostraron una reducción del 32% de los niveles de triglicéridos ($P < 0,05$), que se incrementó aún más a una reducción del 50% después de 29 días de tratamiento en comparación con el grupo de control de vehículo ($P < 0,05$). Además, el grupo tratado con alcaloide de *Ribes* mostró una disminución del 40% del colesterol total en suero ($P < 0,05$) y una disminución del 39% de LDL ($P < 0,05$) después de 29 días de tratamiento, que fue del mismo orden de magnitud que el control positivo Atorvastatina. En conjunto, reduciendo tanto los niveles de triglicéridos como el colesterol total, la fracción de alcaloide de *Ribes* fue superior a la atorvastatina, que no mostró un efecto de disminución significativo en los niveles de triglicéridos. Esto es más probable debido al mecanismo de acción completamente diferente del alcaloide de la invención.

Los efectos de disminución de triglicéridos, LDL y colesterol total significativos se confirmaron de forma convincente en un sujeto humano como se demuestra en el ejemplo 19.

En el ejemplo 10, una composición de alcaloide de *Ribes* se probó para un posible efecto hipoglucémico en ratones BKS Cg-Lepr db/Lepr db, un modelo de diabetes mellitus no dependiente de la insulina. Se trataron grupos de 6-12 ratones con una dosis diaria de 112 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetril A y 492 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Ribetrilos, así como 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Glucoindoles totales de la fracción alcaloide de *Ribes* o 300 mg/kg del compuesto de referencia antidiabético positivo metformina durante 14 días consecutivos y se comparó con un grupo de control tratado con vehículo. Los niveles de glucosa en suero y la insulina en suero se midieron antes del tratamiento en el día 1, y a los 90 minutos después de la dosificación diaria en el día 7 y el día 14. El grupo tratado con composición alcaloide de *Ribes* mostró una reducción de glucosa en sangre similar a la metformina en el día 14 ($P < 0,05$) sin afectar a los niveles de insulina.

En el ejemplo 6, se probaron dos composiciones de alcaloides de *Ribes* para determinar su capacidad para mejorar la biogénesis mitocondrial en células musculares cultivadas. En este experimento, se demostró de manera convincente que 48 horas de incubación con las composiciones de alcaloides de *Ribes* aumentaron significativamente la biogénesis mitocondrial a concentraciones fisiológicamente relevantes. El aumento de la biogénesis mitocondrial en las células musculares es altamente relevante cuando se necesita una capacidad aumentada para manejar condiciones estresantes y/o la necesidad de energía alta en músculos que están trabajando, o cuando una disminución en la cantidad y función mitocondriales debido a la inactividad, enfermedad o edad está deteriorando la funcionalidad de las células musculares.

En el ejemplo 7 y 8, se probaron tres fracciones de alcaloides de *Ribes* para determinar su capacidad para aumentar la capacidad respiratoria de reserva en células musculares cultivadas. Sorprendentemente, se demostró que las fracciones alcaloides de *Ribes* RAP13, RAP14 y RAP15, aumentaron significativamente la capacidad respiratoria de reserva de las células C2C12 a concentraciones fisiológicamente relevantes cuando las células musculares cultivadas se expusieron a una prueba de estrés mitocondrial estandarizada. Esto es extremadamente interesante, ya que si la capacidad respiratoria de reserva de las células no es suficiente para proporcionar el ATP requerido, las células afectadas funcionarán de manera subóptima e incluso correrán el riesgo de ser llevadas a la senescencia o la muerte celular. Por lo tanto, una capacidad respiratoria de reserva aumentada en las células musculares es extremadamente valiosa para mejorar la resistencia en la función y la capacidad muscular, la resistencia al estrés así como contrarrestar los efectos de la senescencia y la inactividad.

Es cada vez más reconocido que las mitocondrias son una enrucijada principal en la regulación de muchos procesos fisiológicos importantes que pueden deteriorarse en condiciones patológicas si se ven comprometidos. Además, las mitocondrias representan la fase final en el metabolismo de producción de energía, transformando azúcares y lípidos en ATP. Los efectos combinados de las fracciones de alcaloides de *Ribes* tanto en la biogénesis mitocondrial como en la capacidad respiratoria de reserva ofrecen un método completamente nuevo para optimizar la función mitocondrial tanto en condiciones patológicas asociadas con mitocondrias disfuncionales, como en diversas áreas de mejora de la salud, deportes y rendimiento muscular, y condiciones que requieren energía. Además, la disfunción mitocondrial y la disminución de la capacidad respiratoria de reserva se han vinculado directamente con el deterioro de varias funciones fisiológicas durante el envejecimiento que llevan a alopecia, osteoporosis, cifosis, cardiomiopatía, anemia, atrofia gonadal y sarcopenia. Adicionalmente, el sistema nervioso central es un tejido con gran demanda de energía especialmente vulnerable a la disfunción mitocondrial y las disminuciones relacionadas con el envejecimiento en la capacidad respiratoria de reserva predisponen a este tejido a enfermedades. Por lo tanto, las disfunciones mitocondriales tienen lugar en pacientes con varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, donde es detectable una disminución del metabolismo cerebral tan pronto como una década antes del diagnóstico. Otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la degeneración de las neuronas motoras ALS y la enfermedad de Huntington también están vinculadas a la disfunción mitocondrial. Con respecto a todos estos deterioros y dolencias fisiológicas relacionadas con la edad, las fracciones de alcaloides de *Ribes* ofrecen un nuevo principio de intervención prometedor.

La aplicación de los alcaloides de *Ribes* y las fracciones de alcaloides en el campo del envejecimiento y la neurodegeneración está fuertemente respaldada por los ejemplos 23 y 27. En el ejemplo 23, el producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes* provocó una menor sensación de cansancio y fatiga en un hombre de 81 años durante el desempeño deportivo, incrementando su capacidad para continuar jugando tenis un 50% más bajo condiciones estandarizadas en comparación con antes de tomar la formulación de producto nutritivo de la fracción de alcaloides de *Ribes*. Esto indica un efecto de mejora significativo sobre la fatiga física y muscular relacionada con la edad por el producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*.

En el ejemplo 27, la fatiga física y mental continua que persistió inexorablemente durante el período de rehabilitación de una mujer de 75 años que sufrió una hemorragia cerebral traumática, se redujo drásticamente a la semana de tomar el producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*. Esto indica una contribución importante a la mejora y normalización del funcionamiento del sistema nervioso central por el producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*, lo cual fue muy significativo ya que el sujeto pudo reanudar sus rutinas y actividades diarias a un nivel comparable a su capacidad previa con una velocidad asombrosa.

En base a la sólida evidencia existente de que mejorar la biogénesis y la función mitocondrial es un aspecto clave para optimizar la resistencia y el rendimiento deportivo, es obvio que el rendimiento notablemente mejorado en tres sujetos de pruebas atléticas en los ejemplos 24, 25 y 26 puede atribuirse a la biogénesis mitocondrial mejorada y la capacidad respiratoria de reserva obtenida en las células musculares como se demuestra en los ejemplos 6, 7 y 8 y que las composiciones de alcaloides de *Ribes* pueden aplicarse en el manejo oral para mejorar aspectos altamente relevantes de la fisiología muscular en relación con la resistencia y el rendimiento deportivo. Esto está fuertemente respaldado por el ejemplo 24, en el que un nadador atleta masculino de 16 años después de 14 días de tomar el producto nutritivo que comprende los alcaloides de *Ribes* mejoró su tiempo de prueba de natación estándar general en un 6,4% con una mejora aún más impresionante en la segunda mitad de la prueba de natación del

12,1%. Esta fue una mejora excepcional que de otro modo solo se obtendría a través de un régimen de entrenamiento altamente intensificado durante un período de tiempo más largo, demostrando los efectos de mejora del rendimiento físico y de la resistencia del producto nutritivo que comprenden los alcaloides de *Ribes*.

5 En el ejemplo 25, un corredor de larga distancia masculino con buena preparación física de 28 años logró una mejora en su V02 Max calculado del 7,8% en una prueba estándar de Conconi después de solo 7 días de administración oral del producto nutritivo. Esta fue una mejora excepcional, considerando el alto nivel de condición física del sujeto y, en consecuencia, un V02 Max muy alto antes del tratamiento, que normalmente solo se puede obtener a través del entrenamiento de intervalos duros durante un período de tiempo más prolongado, demostrando el efecto de mejora en el V02 Max en atletas del producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*.

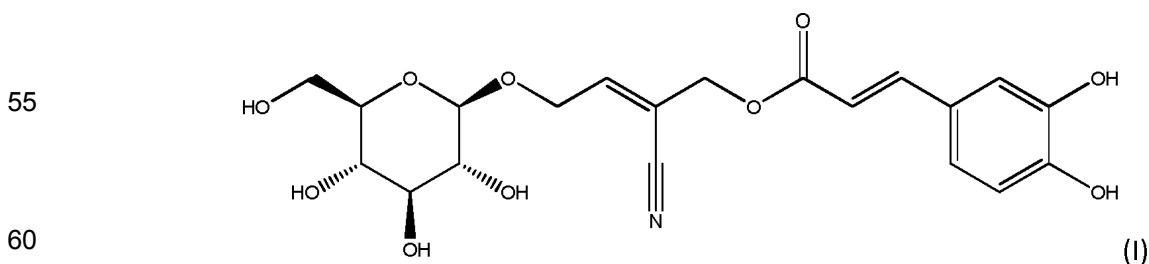
15 En el ejemplo 26, después de solo 4 días de administración oral diaria del producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*, un hombre físicamente bien entrenado de 48 años con una frecuencia cardíaca de umbral anaeróbico bien establecido de 175 bpm durante entrenamiento de ciclo de alta intensidad a larga distancia mejoró su frecuencia cardíaca media un 5,7% a 185 bpm durante 20 minutos durante un pase de entrenamiento de alta intensidad de larga distancia, lo que indica un rápido inicio de acción y una resistencia aumentada y el umbral de lactato ejercido por el producto nutritivo que comprende los alcaloides de *Ribes*.

20 En el ejemplo 3 y 4, se demostró que las fracciones de alcaloides de *Ribes* podían inhibir dependientemente de la dosis IKK- β y PDE4, enzimas que están altamente vinculadas con la propagación de varios tipos de inflamación. La relevancia fisiológica de estos efectos está fuertemente respaldada por el ejemplo 21, en el que a un hombre de 47 años que sufría de artrosis en la primera articulación carpometacarpiana de la mano izquierda con síntomas crecientes de dolor, hinchazón, rigidez y disfunción articular durante más de 2 años se le había ofrecido cirugía para aliviar su afección. El sujeto inició un tratamiento oral con el producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*, y gradualmente, el dolor y la hinchazón de la articulación afectada disminuyeron de tal manera que después de tomar el producto nutritivo que comprende los alcaloides de *Ribes* durante 12 semanas, todos los síntomas de la osteoartritis estaban completamente ausentes. El sujeto pudo usar su pulgar sin restricciones en todo tipo de actividades diarias y tareas manuales sin provocar dolor o cualquier otro síntoma de la articulación carpometacarpiana (se estimó que el dolor se redujo un 100%). Como los síntomas de la osteoartritis permanecieron ausentes durante otras 8 semanas de tratamiento, la operación se canceló.

35 En el ejemplo 22, una mujer de 43 años con un diagnóstico de osteoartritis en la primera articulación metatarsal del pie derecho durante 4 años y del pie izquierdo durante 3 años había sufrido un dolor creciente y una movilidad articular reducida. Después de 2 semanas de administración oral del producto nutritivo que comprende alcaloides de *Ribes*, los dolores en la primera articulación metatarsal de ambos pies se redujeron en un 80% según lo estimado por el sujeto y la movilidad de las articulaciones casi volvió a la normalidad. Esta mejora pronunciada en los síntomas de la osteoartritis permaneció estable durante las siguientes dos semanas de tratamiento, indicando un efecto robusto y duradero del tratamiento. El sujeto no había experimentado una mejora de la condición durante los últimos 4 años; al contrario, la condición había empeorado. El ejemplo 21 y 22 indica claramente una actividad antiinflamatoria sobre la osteoartritis y un efecto promotor sobre la salud de la articulación y el cartílago del producto nutritivo que comprende una fracción de alcaloides de *Ribes*.

45 Por lo tanto, los inventores han descubierto que los alcaloides y las fracciones de alcaloides de *Ribes* comprenden un nuevo principio bioactivo para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular, un trastorno dislipídico, un trastorno pre-diabético, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, afecciones inflamatorias como la artritis, así como para la mejora de la salud cognitiva y neuronal, mejora de la disminución relacionada con la edad en la resistencia física y los niveles de energía percibidos, y la resistencia, VO2 Max y umbral de lactato durante el rendimiento deportivo.

50 De acuerdo con un aspecto la invención se refiere a un compuesto alcaloide de acuerdo con la fórmula (I):



65 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto alcaloide de acuerdo con la fórmula (1), en donde el compuesto es (E)-(E)-2-ciano-4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)but-2-en-1-il 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato ("Ribetril A").

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un uso no terapéutico de un alcaloide de acuerdo con la fórmula (I), para apoyar, normalizar o mejorar la función muscular, el rendimiento atlético, la función mitocondrial, la función metabólica o para disminuir por lo menos un signo fisiológico del envejecimiento.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un alcaloide de acuerdo con la fórmula (I) para su uso como un medicamento.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere al uso de alcaloide de acuerdo con la fórmula (I) para preparar un medicamento, en donde dicho medicamento es para el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de una enfermedad cardiovascular, un trastorno dislipidémico, un trastorno pre-diabético, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, obesidad, sarcopenia, osteoartritis, una enfermedad inflamatoria y enfermedades asociadas con disfunción mitocondrial o para el tratamiento o prevención de una herida.

Descripción detallada

Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se describirán ahora con más detalle con respecto a otras realizaciones descritas en la presente. Debe apreciarse que la invención puede realizarse de diferentes formas y no debe considerarse limitada a las realizaciones expuestas en la presente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología usada en la descripción de la invención en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que limite la invención. Tal como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones expuestas en la presente, se pretende que las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyan las formas plurales también a menos que el texto indique claramente lo contrario. El experto en la técnica entiende que mientras que la forma plural o singular de los sustantivos se usa en ciertos lugares, el plural puede abarcar el singular y viceversa. Como se usa en la presente, el término "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los artículos enumerados asociados.

Todos los nombres químicos sistemáticos usados para los alcaloides de la invención en la presente se han generado de acuerdo con las reglas de Cahn-Ingold-Prelog para estereoquímica mediante la aplicación del software ChemBioDraw Ultra 12.0 de CambridgeSoft.

Para otros productos químicos, se aplican sus nombres usados comúnmente, por ejemplo, en el caso de los flavonoles, ácidos fenólicos, proantocianidinas y antocianidinas que se producen en *Ribes*.

En la presente se usan las siguientes frases, términos y definiciones:

El término "*Ribes*" pretende abarcar una especie de *Ribes* o cultivar de la misma adecuada para la producción del alcaloide de la invención y una fracción de alcaloides. Ejemplos no limitativos de especies y subespecies adecuadas incluyen *Ribes rubrum*, *Ribes nigrum*, *Ribes sativum*, *Ribes petraeum*, *Ribes multiflorum*, *Ribes longacemosum*, *Ribes sylvestre*, *Ribes spicatum*, *Ribes vulgare*, *Ribes x pallidum*, *Ribes x nidigrolaria*, *Ribes europaeum*, *Ribes scandinavicum*, *Ribes sibiricum*, *Ribes triste*, *Ribes hudsonianum* Rich y *Ribes americanum* Mill. Los ejemplos no limitativos de cultivares se enumeran en el resumen del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de todos los Cultivares y Selecciones de *Ribes* y se pueden encontrar en la página de inicio de USDA [<https://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=113531>].

Se pretende que los términos "fracción de alcaloide" y "alcaloide de *Ribes*" abarquen un único alcaloide aislado o una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete alcaloides. Los alcaloides de la invención pueden obtenerse a partir de cualquier fuente de origen natural disponible, fabricarse mediante tecnología recombinante o sintética. De acuerdo con la presente invención los alcaloides se definen como las moléculas mostradas en las figuras anteriores.

Como se entiende comúnmente en química, el término "fracción de masa" (W_i) se refiere a la proporción de una sustancia con masa M_i con la masa de la mezcla total M_{tot} definida como:

$$W_i = \frac{M_i}{M_{tot}}$$

Aquí la fracción de masa se expresa típicamente como porcentaje (%).

El término "uso terapéutico" se refiere a cualquier aplicación de la invención relacionada con "tratamiento" como se define a continuación.

5 El término "producto nutritivo" se refiere a un producto alimenticio o no alimenticio que tiene el alcaloide de la invención o una fracción del alcaloide añadido, o alternativamente una cantidad aumentada del alcaloide o de la fracción alcaloide, en comparación con la forma de origen natural, para proporcionarle un beneficio fisiológico o médico, que puede ser un beneficio terapéutico o no terapéutico.

10 Un producto nutritivo en la forma de un "producto alimenticio" en el presente contexto se refiere a un alimento diseñado para proporcionar beneficios adicionales al organismo distintos a un efecto puramente nutricional, por ejemplo, un beneficio fisiológico, un beneficio médico, un beneficio terapéutico o un beneficio no terapéutico como se ha definido anteriormente. Ejemplos no limitativos incluyen productos referidos comúnmente como alimentos funcionales, suplementos alimenticios, suplementos dietéticos, suplementos nutricionales, nutracéuticos o alimentos médicos. La definición reglamentaria y la denominación de tales productos varían significativamente en
15 diferentes partes del mundo y se encuentran bajo cambios regulares. Tales productos pueden estar en forma de preparaciones alimenticias especializadas o alimentos o bebidas comunes. Un producto nutritivo en forma de un "producto no alimenticio" se refiere a productos como para administración oral, donde los ejemplos no limitativos son comprimidos, cápsulas, polvos, goma de mascar y grageas; o productos como para administración tópica, donde los ejemplos no limitativos son pomadas, cremas, lociones, geles, soluciones o champús.

20 El término "bagazo" se refiere a las pieles, pulpa, semillas y tallos que quedan después de presionar el zumo de las bayas.

25 Un "beneficio fisiológico" se refiere a los efectos de un producto nutritivo sobre los procesos fisiológicos dentro o fuera del rango fisiológico normal incluyendo:

Mantenimiento, contribución o mejora de procesos o parámetros fisiológicos dentro del rango fisiológico normal, o reducción o mejora de procesos o parámetros fisiológicos anormalmente altos o bajos, por ejemplo, estabilización o normalización de procesos o parámetros fisiológicos. Ejemplos no limitativos de beneficios fisiológicos son el
30 mantenimiento o la mejora de la resistencia muscular o la fuerza muscular, el mantenimiento o la mejora de la función cognitiva, como la memoria a corto plazo, el mantenimiento o la mejora de los procesos de curación en el cuerpo, por ejemplo, la curación de heridas u otros tipos de daños en los tejidos, reducción o prevención de los riesgos de enfermedad y afecciones relacionadas con la edad y/o apoyo del proceso de curación durante la dolencia y la enfermedad, mantenimiento o mejora de la función mitocondrial o neutralización del envejecimiento o signos del envejecimiento.

35 Un "beneficio médico" se refiere a los efectos de un producto nutritivo en los procesos patológicos con el propósito de prevenir o contrarrestar una enfermedad o un proceso fisiológico que lleva potencialmente a una enfermedad. Ejemplos no limitativos de beneficios médicos son la mejora de la biogénesis mitocondrial y la función en las células musculares contrarrestando el deterioro de la masa muscular en pacientes sedentarios, por ejemplo, durante la hospitalización, contrarrestar la sarcopenia (pérdida de masa muscular relacionada con la edad) al promover la resistencia necesaria para activar físicamente a los ancianos. Otro beneficio médico de un producto nutritivo podría ser la mejora de la salud del cartílago y la prevención de los procesos inflamatorios que conducen a la osteoartritis, la forma más común de artritis, además de mejorar la salud cardiovascular y contrarrestar los factores de riesgo principales, por ejemplo, reduciendo los lípidos en sangre dañinos.

40 Un "beneficio terapéutico" se refiere a la normalización o neutralización de procesos o parámetros fisiológicos fuera del rango normal, por ejemplo, en relación con una enfermedad o proceso de enfermedad.

50 Un "beneficio no terapéutico" se refiere a la normalización o neutralización de procesos o parámetros fisiológicos dentro del rango normal, optimizando la resistencia deportiva, etc., etc.

55 El término "tratar" y "tratamiento" se refiere a la aplicación de la presente invención que da como resultado una reducción de la gravedad de la condición del sujeto o por lo menos la condición mejora parcialmente o mejora y/o se logra un alivio, mitigación o disminución de por lo menos un síntoma clínico y/o hay un retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso de la aparición de la afección. Por lo tanto, el término "tratar" se refiere a los regímenes de tratamiento tanto preventivo como terapéutico.

60 El término "herida" se refiere a las siguientes clases no limitativas de heridas:

- Una herida dérmica aguda o crónica;
- Una herida aguda o crónica relacionada con tejido corporal seleccionado entre músculos, grasa, huesos, órganos internos, tejido nervioso, cartílago, articulaciones, arterias, venas, el tracto gastrointestinal, membranas mucosas y ojos;

- 5 • Una herida aguda seleccionada entre heridas traumáticas, heridas quirúrgicas, heridas infectadas, heridas de las membranas mucosas, heridas por quemaduras, heridas provocadas por una condición subyacente y úlceras corneales;
- 10 • Una herida crónica seleccionada entre heridas quirúrgicas, heridas traumáticas, heridas por quemaduras, heridas infectadas o contaminadas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras venosas y arteriales mixtas, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras neuropáticas, fístulas, úlceras inmunológicas, úlceras malignas, úlceras por dermatitis, úlceras por radiación, pioderma gangrenoso y heridas tratadas con injertos de piel;
- 15 • Una herida traumática seleccionada entre cortes, aplastamientos, pinchazos, laceraciones, contusiones, abrasiones y avulsiones;
- Una herida pobre y/o que cura lentamente;
- Una herida en un humano o animal.

20 La inhibición de IKK- β o PDE4 se mide in vitro de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 3 y el ejemplo 4. En algunas realizaciones, las fracciones de alcaloides, extractos de *Ribes* o composiciones pueden tener un efecto predominante en cualquiera de IKK- β o PDE4, o tienen un efecto que es independiente de estos mecanismos de acción.

25 El término "reducir", "reducir", "inhibir" o "inhibidor" se refiere a una disminución o mengua en la actividad especificada de por lo menos aproximadamente el 10%, 25%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o más. En algunas realizaciones, la reducción da como resultado poca o esencialmente ninguna actividad detectable (a lo sumo, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10% o incluso el 5%).

30 El término "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de las fracciones de alcaloides, extracto, zumo o concentrado de *Ribes* o composiciones que es suficiente para producir el efecto deseado. La cantidad eficaz variará con la aplicación para la cual se estén empleando las fracciones de alcaloides, el extracto, el zumo o el concentrado de *Ribes* o las composiciones, la edad y la condición física del sujeto, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el portador usado, y factores similares dentro del conocimiento y experiencia de los expertos en la técnica.

35 El término "zumo" se refiere al líquido que está contenido naturalmente en las *Ribes*, como las bayas, los tallos y/o las hojas, y que se puede obtener apretando o macerando mecánicamente las *Ribes*.

40 El término "extracto" se refiere a una mezcla de sustancias obtenidas de *Ribes*, especialmente las bayas, tallos y/o hojas por extracción de las *Ribes* con un solvente capaz de disolver los componentes del extracto. Las *Ribes* se pueden extraer preferiblemente frescas o secas. En la presente invención pueden usarse varios solventes y varias técnicas de extracción, como percolación o maceración con el solvente, destilación o extracción supercrítica.

45 El término "concentrado" se refiere a un producto derivado de *Ribes* donde la fracción de masa de los alcaloides se mejora sin llevar a cabo una extracción. Ejemplos no limitativos de métodos de preparación de concentrados son precipitación, condensación, secado al aire o secado por congelación.

50 Los términos "vehículo aceptable", "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo cosméticamente aceptable" se refieren a un componente tal como un portador, diluyente o excipiente de una composición que es compatible con los otros ingredientes de la composición en que puede combinarse con los compuestos y/o composiciones de la presente invención sin eliminar la actividad biológica de los compuestos o las composiciones, y es adecuado para su uso en sujetos como se proporciona en la presente sin efectos secundarios adversos indebidos. Ejemplos no limitativos de "vehículos aceptables" incluyen, sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos, alimenticios o cosméticos estándar como agua, emulsiones, linimentos, comprimidos, cápsulas, polvos, etc. Esto también pretende definir un vehículo en forma líquida, semisólida o sólida.

El término "dispositivo médico" se refiere a un dispositivo como se define de manera regulatoria.

60 El término "composición alimenticia" se refiere a cualquier tipo de líquido o forma sólida de ingredientes de alimentos o bebidas o alimentos y bebidas terminados, incluyendo refrescos, zumos, batidos y productos lácteos, etc. El término "composición alimenticia" abarca además cualquier tipo de alimento o bebida terminado, incluyendo los alimentos funcionales, alimentos médicos, suplementos dietéticos y nutraceuticos.

65 El término "sostener" se usa indistintamente con los términos "mantener", "restaurar" o "preservar".

El término "disminución" se usa indistintamente con los términos "bajar", "contrarrestar", "disminuir" o "reducir".

El término "normalizar" se usa indistintamente con los términos "regular" o "modular".

El término "mejorar" se usa indistintamente con los términos "mejorar", "promover", "estimular", "aumentar" o "elear"

La guía para la preparación de composiciones de la invención se puede encontrar en:

- "Remington: The science and practice of pharmacy", 21ª Edición, Pharmaceutical Press (20 de noviembre de 2011), ISBN-13: 978-0857110428;
- Food Science and Technology, editado por Geoffrey Campbeii-Piatt, edición ilustrada (11 de septiembre del 2009), Wiley-Blackwell, ISBN-13: 978-0632064212
- Handbook of Cosmetic Science and Technology, editado por Marc Paye, 3ª edición (3 de marzo de 2009), Informa Healthcare, ISBN-13: 978-1420069631.

Experimental

Ejemplo 1

Objetivo

El objetivo de la serie actual de experimentos era aislar los alcaloides Ribetril A, Ribetril B, Ribetril C, Ribetril D, Ribetril E, Glucoindol A y Glucoindol B de *Ribes* y preparar extractos, zumos y concentrados de *Ribes* que comprendan una mayor fracción de masa de la fracción de alcaloide.

Materias primas, compuestos de ensayo y productos químicos

Todos los productos químicos empleados eran de grado analítico estándar de varios proveedores. En casos especiales se especifican los proveedores.

Todas las muestras de *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* fueron proporcionadas por Asiros A/S, Copenhague, Dinamarca (cultivadas comercialmente en Dinamarca, Polonia o Alemania) u obtenidas de la colección genética Pometet, Universidad de Copenhague, Dinamarca.

Preparación de alcaloides puros a partir de bayas de *Ribes*

Se trituraron y homogeneizaron 500 g de bayas (ya sea *Ribes rubrum* o *Ribes nigrum*), seguido de extracción dos veces con 500 ml de 2-propanol durante 30 minutos bajo homogeneización empleando un Ultraturax Digital IKA[®]T25 funcionando a 24000 rpm. Antes del procesamiento adicional, el extracto bruto se sometió a filtración en un embudo Büchner con succión al vacío.

El siguiente paso consistió en la eliminación del solvente en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor R-210 equipado con un controlador de vacío V-850) al vacío a 50° C.

Posteriormente, el extracto se disolvió/dispersó en 500 ml de agua y se sometió a extracción líquido-líquido en un embudo de separación con 500 ml de heptano dos veces para eliminar los lípidos no deseados. Posteriormente, la solución acuosa del extracto se sometió a extracción líquido-líquido en un embudo de separación con 500 ml de acetato de etilo tres veces y se recogieron los extractos de acetato de etilo.

Posteriormente, el acetato de etilo se eliminó en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor R-210 equipado con el controlador de vacío V-850) al vacío a 50° C. El extracto de acetato de etilo libre de solvente se recogió y se usó como materia prima para la cromatografía preparativa.

Cromatografía preparativa

El aislamiento de los alcaloides puros de acuerdo con la invención se realizó utilizando un sistema de HPLC preparativa Shimadzu Prominence que consiste de 2 bombas de HPLC preparativas (LC-20AP), un inyector manual preparativo (RH3725), un detector de matriz de diodos (SPD-M20A), un recolector de fracciones de HPLC (FRC-10A) y un controlador del sistema. Todos los datos se registraron usando el software Shimadzu Labsolution Multi LC-PDA. La separación de los compuestos se logró en una columna Synergy 4u Max-RP 80A (250 x 21,20 mm) de Phenomenex. Todos los solventes usados eran de calidad HPLC de proveedores comerciales. Los datos UV se adquirieron como espectros UV de exploración completa a 200-700 nm. La recogida de las fracciones se adquirió

usando 280 nm.

Se usaron dos configuraciones de fase móvil diferentes; un isocrático para el fraccionamiento bruto y un gradiente para el fraccionamiento final.

La fase móvil isocrática consistió de 70% v/v de agua con ácido fórmico al 0,5% y 30% v/v de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5%, tiempo de ejecución 20 min y un caudal de 11 ml/min.

La fase móvil del gradiente consistió en agua con ácido fórmico al 0,5% y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% usando un gradiente del 2-90% v/v de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% (0 a 125 min) y 90-2% v/v de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% (125-126 min) y un caudal de 11 ml/min.

El siguiente procedimiento general se usó para recoger los compuestos puros. Se inyectaron entre 50 y 200 mg del extracto bruto, las fracciones se recogieron usando el método isocrático y las fracción o fracciones de interés se seleccionaron en base a los espectros UV. La pureza de las fracciones se determinó en el sistema analítico descrito en la sección analítica. Si eran muy brutas, las fracciones se inyectaron de nuevo usando el método isocrático y si no eran demasiado brutas, las fracciones se inyectaron de nuevo usando el método de gradiente. La pureza de la fracción de interés se determinó usando el sistema analítico y normalmente la fracción podría obtenerse ejecutando el método isocrático 2-5 veces, seguido de ejecución del método de gradiente 2-3 veces.

La identidad y la pureza de los alcaloides aislados se verificaron mediante HPLC-DAD-MS. La estructura del nuevo alcaloide Ribetril A se dilucidó usando 2D ^1H NMR y ^{13}C NMR además de HPLC-DAD-MS.

Ribetril A

La HPLC-DAD-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico y las señales MS primarias esperadas (modo de ión positivo ESI) m/z 438 $[\text{M} + \text{H}]^+$ y m/z 276.

Para el análisis NMR, el Ribetril A se disolvió en 40 μl de metanol- d_4 y se transfirió a tubos de NMR de 1,7 mm o.d. Los espectros de NMR se adquirieron a 300 K en un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz equipado con una cabeza de sonda de 1,7 mm inversa criogénicamente enfriada. Los espectros de protones se adquirieron usando un ancho espectral de 12 kHz, que recoge 65536 (2^{16}) puntos de datos de dominio de tiempo. El número de transitorios añadidos se ajustó para proporcionar relaciones de señal a ruido adecuadas, típicamente de 512-1024 exploraciones. La señal de agua se suprimió mediante presaturación durante el retraso de relajación (4,0 segundos) usando pulsos compuestos [Bax 1985, Magn Reson; 65:142-145] calibrados para cubrir 25 Hz. Se realizaron experimentos bidimensionales homonucleares usando la misma amplitud espectral y frecuencia portadora que los experimentos unidimensionales (recogiendo 2048 puntos de datos del dominio del tiempo), usando supresión de señales de agua mediante conformación de la excitación [Hwang 1995, J Magn Reson, Serie A;112:275-279]. Se adquirió ^1H - ^1H COSY filtrado con Quantum doble se adquirió con 512 incrementos, cada uno una suma de 32 exploraciones, con pulsos de purga antes del retraso de relajación (1,0 s). Se adquirieron NOESY sensibles a la fase con 32 exploraciones y 256 incrementos, tiempo de mezclado de 60 ms y retraso de relajación de 2,0 segundos. Los experimentos de HSQC [Boyer 2003, J Magn Reson; 165:253-259] y HMBC [Cicero 2001, J Magn Reson; 148:209-213] correlacionados con ^1H - ^{13}C se realizaron usando los esquemas de adquisición eco-anti eco de gradiente seleccionado, con la misma frecuencia portadora y amplitud espectral que los experimentos de ^1H unidimensionales. El número de puntos de datos en el dominio del tiempo fue 2048 y los retrasos de relajación de 1,0 segundos. Se adquirió HSQC editado por multiplicidad optimizado para $^1\text{J}_{\text{H,C}}$ de 145 Hz, con pulsos de forma adiabática para todos los pulsos de inversión de ^{13}C , con 16 exploraciones y 256 incrementos que cubren 26 kHz en la dimensión indirecta. Se adquirieron HMBC optimizado para acoplamiento ^1H - ^{13}C de 8 Hz (tiempo de mezclado de 62,5 ms), con un filtro de paso bajo doble con los nodos a 125 y 165 Hz, con 64 exploraciones y 128 incrementos que cubren 128 kHz.

Los datos del dominio de tiempo brutos se rellenaron con cero o se predijeron linealmente hasta el doble del tamaño antes de aplicar funciones de ventana adecuadas (multiplicación exponencial o funciones de seno al cuadrado) y transformada de Fourier para obtener los espectros. Se usaron las señales de solvente residuales de metanol- d_4 a 3,31 ppm (^1H) y 49,15 ppm (^{13}C) para calibrar los ejes de frecuencia.

La estructura de Ribetril A se dilucidó adicionalmente de la siguiente manera. El Ribetril A se identificó como un ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico análogo de (E)-2-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)but-2-enitrilo. La estructura con la numeración usada para la elucidación de la estructura se muestra en la figura 1; y el espectro ^1H NMR con anotación de todas las resonancias se muestra en la figura 2. Por tanto, en base a la resonancia de H-1' (δ 4.34, d, J = 7.8 Hz) anomérico, se identificó la unidad de β -D-glucopiranosido como un sistema de giro aislado (H1'-H2'-H3'-H4'-H5'-H6'A/H6'B) en el espectro COSY. Al mismo tiempo, la configuración β del D-glucósido se estableció en base al acoplamiento axial-axial ($J_{\text{H1}',\text{H2}'} = 7.8$ Hz) entre H1' y H2'; y, por tanto, la posición ecuatorial del enlace glucosídico. El par de protones diastereotópicos H1A (δ

4,54, dd, $J_{H1A,H2} = 6,5$ Hz) y H1B (δ 4,65, dd, $J_{H1B,H2} = 6,0$ Hz) se identificó en base a su correlación con C1 (δ 67,98) en el espectro HSQC y ambos mostraron un pico cruzado COSY para H2 (δ 6,85, t, $J_{H1A,H2} \approx J_{H1B,H2} = 6,3$ Hz). Las resonancias restantes de la unidad de (E)-4-hidroxi-2- (hidroximetil)but-2-enenitrilo central se identificaron en base a las correlaciones de HMBC de H4 (δ 4,82, superposición con resonancia de agua) a C2 (δ 148,8), C3 (δ 112,6) y C5 (δ 115,7); así como un pico cruzado fuerte en el espectro NOESY para establecer la configuración (E) del enlace doble (ver figura 3). La posición de la unidad de ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico en la posición 4 se identificó en base a los picos cruzados (débiles) entre H4 y H2", así como entre H4 y H3". Además se observó una correlación de H4 a C1" de ácido ((E)-3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico 168,0; el carbono de carbonilo) en el espectro HMBC.

10 La Figura 1 muestra la estructura de Ribetril A con la numeración usada para la asignación de resonancias 1H y ^{13}C . Tener en cuenta que la numeración de Ribetril A difiere de la numeración IUPAC estricta.

15 La Figura 2: PARTE SUPERIOR: correlaciones NOE seleccionadas (flechas con doble cabeza). Parte Inferior: correlaciones HMBC seleccionadas (flecha que apunta de H a C).

La Figura 3 muestra el espectro de 1H NMR con anotación de todas las resonancias de 1H de Ribetril A.

La asignación de las resonancias 1H y ^{13}C se da a continuación.

20 1H NMR (600 MHz, CD₃OD), δ 3.22 [dd, 1H, $J=7.9, 8.8$ Hz, H-C(4')], 3.30 [m, 1H, H-C(5')], 3.31 [m, 1H, H-C(4')], 3.37 [t, 1H, $J=8.6$ Hz, H-C(3')], 3.69 [dd, 1H, $J=5.1, 12.1$ Hz, H-C(6a')], 3.88 [dd, 1H, $J=2.0, 12.0$ Hz, H-C(6b')], 4.34 [d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-C(1')], 4.54 [dd, 1H, $J=6.5, 14.6$ Hz, H-C(1a)], 4.65 [dd, 1H, $J=6.0, 14.6$ Hz, H-C(1b)], 4.82 [m, 2H, H-C(4)], 6.30 [d, 1H, $J=15.9$ Hz, H-C(2'')], 6.79 [d, 1H, $J=8.2$ Hz, H-C(8'')], 6.85 [t, 1H, $J=6.3$ Hz, H-C(2)], 6.97 [dd, 1H, $J=1.9, 8.2$ Hz, H-C(9'')], 7.06 [d, 1H, $J=1.9$ Hz, H-C(5'')], 7.61 [d, 1H, $J=15.9$ Hz, H-C(3'')]; ^{13}C NMR (150 MHz, CD₃OD), δ 62.4 [C(6')], 64.1 [C(4)], 68.0 [C(1)], 71.2 [C(4')], 74.7 [C(2')], 77.7 [C(3')], 77.8 [C(5')], 104.0 [C(1')], 112.6 [C(3)], 113.7 [C(2'')], 115.0 [C(5'')], 115.7 [C(5)], 116.3 [C(8'')], 123.0 [C(9'')], 127.1 [C(4'')], 146.3 [C(6'')], 147.8 [C(3'')], 148.2 [C(7'')], 148.8 [C(2)], 168.0 [C(1'')].

30 Ribetril B

La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al del cromóforo primario ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrílico y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 452 [M + H]⁺ y m/z 290.

35 Ribetril C

La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrílico y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 422 [M + H]⁺ y m/z 290.

40 Ribetril D

45 La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 426 [M + H]⁺ y m/z 264.

Ribetril E

50 La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario ácido 4-hidroxibenzoico y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 396 [M + H]⁺ y m/z 234.

Glucoindol A

55 La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario ácido 2-(1H-indol-3-il)acético y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 338 [M + H]⁺ y m/z 320.

60 Glucoindol B

La HPLC-PDA-MS realizada con un sistema Agilent 1100 (ver la sección analítica a continuación para los detalles) generó un espectro UV esperado similar al cromóforo primario 2-(1H-indol-3-il)acetato de metilo y la señal MS primaria esperada (modo de ión positivo ESI) m/z 352 [M + H]⁺ y m/z 334.

65 Establecimiento de la fracción de masa de Ribetrilos y Glucoindoles en Ribes.

- El zumo de *Ribes* de fuentes comerciales producido a partir de cultivares de *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* se usó para establecer el nivel de origen natural de los alcaloides de la invención en las bayas. Este es un buen material de partida para la determinación del nivel de origen natural de alcaloides, ya que todos los alcaloides tienen una alta solubilidad en agua y, por lo tanto, estarán presentes en niveles en el zumo que son representativos de la cantidad en la baya.

Aplicando el análisis cuantitativo descrito en la sección experimental a continuación, inyectando la cantidad más alta posible de materia seca del zumo se obtuvo la siguiente fracción de masa:

Ribetril A: 0-0,00008%

Ribetrilos totales: 0,00005-0,00015%

Glucoindoles totales: 0,00032-0,00069% (Sobre esta base, un nivel total de Glucoindoles superior al 0,0008% se define como una fracción de masa aumentada en comparación con *Ribes*).

Conclusión:

Sobre esta base, una fracción de masa de Ribetril A por encima del 0,0001% se define como una fracción de masa aumentada en comparación con *Ribes*.

Sobre esta base, un nivel total de Ribetrilos por encima del 0,0002% se define como una fracción de masa aumentada en comparación con *Ribes*.

Sobre esta base, un nivel total de glucoindoles por encima del 0,0008% se define como una fracción de masa aumentada en comparación con *Ribes*.

Preparación de un extracto, zumo o concentrado de *Ribes* que comprende las fracciones de alcaloides.

Con el propósito de preparar una variedad de composiciones de alcaloides a partir de *Ribes*, se aplicaron los siguientes pasos generales:

1. Preparar una suspensión de las bayas y/o hojas molidas.

Se trituraron y homogeneizaron 500 g de bayas de "calidad de zumo" industrial, lo que significa bayas con tallos y, hasta cierto punto, hojas de *Ribes* en cuestión. En el último paso de la homogeneización, se aplicó un IKA® T25 Digital Ultraturax a 24000 rpm durante 30 minutos y se añadieron hasta 500 ml de agua desmineralizada para ayudar a la homogeneización dependiendo del contenido de agua de la muestra de *Ribes*.

Para aumentar la capacidad de extracción de las fracciones de alcaloides, la suspensión en algunos casos se sometió a tratamiento enzimático con uno de los siguientes cócteles de enzimas proporcionados por Novozymes A/S, Dinamarca:

- 0,1-0,5 g de Viscozima L, que es un complejo multienzimático con una fuerte actividad pectolítica y una amplia gama de carbohidrasas que incluyen arabinasa, celulasa, beta-gluconasa, hemicelulasa y xilanasas. El tratamiento enzimático se llevó a cabo durante 4 horas a 50° C después de ajustar el pH a 4,5 con NaOH 0,1 M.
- 0,1-0,5 g de Pectinex® BE XXL, que es una enzima con fuerte actividad pectolítica.

2. Opcionalmente, extraer las bayas y/o las hojas molidas con un agente de extracción.

Este paso se omitió en el caso de que se previera un producto de zumo o concentrado. Este paso se llevó a cabo mediante la adición de 500-1500 ml de un agente de extracción seleccionado de:

- Agua desmineralizada
- Metanol
- Etanol
- Acetona
- 1-propanol
- 2-propanol
- Acetato de etilo

Todas las extracciones se llevaron a cabo a 25-70° C durante 1-4 horas.

La extracción posterior con el mismo solvente dio mayores rendimientos de las fracciones de alcaloides.

Fue una observación general que una extracción completa de todos los alcaloides podría obtenerse con los diferentes solventes solo en función del número de extracciones repetidas necesarias y las condiciones de extracción con respecto a la temperatura y el tiempo.

La diferencia principal entre los extractos obtenidos después de la extracción completa de los alcaloides con los diferentes solventes fue la co-extracción de otras clases de compuestos de los diferentes *Ribes*. En base a la experiencia del programa de extracción llevado a cabo, se concluyó que una extracción completa de los alcaloides podría obtenerse probablemente con varias mezclas de los solventes mencionados y con otros solventes, incluso con una polaridad relativamente variable. Como apreciará un experto en la técnica, se pueden obtener resultados similares con diversas técnicas de extracción que incluyen maceración, percolación, extracción Soxhlet, extracción supercrítica, etc.

Antes del procesamiento adicional, el extracto bruto se sometió a un paso final de eliminación de partículas

de material vegetal extraído por filtración en un embudo Büchner con succión al vacío.

3. Opcionalmente eliminar el agente de extracción.

Este paso se llevó a cabo en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor R-210 equipado con un controlador de vacío V-850) a vacío a 50° C. Con el propósito de eliminar residuos de solvente orgánico, se aplicó un paso de extracción con hasta 500 ml de etanol.

Como apreciará un experto en la técnica, puede obtenerse un resultado similar con otras técnicas de secado, tales como secado por congelación, secado con lecho fluido, etc.

En algunos casos, este paso fue superfluo simplemente porque el extracto bruto podía llevarse directamente al paso siguiente. En el caso de un zumo tomado directamente del paso 1, este paso podría usarse para hacer un concentrado de zumo opcionalmente para un procesamiento posterior.

4. Opcionalmente, concentración adicional de la fracción alcaloide.

Obviamente, este paso se omitió si la concentración deseada de los alcaloides se había obtenido con los pasos de procesamiento anteriores.

Este paso se llevó a cabo usando varias técnicas independientemente o en combinación.

a. Centrifugación

Después de enfriar el extracto bruto o resuspender el extracto bruto seco en agua, en algunos casos se usó un paso de centrifugación para eliminar el material particulado, por ejemplo, lípidos, proteínas o polisacáridos precipitados.

b. Filtración

En algunos casos, se aplicó un paso de ultrafiltración para mover las macromoléculas residuales en solución, lo que podría aumentar significativamente la concentración de la fracción de alcaloides en comparación con la concentración en el extracto bruto.

Este paso se llevó a cabo en un sistema de filtración de flujo tangencial Minimate™ de Pall Corporation, USA. El sistema estaba equipado con una membrana de ultrafiltración de polietersulfona (cápsula Omega™ TFF) con un corte molecular de 3000, 10000, 30000 o 100000 Dalton. Como apreciarán los expertos en la técnica, podría obtenerse un resultado similar con otros materiales de filtro y cortes moleculares. Además, podría aplicarse ventajosamente un paso de nanofiltración para eliminar monosacáridos, iones inorgánicos y ácidos carboxílicos pequeños.

c. Extracción líquido-líquido

En algunos casos, se aplicó un paso de extracción líquido-líquido y se llevó a cabo en un embudo de separación tradicional. Se extrajo una solución acuosa del extracto de *Ribes* con un solvente orgánico inmiscible en agua en el que los alcaloides eran solubles. Se realizaron extracciones líquido-líquidos con éxito con acetato de etilo o 1-butanol.

Como apreciarán los expertos en la técnica, puede obtenerse una concentración útil de los alcaloides de la invención con otros solventes o mezclas de solventes.

d. Extracción sólido-líquido

En algunos casos, se aplicó un paso de extracción de sólido-líquido, donde el extracto bruto seco se volvió a disolver en un solvente que disolvía preferentemente los alcaloides. Dependiendo del extracto bruto, la extracción sólido-líquido se realizó con éxito con 2-propanol, 1-butanol o acetato de etilo.

Como apreciarán los expertos en la técnica, puede obtenerse una concentración útil de los alcaloides de la invención con otros solventes o mezclas de solventes.

e. Cromatografía

Para obtener las fracciones de alcaloides de *Ribes* purificadas, se aplicó en algunos casos un paso de cromatografía.

Este paso se llevó a cabo con una columna de extracción en fase sólida, Supeico Discovery® DSC-18, 10 g, tubos de 60 ml montados en un sistema de vacío Supelco Visiprep 24 TM DL. Se aplicó el siguiente procedimiento estándar:

- La columna se acondicionó con 60 ml de metanol (MeOH) y se equilibró con 60 ml de MeOH al 25% en agua (vol/vol).

- Se aplicó extracto de *Ribes* bruto o pre-purificado correspondiente a 1000 mg de materia seca a la columna en un volumen de 10-25 ml de agua (dependiendo de la solubilidad).

- La columna se eluyó con 100 ml de agua, que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 10% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 20% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 30% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 40% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 50% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

5 - La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 60% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

- La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 70% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

10 - La columna se eluyó con 100 ml de MeOH al 80% en agua (vol/vol), que se recogió como una fracción separada.

De esta manera, se recogieron fracciones de alcaloides concentradas adicionales de acuerdo con la invención.

15 Los expertos en la técnica apreciarán que pueden aplicarse varios materiales de columna y principios de cromatografía, como otros tipos de cromatografía de fase inversa, cromatografía de fase normal, cromatografía de intercambio iónico, etc. para obtener resultados similares.

f. Secado

20 Dependiendo del proceso anterior, se aplicó opcionalmente un paso final de secado. En la mayoría de los casos, el secado se llevó a cabo en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor R-210 equipado con un controlador de vacío V-850) al vacío a 50° C. Como apreciará un experto en la técnica, puede obtenerse un resultado similar con otras técnicas de secado, secado por congelación, secado en lecho fluido, secado por pulverización, etc.

Ampliación a escala para fines preparativos

25 En algunos casos, el proceso de fabricación experimental descrito anteriormente se amplió a escala de producción de planta piloto para obtener cantidades suficientes del extracto, zumo o concentrado de *Ribes* que comprende las fracciones de alcaloides, por ejemplo, para ensayos clínicos que emplean los productos nutritivos de la invención.

Sección analítica

35 Todos los alcaloides purificados de acuerdo con la invención y los extractos, zumos o concentrados de *Ribes* que los comprenden se caracterizaron usando un sistema de HPLC-DAD-MS Agilent 1100 que consiste de una bomba binaria, un muestreador automático, un horno de columnas, un detector de matrices de diodos (DAD) y un detector de cuadrópolos MS equipado con una fuente de ionización por electropulverización. Todos los datos se registraron utilizando el software Agilent Chemstation. La separación de los compuestos se logró en una columna Poroshell 120 SB-C18 (3 x 150 mm, 2.7 µm) de Agilent Technologies. Todos los solventes usados eran de calidad MS de proveedores comerciales. La fase móvil consistió de agua con ácido fórmico al 0,5% y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% usando un gradiente del 2-98% v/v de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% (0-110 min) y 98-2% v/v de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% (110-120 min) y un caudal de 0,5 ml/min. Los datos UV se adquirieron como espectros UV de exploración completa a 200-700 nm. Los datos de MS se adquirieron como espectros de masas de exploración completa en m/z 100-1000 (modo de ion positivo ESI).

Resultados

45 El análisis confirmó la pureza de los alcaloides aislados usados para los bioensayos como se ha mencionado anteriormente.

50 Se analizaron los siguientes extractos de zumos y concentrados:

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP1
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rondum
	Agente de extracción:	Ninguno- zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático.
10	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
15	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00101% Ribetril E: 0.00304% Ribetrilos totales: 0.00405% Glucoindol A: 0.00634% Glucoindoles totales: 0.00634%
20		

25	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP2
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rovada
30	Agente de extracción:	Ninguno- zumo producido y agua añadida para extracción extendida asistida por tratamiento enzimático.
35	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
40	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00044% Ribetril D: 0.00036% Ribetril E: 0.00330% Ribetrilos totales: 0.00410% Glucoindol A: 0.02749% Glucoindol B: 0.00409% Glucoindoles totales: 0.03158%
45		
50		

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP3
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rondum
10	Agente de extracción:	Zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático. Esto fue seguido de extracción con 2-propanol.
15	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
20	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00072% Ribetril D: 0.00204% Ribetril E: 0.01348% Ribetrilos totales: 0.16240% Glucoindol A: 0.03011% Glucoindoles totales: 0.03011%
25		

30	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP4
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rovada
35	Agente de extracción:	2-propanol
40	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
45	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00559% Ribetril D: 0.01267% Ribetril E: 0.00632% Ribetrilos totales: 0.02458% Glucoindol A: 0.01200% Glucoindoles totales: 0.01200%
50		

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP5
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Redpoll
	Agente de extracción:	2-propanol
10	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
15	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00656% Ribetril B: 0.00532% Ribetril C: 0.01642% Ribetril D: 0.03511% Ribetril E: 0.04983% Ribetrilos totales: 0.11324% Glucoindol A: 0.12078% Glucoindoles totales: 0.12078%
20		
25		

30	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP6
35	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: White dutch
	Agente de extracción:	2-propanol
40	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
45	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00105% Ribetril D: 0.00544% Ribetril E: 0.01714% Ribetrilos totales: 0.02363% Glucoindol A: 0.12941% Glucoindoles totales: 0.12941%
50		

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP7
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rovada
	Agente de extracción:	2-propanol
10	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
15	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00089% Ribetril D: 0.00191% Ribetril E: 0.00735% Ribetrilos totales: 0.01015% Glucoindol A: 0.00762% Glucoindol B: 0.00379% Glucoindoles totales: 0.01141%
20		
25		

30	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP8
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rosetta
35	Agente de extracción:	2-propanol
40	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
45	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00024% Ribetril E: 0.00234% Ribetrilos totales: 0.00258% Glucoindol A: 0.00230% Glucoindoles totales: 0.00230%
50		
55		
60		
65		

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP9
	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Ben alder
	Agente de extracción:	Ninguno - zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático.
10	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
15	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00063% Ribetril C: 0.00345% Ribetril E: 0.00123% Ribetrilos totales: 0.00531%
20		

25	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP10
	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Ben Lomond
30	Agente de extracción:	Extracción con etanol seguido por secado y extracción sólido-líquido con acetato de etilo.
35	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
40	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.05637% Ribetril B: 0.24760% Ribetril C: 0.72412% Ribetril E: 0.65570% Ribetrilos totales: 1.68379%
45		

50

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP11
	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: : Ben Tron
10	Agente de extracción:	Extracción con etanol seguido de secado, disolución en agua y extracción líquido/líquido con acetato de etilo.
15	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
20	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.26511% Ribetril B: 0.61637% Ribetril C: 3.29783% Ribetril E: 0.43318% Ribetrilos totales: 4.61249%

25	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP12
30	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Ben Cannon
35	Agente de extracción:	Extracción con etanol seguido de secado, disolución en agua y fase sólida C18 donde se recogieron el 50% de las fracciones de metanol.
40	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
45	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.27793% Ribetril B: 0.69995% Ribetril C: 3.02783% Ribetril E: 1.75933% Ribetrilos totales: 5.76504%

50

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP13
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rovada
10	Agente de extracción:	Zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático. El zumo se concentró al vacío mediante secado al vacío y se sometió a extracción líquido-líquido repetida con acetato de etilo.
15	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
20	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00342% Ribetril B: 0.00251% Ribetril D: 0.00562% Ribetril E: 0.01330% Ribetrilos totales: 0.02486% Glucoindol A: 0.06111% Glucoindol B: 0.01800% Glucoindoles totales: 0.07911%
25		
30		

35	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP14
	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Ben alder
40	Agente de extracción:	Zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático. El zumo se concentró al vacío mediante secado al vacío y se sometió a extracción líquido-líquido repetida con acetato de etilo.
45	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
50	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.01440% Ribetril B: 0.00088% Ribetril C: 0.00499% Ribetril D: 0.00682% Ribetril E: 0.02192% Ribetrilos totales: 0.04901% Glucoindol A: 0.01740% Glucoindoles totales: 0.01740%
55		
60		

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP15
	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rondum
10	Agente de extracción:	Zumo producido y extracción asistida por tratamiento enzimático. El zumo se concentró al vacío mediante secado al vacío y se sometió a extracción líquido-líquido repetida con acetato de etilo.
15	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
20	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.01765% Ribetril B: 0.00251% Ribetril C: 0.00542% Ribetril D: 0.01827% Ribetril E: 0.1725% Ribetrilos totales: 0.21635% Glucoindol A: 0.03448% Glucoindol B: 0.01551% Glucoindoles totales: 0.04999%
25		
30		

35	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP16
40	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivar: Rovada/Rondum
	Agente de extracción:	Ninguno- zumo producido, temperatura aumentada y agua añadida para extracción extendida asistida por tratamiento enzimático.
45	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
50	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00015% Ribetril B: 0.00009% Ribetril D: 0.00035% Ribetril E: 0.00032% Ribetrilos totales: 0.00091% Glucoindol A: 0.00447% Glucoindol B: 0.00038% Glucoindoles totales: 0.00485%
55		
60		

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP17
	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Ben Lomond
10	Agente de extracción:	Ninguno- zumo producido, temperatura aumentada y agua añadida para extracción extendida asistida por tratamiento enzimático.
15	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
20	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00039% Ribetril B: 0.00047% Ribetril D: 0.00040% Ribetril E: 0.00016% Ribetrilos totales: 0.00142% Glucoindol A: 0.00105% Glucoindoles totales: 0.00105%
25		

30	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP18
	Material de partida:	Mezcla de RAP16 y RAP17 50:50 (en peso)
35	Agente de extracción:	N/A
40	Método de concentración de la fracción alcaloide:	N/A
45	Concentración en el producto final (p/p):	N/A

50

55

60

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP19
10	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivares: Mezcla de Ben Tron, Ben Cannon, Ben Lomond, Ben Alder y Ben Tirran. El bagazo se secó antes del procesamiento adicional.
15	Agente de extracción:	Mezcla de etanol 50- 70% y agua (en volumen).
20	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
25	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00247% Ribetril B: 0.00024% Ribetril C: 0.00090% Ribetril D: 0.00118% Ribetril E: 0.00370% Ribetrilos totales: 0.00849% Glucoindol A: 0.00849% Glucoindoles totales: 0.00849%

35	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP20
40	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivar: Mezcla de Ben Tron, Ben Cannon, Ben Lomond, Ben Alder y Ben Tirran. El bagazo se secó antes del procesamiento adicional.
45	Agente de extracción:	Mezcla de etanol 50- 70% y agua (en volumen).
50	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
55	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00232% Ribetril B: 0.00024% Ribetril C: 0.00086% Ribetril D: 0.00112% Ribetril E: 0.00348% Ribetrilos totales: 0.00802% Glucoindol A: 0.00271% Glucoindoles totales: 0.00271%

65

ES 2 721 278 T3

5	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP21
10	Material de partida:	<i>Ribes nigrum</i> - Cultivares: Mezcla de Ben Tron, Ben Cannon, Ben Lomond, Ben Alder y Ben Tirran. El bagazo se secó antes del procesamiento adicional.
15	Agente de extracción:	Mezcla de acetona 50- 70% y agua (en volumen).
20	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
25	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00216% Ribetril B: 0.00022% Ribetril C: 0.00080% Ribetril D: 0.00105% Ribetril E: 0.00323% Ribetrilos totales: 0.00746% Glucoindol A: 0.00259% Glucoindoles totales: 0.00259%

35	Número de producto alcaloide de Ribes:	RAP22
40	Material de partida:	<i>Ribes rubrum</i> - Cultivares: Mezcla de Rondum, Rovada y Rosetta. El bagazo se secó antes del procesamiento adicional.
45	Agente de extracción:	2-propanol
50	Método de concentración de la fracción alcaloide:	Centrifugación y filtración seguido de secado.
55	Concentración en el producto final (p/p):	Ribetril A: 0.00075% Ribetril B: 0.00060% Ribetril D: 0.00118% Ribetril E: 0.00271% Ribetrilos totales: 0.00524% Glucoindol A: 0.01229% Glucoindol B: 0.00365% Glucoindoles totales: 0.01594%

60

65

Ejemplo 2

Objetivo

5 El objetivo de este estudio fue probar la viabilidad de diferentes proporciones de mezclas de concentrados/extractos de *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* simplemente probando la estabilidad de dichas mezclas después de 3 meses de exposición a temperatura ligeramente elevada (40 grados C).

Método

10 Se prepararon RAP16 y RAP17 en el ejemplo 1.

Se prepararon 10 g de mezclas de RAP16 y RAP17 en las proporciones que se muestran en la tabla siguiente:

15

RAP16 % (en peso)	RAP17% (en peso)
5	95
10	90
15	85
20	80
25	75
30	70
35	65
40	60
45	55
50	50
55	45
60	40
65	35
70	30
75	25
80	20
85	15
90	10
95	5

55

Todas las muestras se almacenaron en recipientes de vidrio estériles durante 90 días a temperatura elevada (40 grados C).

60 Se estableció un perfil químico de todas las muestras antes y después de 90 días de almacenamiento empleando el método HPLC-DAD-MS descrito en el Ejemplo 1.

Resultados

65 Se compararon los perfiles químicos de cada mezcla de RAP16 y RAP17 antes y después del

almacenamiento a temperatura elevada. No se observaron diferencias.

Conclusión

5 Todas las mezclas probadas de RAP16 y RAP17 se encontraron estables, por lo que las diferencias en el perfil químico de *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* no tuvieron una influencia negativa en el potencial de combinarlas con respecto a la estabilidad.

10 Ejemplo 3

Objetivo

15 El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto inhibitor in vitro de los alcaloides aislados sobre la IκappaB quinasa β (IKK-β).

Antecedentes

20 IKK-β fosforila la proteína inhibidora IκB inhibidora asociada con NF-κB. La fosforilación da como resultado la disociación de IκB de NF-κB, lo que permite que NF-κB migre hacia el núcleo celular donde puede activar la transcripción de por lo menos 150 genes. El Kit de ensayo de quinasa Z9-LYTE™ - Péptido Ser/Thr 5 está diseñado para detectar el posible efecto inhibitor de IKK-β usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre cumarina y fluoresceína para su detección por un fluorómetro.

25 Método

30 El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo de el Kit de ensayo de quinasa Z9-LYTE™ - Péptido Ser/Thr 5 proporcionado por Invitrogen [Invitrogen, Protocolo de Kit de ensayo de quinasa Z'-LYTE™ - péptido Ser/Thr 5, O-062187-r1 US 0405]. En base al certificado IKK-β del kit, se eligió una concentración de quinasa de 500 ng/ml. Se eligió Km para ATP 9,4 μM de acuerdo con una optimización para el ensayo de quinasa LanthaScreen™ [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/IKKBK_beta%29_LanthaScreen_Activity.pdf].

Configuración de instrumentos

35 Se usó un lector de placas de fluorescencia (Appliskan, Thermo Scientific) para detectar señales de emisión de fluorescencia de acuerdo con los siguientes parámetros:

Parámetro	Especificación
Excitación	Filtro de 400 nm (Ancho de banda 30nm)
Emisión	520 nm (Ancho de banda 25 nm)
Emisión	445 nm (Ancho de banda 10 nm)
Tiempo de Retardo	100 μs
Tiempo de integración	200 μs
Tiempo de medición	10000 ms

55 Compuestos de prueba

Los alcaloides seleccionados de la invención preparados en el ejemplo 1 se probaron en diluciones 5 veces para establecer la concentración inhibitora del 50% (IC-50).

60 Resultados

Efecto inhibitor sobre IKK-β

Alcaloide	IC-50
Ribetril A	0.13 μM
Ribetril B	6.3 μM
Ribetril C	15.3 μM
Ribetril D	0.037 μM
Ribetril E	1.9 μM

Conclusión

En comparación con los dos alcaloides más estrechamente relacionados con el mismo esqueleto de ácido fenil-acrílico, Ribetril A fue un inhibidor significativamente más potente de IKK- β . Por lo tanto, Ribetril A mostró una IC-50 48 y 118 veces menor en comparación con Ribetril B y Ribetril C, respectivamente.

En conclusión, todos los alcaloides probados mostraron una inhibición dependiente de la dosis y significativa de IKK- β a concentraciones fisiológicamente relevantes.

Referencias

1. Rodems 2002, ASSAY Drug Devel Technol; 1:9-19.
2. Kleman-Leyer 2003, Drug Disc Devel; 6:81-2.
3. Zhang 1999, J Biomol Screen; 4:67-73.
4. Davies 2000, Biochem J; 351:95-105.
5. Chijiwa 1990, J Biol Chem; 265: 5267-72.

Ejemplo 4

Objetivo

El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto inhibitor in vitro de los alcaloides sobre la fosfodiesterasa 4 (PDE4).

Antecedentes

La PDE4 hidroliza el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) al monofosfato de adenosina inactivo (AMP). La inhibición de PDE4 bloquea la hidrólisis de cAMP, aumentando de este modo los niveles de cAMP. El kit de ensayo PDE4A1A está diseñado para la identificación de los inhibidores de PDE4A1A usando polarización de fluorescencia. El ensayo se basa en la unión de AMP fluorescente generado por PDE4A1A al agente de unión.

Método

El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del ensayo PDE4A1A proporcionado por BSP Bioscience [BSP Bioscience, hoja de datos del kit de ensayo PDE4A1A, N° de catálogo 60340].

Configuración de instrumentos

Se usó un lector de placas de fluorescencia (Appliskan, Thermo Scientific) para detectar señales de emisión de fluorescencia de acuerdo con los siguientes parámetros:

Parámetro	Especificación
Excitación	Filtro de 485 nm
Emisión	530 nm (Ancho de banda 9 nm)
Tiempo de Medición	500 ms

Compuestos de prueba

Los alcaloides seleccionados de la invención preparados en el ejemplo 1 se probaron en diluciones 5 veces para establecer la concentración inhibidora del 50% (IC-50).

ResultadosEfecto inhibidor sobre PDE4

Alcaloide	IC-50
Ribetril A	2.951 μ M
Ribetril B	14.01 μ M
Ribetril C	59.71 μ M
Ribetril D	0.231 μ M
Ribetril E	3.5 μ M
Glucoindol A	86.1 μ M
Glucoindol B	45.6 μ M

Conclusión

En comparación con los dos alcaloides más estrechamente relacionados con el mismo esqueleto de ácido fenil-acrílico, el Ribetril A fue un inhibidor significativamente más potente de la PDE4. Por tanto, el Ribetril A mostró una IC-50 5 y 20 veces menor en comparación con Ribetril B y Ribetril C, respectivamente.

En conclusión, todos los alcaloides probados de la invención mostraron una inhibición dependiente de la dosis y significativa de PDE4 a concentraciones fisiológicamente relevantes.

Referencia

Goldhoff 2008, Clin Cancer Res; 14(23):7717-25.

Ejemplo 5Objetivo

El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto inhibidor in vitro de los alcaloides sobre la fosfodiesterasa 5A (PDE5).

Antecedentes

La PDE5 hidroliza el monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) a 5'-GMP inactivo. La inhibición de la PDE5 bloquea la hidrólisis de cGMP, aumentando de este modo los niveles de cGMP. El kit de ensayo PDE5A está diseñado para la identificación de los inhibidores de PDE5A usando polarización de fluorescencia. El ensayo se basa en la unión de un monofosfato de nucleótido fluorescente generado por PDE5A al agente de unión.

Método

El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del ensayo PDE5A proporcionado por BSP Bioscience [BSP Bioscience, hoja de datos del kit de ensayo PDE5A, N° de catálogo 60350].

Configuración de instrumentos

Se usó un lector de placas de fluorescencia (Appliskan, Thermo Scientific) para detectar señales de emisión de fluorescencia de acuerdo con los siguientes parámetros:

Parámetro	Especificación
Excitación	Filtro de 485 nm
Emisión	530 nm (Ancho de banda 9 nm)
Tiempo de medición	500 ms

Compuestos de prueba

Los alcaloides seleccionados en el ejemplo 1 se probaron en diluciones 5 veces para establecer la concentración inhibidora del 50% (IC-50).

Resultados

Efecto inhibidor sobre PDE5.

Alcaloide	IC-50
Ribetril A	2.1 μ M
Ribetril B	5.4 μ M
Ribetril C	17.2 μ M
Ribetril D	<0.04 μ M
Ribetril E	3.4 μ M

Conclusión

En comparación con los dos alcaloides más estrechamente relacionados con el mismo esqueleto de ácido fenil-acrílico, el Ribetril A fue un inhibidor significativamente más potente de la PDE5. Por tanto, el Ribetril A mostró una IC-50 3 y 8 veces menor en comparación con Ribetril B y Ribetril C, respectivamente.

En conclusión, todos los alcaloides probados mostraron una inhibición dependiente de la dosis y significativa de PDE5 a concentraciones fisiológicamente relevantes.

Referencias

Maurice 2005, Front Biosci; 10:1221-8.

Ejemplo 6

Objetivo

El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto de dos fracciones de alcaloides de *Ribes*, RAP13 y RAP14 sobre la biogénesis mitocondrial en miotubos C2C12 de ratón. La célula C2C12 es una línea celular de mioblasto de ratón que se puede diferenciarse en miotubos que tienen una alta capacidad aeróbica que se asemeja a músculos que trabajan que tienen una gran necesidad de energía.

Método

Se prepararon RAP13 y RAP14 en el ejemplo 1 y comprendieron los siguientes alcaloides:

Alcaloides RAP13

Ribetril A: 3.3%

Ribetril B: 2.4%

Ribetril D: 5.4%

Ribetril E: 12.8%

Glucoindol A: 58.8%

Glucoindol B: 17.3%

Alcaloides RAP14

Ribetril A: 21.7%

Ribetril B: 1.3%

Ribetril C: 7.5%

Ribetril D: 10.3%

Ribetril E: 33.0%

Glucoindol A: 26.2%

Para la dosificación en medio celular, los alcaloides RAP13 y los alcaloides RAP14 se disolvieron en etanol al 10% (vol) y se añadió un volumen del 1% para obtener la concentración deseada y una concentración final de etanol del 0,1% (no citotóxico) en el medio de incubación. Se cultivaron células C2C12 no diferenciadas (mioblastos) en medio de cultivo de células basales (Medio de Eagle modificado de Dulbecco - glucosa alta (Sigma Aldrich, D0819), con 4500 mg/l de glucosa, L-alanil-glutamina y bicarbonato de sodio, sin piruvato de sodio con FBS al 10% (lote: 0739L), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos celulares se incubaron a 37° C en una atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Se sembraron 30.000 células en placas de 3,5 cm y se expusieron a 25 o 50 ng/ml de alcaloides RAP13 o alcaloides RAP14 en determinaciones dobles/triples al día siguiente y se incubaron durante 48 horas. Por comparación, también se incubaron controles no tratados y controles positivos (resveratrol 30 µM y piruvato 50 mM). Después de la incubación, las células se liberaron de las placas y se tripsinizaron, se lavaron en medio y se resuspendieron en solución salina tamponada de Hank con 0,06 µM de Mito Tracker Green (MTG). Las células se incubaron con MTG durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia se determinó usando FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia). El nivel de fluorescencia se estimó como la media geométrica de la media de la señal restada la auto-fluorescencia (estimada a partir de controles no teñidos). El análisis estadístico se realizó con una prueba t de Student.

Resultados

Usando MTG, se encontró un nivel aumentado de mitocondrias en células C2C12 expuestas a alcaloides RAP13 o alcaloides RAP14 a 25 y 50 ng/ml durante 48 horas en comparación con el control no tratado. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para 25 ng/ml de alcaloides RAP13 y estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para 25 ng/ml y 50 ng/ml de alcaloides RAP14. Los resultados se resumen en la Figura 4.

Conclusión

En miotubos C2C12, los alcaloides RAP13 y los alcaloides RAP14 fueron capaces de aumentar significativamente la biogénesis mitocondrial a concentraciones fisiológicamente relevantes. El aumento de la biogénesis mitocondrial en las células musculares es altamente relevante cuando se necesita una capacidad aumentada para manejar las condiciones estresantes y/o la necesidad de alta energía en los músculos que trabajan, o cuando una disminución en la cantidad y función mitocondrial debido a la inactividad, enfermedad o edad está deteriorando la funcionalidad de las células musculares.

Ejemplo 7

Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos fracciones de alcaloides de *Ribes*, RAP13 y RAP14 sobre la capacidad respiratoria de reserva en miotubos C2C12 de ratón expuestos a una prueba de estrés mitocondrial estandarizada. El modelo proporciona información valiosa sobre la funcionalidad de las mitocondrias en las células musculares mediante la cuantificación de la capacidad mitocondrial para aumentar la producción de ATP por encima del nivel básico bajo condiciones de estrés máximo.

Método

Se prepararon RAP13 y RAP14 en el ejemplo 1 y comprendían los siguientes alcaloides:

Alcaloides RAP13

Ribetril A: 3.3%

Ribetril B: 2.4%

Ribetril D: 5.4%

Ribetril E: 12.8%

Glucoindol A: 58.8%

Glucoindol B: 17.3%

Alcaloides RAP14

Ribetril A: 21.7%
 Ribetril B: 1.3%
 Ribetril C: 7.5%
 Ribetril D: 10.3%
 Ribetril E: 33.0%
 Glucoindol A: 26.2%

5
 10
 15
 20
 25

Para la dosificación en medio celular, los alcaloides RAP14 y los alcaloides RAP14 se disolvieron en etanol al 10% (vol) y se añadió un volumen del 1% para obtener la concentración deseada y una concentración final de etanol del 0,1% (no citotóxico) en el medio de incubación. Las células C2C12 se propagaron en medio de cultivo celular durante 6 días con compuestos de Asiros incluidos en el medio de cultivo celular. Tanto los alcaloides RAP13 como los alcaloides RAP14 se analizaron a cuatro concentraciones (50 ng/ml, 16,7 ng/ml, 5,6 ng/ml y 1,9 ng/ml) en ocho repeticiones. El medio de cultivo de células basales consistió en medio de Eagle modificado de Dulbecco, sin glucosa (DMEM, Life Technologies, 11966) suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, piruvato de sodio 1 mM y 1 g/l de d-glucosa. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37° C en una atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO2. El medio se cambió cada 48 h (con la adición nueva de compuestos de ensayo en cada cambio de medio). En el día 6 del cultivo, las células se volvieron a colocar en placas de ensayo Seahorse (8 repeticiones por compuesto) a una densidad de 12.000 células por pocillo. El día de la medición de Seahorse (día 7), el medio se cambió al medio de ensayo XF (DMEM modificado libre de HCO3, Seahorse Bioscience), que se suplementó con L-glutamina 4 mM y piruvato 1 mM. El pH del medio se ajustó a 7,4 a 37° C. La prueba de Estrés XF Cell Mito se realizó en un analizador de flujo extracelular XF96 (Seahorse Bioscience) mediante adiciones secuenciales de oligomicina 1 µM, FCCP 0,4 µM y rotenona/antimicina A 1 µM, de acuerdo con las instrucciones de XF96 del Manual del Usuario de la prueba de estrés Seahorse Bioscience XF Cell Mito. Se aplicó una prueba ANOVA seguida de la prueba de Dunnett para la prueba de diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05. Los valores atípicos se excluyeron del análisis.

Resultados

30
 35

Los alcaloides RAP13 aumentaron significativamente la capacidad respiratoria de reserva de las células C2C12 expuestas a una prueba de estrés mitocondrial estandarizada a todas las dosis probadas (50 ng/ml, 16,7 ng/ml, 5,6 ng/ml y 1,9 ng/ml) en comparación con el control tratado con vehículo. Para los alcaloides RAP14, hubo una clara tendencia hacia la capacidad respiratoria de reserva elevada a todas las dosis probadas, con una elevación significativa en las dos dosis más altas (50 ng/ml y 16,7 ng/ml).

Los resultados se resumen en las tablas siguientes:

Capacidad respiratoria de reserva (RAP13)

40
 45
 50

Tratamiento	n	Media	95% CI	SE	SD
Control	7	101.721	90.538 a 112,905	4.5705	12.0924
RAP13 -50 ng/ml	8	124.310*	115.093 a 133,527	3.8978	11.0245
RAP13 - 16.7 ng/ml	8	123.388*	113.866 a 132,909	4.0266	11.3890
RAP13 - 5.6 ng/ml	8	124.891*	117.758 a 132,025	3.0167	8.5324
RAP13- 1.9 ng/ml	8	122.189*	103.596 a 140,781	7.8627	22.2391

* P<0.05

Capacidad respiratoria de reserva (RAP14)

60

65

Tratamiento	n	Media	95% CI	SE	SD
Control	7	101.721	90.538 a 112.905	4.5705	12.0924
RAP14- 50 ng/ml	8	120.474*	110.607 a 130.340	4.1726	11.8020
RAP14- 16.7 ng/ml	8	121.323*	109.361 a 133.284	5.0586	14.3078
RAP14- 5.6 ng/ml	8	111.145	102.695 a 119.595	3.5733	10.1069
RAP14- 1.9 ng/ml	7	117.294	110.660 a 123.929	2.7114	7.1738

15 *P<0.05

15 Conclusión

20 En miotubos C2C12, los alcaloides RAP13 y los alcaloides RAP14 fueron capaces de aumentar significativamente la capacidad respiratoria de reserva mitocondrial a concentraciones fisiológicamente relevantes bajas. Los miotubos C2C12 tienen una alta capacidad aeróbica que se asemeja a la fisiología en los músculos que trabajan. Bajo ciertas condiciones, un tejido puede requerir una explosión repentina de energía celular adicional en respuesta al estrés o a una carga de trabajo aumentada, y esta respuesta depende de la capacidad respiratoria de reserva del tejido. Si la capacidad respiratoria de reserva de las células no es suficiente para proporcionar el ATP requerido, las células afectadas funcionarán de manera subóptima e incluso correrán el riesgo de ser llevadas a la senescencia o la muerte celular. Por lo tanto, una capacidad respiratoria de reserva aumentada en las células musculares es extremadamente valiosa para mejorar la resistencia en la función y la capacidad muscular, la resistencia al estrés así como contrarrestar los efectos de la senescencia y la inactividad.

30 Ejemplo 8

30 Objetivo

35 El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la fracción de alcaloide de *Ribes*, RAP15 sobre la capacidad respiratoria de reserva en miotubos C2C12 de ratón expuestos a estrés mitocondrial.

40 Método

40 Se preparó RAP15 en el ejemplo 1 y comprendía los siguientes alcaloides:

40 **Alcaloides RAP15**

Ribetril A: 16.0%

Ribetril B: 2.3%

Ribetril C: 4.9%

45 Ribetril D: 16.4%

Ribetril E: 15.5%

Glucoindol A: 31.0%

Glucoindol B: 13.9%

50 Todos los procedimientos fueron idénticos al método descrito en el ejemplo 7. Los alcaloides RAP15 se probaron en dos concentraciones, 20 ng/ml y 4 ng/ml, ambas en ocho repeticiones. Se aplicó una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett para la prueba de diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05. Los valores atípicos fueron excluidos del análisis.

55 Resultados

60 Los alcaloides RAP15 aumentaron significativamente la capacidad respiratoria de reserva de las células C2C12 expuestas a una prueba de estrés mitocondrial estandarizada a las dosis probadas en comparación con los controles.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Capacidad respiratoria de reserva (RAP15)

65

Tratamiento	n	Media	95%CI	SE	SD
Control	6	138.862	130.180 a 147.544	3.3774	8.273
RAP15 - 20 ng/ml	8	169.114*	160.519 a 177.709	3.6349	10.281
RAP15 - 4 ng/ml	8	181.275*	158.437 a 204.113	9.6581	27.317

*P<0.05

Conclusión

En miotubos C2C12 los alcaloides RAP15 fueron capaces de aumentar significativamente la capacidad respiratoria de reserva mitocondrial a concentraciones fisiológicamente relevantes comparables a las dosis probadas anteriormente de fracciones de alcaloide de *Ribes* similares de acuerdo con la invención.

Ejemplo 9

Objetivo

El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto hipocolesterolémico de dos composiciones diferentes de alcaloides de *Ribes*, RAP2 y RAP4, en cobayas hiperlipidémicas inducidas por una dieta rica en grasas.

Compuestos de prueba y productos químicos

El concentrado de alcaloide de *Ribes*, RAP2 y el extracto de alcaloide de *Ribes*, RAP4, se produjeron en el ejemplo 1. Se disolvieron/suspendieron RAP2 y RAP4 en metilcelulosa al 0,5% mediante sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C. Se usó atorvastatina como el compuesto de referencia hipocolesterolémico. El vehículo era metilcelulosa al 0,5%.

Procedimiento experimental

Se aclimataron cobayas Dunkin-Hartley macho con un peso de 300 +/- 30 g una semana antes de la fase de vida del experimento. La dieta del estudio (Research Diets Inc, New Brunswick, NJ, USA) contenía un 15% de aceite de maíz y un 0,25% de colesterol. Se administró por vía oral una dosis oral diaria de 2000 mg/kg de RAP2 correspondiente a 9 µg/kg de Ribetril A y 82 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 632 µg/kg de Glucoindoles totales por vía oral a un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Se administró por vía oral una dosis oral diaria de 2000 mg/kg de RAP4 correspondiente a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 240 µg/kg de Glucoindoles totales a un volumen de dosificación de 10 ml/kg. El control positivo atorvastatina (10 mg/kg) y el vehículo (metilcelulosa al 0,5%) se administraron cada uno por vía oral a un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Los compuestos de prueba, el compuesto de referencia o el vehículo se administró por alimentación forzada oral a grupos de 6 animales una vez al día durante 28 días consecutivos.

Después del ayuno durante la noche, se obtuvieron muestras de sangre del seno retro-orbital de cada animal 5 minutos antes de la administración de la sustancia de prueba inicial y/o del vehículo (pre-tratamiento) y 24 horas después de la dosificación los días 14 y 28 (post-tratamiento). El colesterol total en suero (TC), el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y los triglicéridos (TG) se determinaron mediante un método enzimático (colesterol total de Wako, Kit de diagnóstico LDL-C, HDL-C & TG y analizador automático Toshiba modelo TAB-120FR).

Resultados

Después de 28 días de tratamiento, los animales tratados con RAP2 mostraron una reducción del 45% de los niveles de triglicéridos (P<0,05), una disminución del 36% del colesterol en suero (P<0,05) y una disminución del 35% de LDL (P<0,05) en comparación con el grupo tratado con vehículo. Después de solo 15 días, los animales tratados con RAP4 mostraron una reducción del 32% de los niveles de triglicéridos (P<0,05), que se incrementó aún más a una reducción del 50% después de 28 días de tratamiento en comparación con el grupo de control del vehículo (P<0,05). Sorprendentemente, el grupo tratado con RAP4 mostró una disminución del 40% del colesterol total en suero (P<0,05) y una disminución del 39% de LDL (P<0,05) después de 28 días de tratamiento, que fue del mismo orden de magnitud que el control positivo atorvastatina.

Conclusión

En términos de reducción de triglicéridos, tanto RAP2 como RAP4 fueron completamente superiores a la atorvastatina al mostrar un inicio rápido y una reducción de triglicéridos significativa, mientras que la atorvastatina no redujo significativamente los triglicéridos. Además, tanto RAP2 como RAP4 fueron comparables a la atorvastatina en sus considerables efectos reductores sobre el colesterol total y LDL después de 28 días de tratamiento. El inicio de acción más rápido y el mayor efecto de RAP4 en comparación con RAP2 podrían deberse a su contenido significativamente más alto de Ribetril A, ya que el contenido total de alcaloides era casi el mismo en las composiciones.

10 Referencias

1. Aoki 2001, *Arzneim-Forsch./Drug Res*;51(l) 197-203, 2001.
2. Van 2001, *Diabetes*;50:1330-1335.
3. Bensch 1999, *J Pharmacol Exp Ther*; 289: 85-92.
4. Daggy 1997, *J Lipid Res*; 38: 491-502.

Ejemplo 10

20 Objetivo

El objetivo de este estudio fue la investigación del efecto hipoglucémico de la composición de alcaloides de *Ribes* RAP4 en ratones BKS Cg-Lepr db/Lepr db, un modelo de diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM).

25 Compuestos de prueba y productos químicos

El extracto de alcaloide de *Ribes* RAP4 se produjo en el ejemplo 1. se disolvió/suspendió RAP4 en Tween 80 al 2% mediante sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C. Se usó metformina como el compuesto de referencia antidiabético.

30 Procedimiento experimental

Se usaron ratones mellitus diabéticos no dependientes de insulina (NIDDM) macho (BKS Cg-Lepr db/Lepr db) con un peso de 50+/-5 g a la edad de 12-13 semanas. Se administró por vía oral una dosis oral diaria de 2000 mg/kg de RAP4 correspondiente a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 240 µg/kg de Glucoindoles totales, a un volumen de dosificación de 10 ml/kg a 12 animales durante un total de 14 días consecutivos. El control positivo de metformina (300 mg/kg) y vehículo (Tween 80 al 2%) se administró cada uno por vía oral a un volumen de dosificación de 10 ml/kg a grupos de 6 animales una vez al día durante un total de 14 días consecutivos. Los niveles de glucosa en suero se midieron por medio de un analizador automatizado (TBA-120FR, Toshiba) e insulina en suero mediante ELISA a los cero minutos (pre-tratamiento) en el día 1, y a los 90 minutos después de la dosificación diaria (post-tratamiento) en el día 7 y día 14.

45 Resultados

La administración oral de RAP4 durante 14 días consecutivos se asoció con una disminución significativa en los niveles de glucosa en suero en el día 14 después de la dosificación, en relación con el control del vehículo en el modelo de ratón Lepr db ($P < 0,05$), que también fue el caso con el control positivo de metformina a 300 mg/kg ($P < 0,05$). No se observó disminución en los niveles de insulina.

50 Conclusión

Los datos muestran que la composición de alcaloides de *Ribes* fue capaz de inducir una reducción significativa del azúcar en sangre en el día 14 ($P < 0,05$) sin afectar los niveles de insulina.

55 Referencias

- Johnson 1993, *Diabetes*; 42:1179-1186, 1993.

Ejemplo 11

60 Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de una composición de alcaloide de *Ribes* sobre la curación de heridas en ratones ICR normales con lesión cutánea por escisión en dos estudios idénticos pero independientes.

Compuestos de prueba y productos químicos

5 El extracto de alcaloide de *Ribes* RAP4 se produjo en el ejemplo 1. Se disolvió/suspendió RAP4 en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% mediante sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C.

Procedimiento experimental

10 Se usaron grupos de 6 ratones ICR macho que pesaban 24+/-2 g. Los animales se pretrataron con vehículo (CMC al 0,5%) y 2000 mg/kg de RAP4 correspondientes a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 240 µg/kg de Glucoindoles por alimentación forzada durante siete días consecutivos antes de la lesión cutánea por escisión (Día 1). Los animales se alojaron en jaulas individuales a lo largo del estudio. Bajo anestesia con gas isoflurano, se afeitó la región del hombro y la espalda de cada animal. Se aplicó un cuchillo de biopsia con punzón afilado (ID 12 mm) para eliminar la piel, incluyendo el panículo carnoso y los tejidos adherentes. El área de la herida, trazada en láminas de plástico transparente, se midió mediante el uso de un analizador de imágenes ProPlus (Media Cybernetics, versión 4.5.0.29) en los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Se administraron RAP4 y vehículo (CMC al 0,5%) mediante alimentación forzada oral 1 hora antes de la lesión y una vez al día posteriormente durante un total de 10 días consecutivos. Se calculó el porcentaje de cierre de la herida (%) y se analizó el tiempo de cierre de media herida (CT50) mediante regresión lineal usando Graph-Prism (Graph Software USA). Se aplicó la prueba t de Student no pareada para la comparación entre los grupos tratados y de vehículo en cada punto temporal de medición. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05.

Resultados

25 La administración oral de RAP4 promovió significativamente la curación de heridas en ratones con lesión cutánea por escisión con un inicio de la acción temprano, lo que dio como resultado una reducción significativa en el valor de CT50 en relación con el control del vehículo. CT50 fue de 5,9 días para RAP4 y de 8,3 días para el grupo tratado con vehículo. Tres días después de la lesión por escisión, el grado de cierre de la herida fue un 78% mayor en el grupo tratado con *Ribes* en comparación con el grupo tratado con vehículo y después de 5 días el grado de cierre de la herida fue más del doble en el grupo tratado con *Ribes* en comparación con el grupo tratado con control de vehículo.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

35

Tratamiento	Vía	Dosis	Cierre de la Herida (%)							CT ₅₀
			Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11 (Días)		
Vehículo (0.5% CMC)	PO	10 ml/kg × 17	Media	0.0	19.9	19.0	42.1	59.9	69.3	8.3
			SEM	0.0	3.0	4.3	3.6	3.2	5.2	0.5
RAP4	PO	2000 mg/kg × 17	Media	0.0	35.4*	45.8*	63.1*	76.5*	87.0*	5.9*
			SEM	0.0	3.6	3.6	3.4	3.5	1.8	0.3

*P<0,05

50 El estudio se repitió con exactamente el mismo diseño de estudio. Los resultados fueron muy similares al estudio anterior, como se resume en la tabla siguiente:

55

Tratamiento	Vía	Dosis	Cierre de la Herida (%)							CT ₅₀
			Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11 (Días)		
Vehículo (0.5% CMC)	PO	10 ml/kg × 17	Media	0.0	18.0	27.1	42.2	60.6	67.1	8.2
			SEM	0.0	2.6	2.3	3.4	4.7	4.2	0.5
RAP4	PO	2000 mg/kg × 17	Media	0.0	34.2*	43.7*	62.0*	77.9*	84.6*	6.0*
			SEM	0.0	2.0	2.9	1.8	3.1	1.4	0.2

*P<0,05

65

Conclusión

Los resultados de los presentes experimentos confirmaron de manera convincente el efecto promotor de curación de heridas de una composición de alcaloides de *Ribes* administrada por vía oral.

Referencias

Montesinos 1997, J Exp Med;186:1615-1620, 1997.

Ejemplo 12Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de dos composiciones de alcaloides de *Ribes*, RAP4 y RAP16, sobre la curación de heridas en ratones ICR normales con lesión cutánea por escisión. La configuración del estudio fue similar al diseño del estudio, similar al ejemplo 7 que investiga una potencial respuesta a la dosis si el pretratamiento influyó en el resultado.

Procedimiento experimental

Los extractos de alcaloide de *Ribes* RAP4 y RAP 16 se produjeron en el ejemplo 1. Se disolvieron/suspendieron RAP4 y RAP16 en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% mediante sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C. Las sustancias de prueba (RAP4: 2000 mg/kg correspondiente a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos total, así como 240 µg/kg de Glucoindoles totales, (RAP16: 2000 mg/kg correspondiente a 3 µg/kg de Ribetril A y 18 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 97 µg/kg de Glucoindoles totales y vehículo (0,5% de CMC) se administraron mediante alimentación forzada oral a ratones ICR machos normales una vez al día comenzando 7 días antes hasta 10 días después de una punción de 12 mm en la piel para un total de 17 días consecutivos. Un grupo separado se trató con RAP4 durante 10 días sin 7 días de dosificación antes de la herida. Se determinaron el porcentaje de cierre de la herida (%) en los días 3, 5, 7, 9 y 11, y el tiempo de cierre de media herida (CT50). Se aplicó una prueba ANOVA seguida de la prueba de Dunnett para probar la diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05.

Resultados

La administración oral de RAP4 promovió significativamente la curación de heridas en ratones pretratados durante 7 días antes de la lesión cutánea por escisión con un inicio de la acción temprano, lo que dio como resultado una reducción significativa en el valor de CT50 en relación con el control de vehículo. CT50 fue de 7,1 días para RAP4 y 9,3 días para el grupo tratado con vehículo. El grupo de ratones que no recibió pretratamiento con RAP4 también mostró una curación de la herida significativamente más rápida (CT50 7,2), que era similar al grupo pretratado, lo que demuestra que el pretratamiento no es necesario para obtener el efecto promotor de curación de heridas de la composición de alcaloide de *Ribes* RAP4. Otro grupo de ratones recibió otra composición de alcaloide de *Ribes* RAP16. Este grupo también mostró una curación de heridas significativamente mejorada con un valor CT50 de 7,9 días, que demuestra el efecto de otra formulación de alcaloide de *Ribes* sobre la curación de heridas. Sin embargo, el efecto de RAP16 fue significativamente menor que el efecto de RAP4 correspondiente a niveles mucho más bajos de alcaloides de *Ribes* en RAP16 en comparación con RAP4, indicando una respuesta a la dosis de los alcaloides de *Ribes*.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

	Tratamiento	Vía	Dosis		Cierre de la Herida (%)							CT ₅₀
					Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11 (Días)		
5	Vehículo (0,5% CMC)	PO	10 ml/kg	Media	0.0	13.1	13.7	30.9	48.2	67.7	9.3	
			qd × 17	SEM	0.0	1.7	2.6	3.1	3.3	3.6	0.3	
10	RAP16	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	18.1	28.8*	39.2	60.2*	73.5	7.9*	
			qd × 17	SEM	0.0	2.3	2.3	2.8	1.7	1.7	0.2	
15	RAP4	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	21.2	37.4*	47.8*	63.2*	79.6*	7.1*	
			qd × 17	SEM	0.0	2.1	2.1	2.0	2.4	1.4	0.1	
20	RAP4	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	20.1	37.1*	48.8*	65.3*	80.6*	7.0	
			qd × 10	SEM	0.0	2.8	4.3	1.4	1.5	1.5	0.2	

*P<0,05

Conclusión

Los resultados del presente experimento demostraron el efecto promotor de curación de heridas de dos formulaciones diferentes de las composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral. Los resultados indicaron una respuesta a la dosis dependiente del nivel/dosificación de los alcaloides. Además, se demostró claramente que el pretratamiento antes de la curación de la herida no es necesario para obtener un efecto significativo de curación de heridas de una composición de alcaloides de *Ribes* administrada por vía oral de la invención.

Referencias

Montesinos 1997, J Exp Med;186:1615-1620, 1997.

Ejemplo 13

Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de curación de heridas de las composiciones de alcaloides de *Ribes*, RAP16, RAP17 y, RAP18, que es una mezcla (en peso) de 50:50 de RAP-16 y RAP-17, en ratones ICR normales macho con lesión cutánea por escisión. El procedimiento de estudio fue similar a la configuración del estudio en el ejemplo 11.

Procedimiento experimental

Las composiciones de alcaloides de *Ribes* RAP16, RAP 17 y RAP18 se produjeron en el ejemplo 1. Se disolvieron/ suspendieron RAP16, RAP 17 y RAP18 en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% mediante sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C. Las sustancias de prueba (RAP16: 2000 mg/ kg correspondientes a 3 µg/kg de Ribetril A y 18 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 97 µg/kg de Glucoindoles totales), (RAP17: 2000 mg/kg correspondiente a 8 µg/kg de Ribetril A y 28 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 21 µg/kg de Glucoindoles totales, (RAP18: 2000 mg/kg correspondientes a 6 µg/kg de Ribetril A y 23 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 59 µg/kg de Glucoindoles totales) y el vehículo (0,5% de CMC) se administraron por administración forzada oral a ratones ICR macho normales una vez al día, comenzando 7 días antes hasta 10 días después de una punción de 12 mm en la piel durante un total de 17 días consecutivos. Se registró el porcentaje de cierre de la herida (%) en los días 3, 5, 7, 9 y 11, y se determinó el tiempo de cierre de media herida (CT50). Se aplicó una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett para la prueba de diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05. Las diferencias se consideran significativas a P<0,05.

Resultados

La administración oral de RAP16 con el contenido más alto de Glucoindoles promovió significativamente la cicatrización de heridas en ratones pretratados durante 7 días antes de la lesión cutánea por escisión, lo que dio como resultado una reducción significativa en el valor de CT50 (CT50 7,2 días) en relación con el control de vehículo (CT50 7,9 días). La administración oral de RAP17 con el contenido más alto de Ribetrilos promovió la curación de heridas significativamente y en un grado similar al observado con RAP16 (CT50 7,1 días) en otro grupo de ratones

pretratados durante 7 días antes de la lesión cutánea por escisión. Curiosamente, RAP18 (mezcla 50:50 de RAP16 y RAP17) obviamente tenía un contenido más equilibrado de Ribetrilos y Glucoindoles tuvo un efecto de curación de heridas claramente más pronunciado (CT50 6,4 días) en comparación con RAP16 y RAP17, lo que indica un efecto sinérgico entre los Glucoindoles principalmente en RAP16 (derivado de *Ribes rubrum*) y los Ribetrilos principalmente en RAP17 (derivado de *Ribes nigrum*). Esto se destaca aún más por el hecho de que el grado de cierre de la herida en comparación con el control del vehículo fue estadísticamente significativo en todos los 5 días de medición para RAP18 ($p < 0,05$), mientras que RAP16 y RAP17 solo obtienen un efecto significativo en 2 y 1 días, respectivamente.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tratamiento	Vía	Dosis		Cierre de la Herida (%)								CT ₅₀
				Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11 (Días)			
Vehículo (0.5% CMC)	PO	10 ml/kg	Media	0.0	18.9	23.1	41.6	59.5	74.9	7.9		
			SEM	0.0	3.7	3.0	1.2	2.2	2.3	0.2		
RAP16	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	24.0	27.2	43.4	67.7*	82.3*	7.2*		
			SEM	0.0	3.7	3.4	3.9	2.6	1.6	0.3		
RAP17	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	28.5	31.8	50.8*	64.9	76.9	7.1*		
			SEM	0.0	2.0	2.4	1.2	2.2	1.7	0.2		
RAP18	PO	2000 mg/kg	Media	0.0	33.1*	38.8*	57.3*	71.7*	82.7*	6.4*		
			SEM	0.0	2.0	1.2	0.8	1.5	0.8	0.1		

*P<0,05

Conclusión

Los resultados del presente experimento demostraron de manera convincente el efecto promotor de curación de heridas de dos composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral con un alto contenido de Ribetrilos y Glucoindoles, respectivamente. Además, se observó un efecto significativamente mayor con la combinación 50:50, lo que indica un efecto mejorado y potencialmente sinérgico cuando se combinan Ribetrilos. Este resultado forma una sólida justificación para hacer composiciones de alcaloides basadas en combinaciones de *Ribes rubrum* y *Ribes nigrum* debido a su perfil de alcaloides complementarios.

Referencias

Montesinos 1997, J Exp Med;186:1615-1620, 1997.

Ejemplo 14

Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la curación de heridas de dos formulaciones de composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral, RAP4 y RAP16, en ratones db/db diabéticos, que es la cepa de ratón diabético con las heridas más difíciles de curar.

Procedimiento experimental

El procedimiento experimental fue casi idéntico al descrito en el ejemplo 7. En resumen, se usaron ratones db/db macho mellitus diabéticos no dependientes de insulina (NIDDM) (C57BLKS/J lar- + Leprdb/+ Leprdb), que pesaban 50+/-5 g (~10 semanas de edad), proporcionados por el Instituto para la Reproducción Animal (IAR, Japón). Estos animales muestran hiperglucemia y se usaron entre las 12-13 semanas de edad. Los extractos de alcaloides de *Ribes* RAP4 y RAP 16 se produjeron en el ejemplo 1. Se disolvieron/suspendieron RAP4 y RAP16 en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% por sonicación durante 20 minutos en un baño de agua a 50° C. Las sustancias de prueba (RAP4: 2000 mg/kg correspondiente a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 240 µg/kg de Glucoindoles totales, (RAP16: 2000 mg/kg correspondientes a 3 µg/kg de Ribetril A y 18 µg/kg de Ribetrilos, así como 97 µg/kg de Glucoindoles totales o vehículo (CMC al 0,5%)) se administraron por alimentación forzada oral una vez al día comenzando 7 días antes (pretratamiento), y continuó hasta 15 días después de una biopsia por punción de la piel de 12 mm de diámetro (día de biopsia de la piel designado como Día 1) durante un total de 22 días consecutivos. Se determinaron el porcentaje de cierre de la herida en los días 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14

y 16 y el tiempo de cierre de media herida (CT50). Se aplicó una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett para la prueba de diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideran significativas a $P < 0,05$.

5 Resultados

La administración oral de alcaloides RAP4 y alcaloides RAP16 a 2000 mg/kg q.d. durante 15 días con 7 días de pretratamiento promovió significativamente la curación de heridas en ratones diabéticos con lesión cutánea por escisión en los días 8, 10 o 16, lo que dio como resultado una reducción significativa en el valor de CT50 para RAP4 de 9,6 días y RAP16 de 9,5 días en relación con el control del vehículo (CT50 10,7 días).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tratamiento	Vía	Dosis	Cierre de la Herida (%)										CT ₅₀
			Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16	(Días)		
Vehículo (0.5% CMC)	PO	10 ml/kg	Media	13.7	11.6	8.4	25.9	41.6	63.4	74.6	83.7	10.7	
		qd × 22	SEM	2.6	1.8	1.6	1.5	2.7	3.4	1.8	1.8	0.3	
ASP- 1268	PO	2000 mg/kg	Media	19.1	10.3	15.0	36.9*	54.8*	67.1	80.0	89.1	9.6*	
		qd × 22	SEM	3.4	3.4	3.4	3.1	2.5	2.1	2.6	2.1	0.3	
ASP- 1269	PO	2000 mg/kg	Media	16.0	9.5	12.6	35.6*	55.9*	68.3	81.4	91.0*	9.5*	
		qd × 22	SEM	2.1	2.8	2.7	1.6	1.6	1.1	2.1	1.0	0.2	

* $P < 0.05$

30 Conclusión

Los resultados del presente experimento demostraron de manera convincente el efecto promotor de la curación de heridas de dos composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral diferentes en ratones diabéticos. El efecto observado es convincente en una cepa de ratón que se parece a las heridas crónicas difíciles de curar.

40 Referencias

1. Montesinos 1997, J Exp Med;186:1615-1620, 1997.
2. Botusan 2008, Proc Natl Acad Sci; 105: 19426-19431, 2008.

45 Ejemplo 15

45 Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de curación de heridas de dos formulaciones diferentes de las fracciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral, RAP4 y RAP16, en heridas de biopsia por punción en una especie de ratón diferente caracterizada por piel desnuda y realizada en diferentes localizaciones que los experimentos anteriores en ratones.

50 Procedimiento experimental

Las composiciones de alcaloides de *Ribes* RAP4 y RAP16 se produjeron en el ejemplo 1. RAP4 y RAP16 se formularon en agua desmineralizada a una concentración de 250 mg/ml. El control de vehículo fue agua desmineralizada. Se asignaron aleatoriamente ratones de 12-14 semanas de edad sin pelo pero inmunocompetentes C3.Cg TifBomTac (Taconic, Ry, Dinamarca) hembra (peso medio 25 g) a grupos de tratamiento o de vehículo, cada uno de 10 ratones. Bajo anestesia con Hyponorm Dormicum ligera, se realizaron dos biopsias de punción de 8 mm de grosor completo para extirpar la piel que incluía el panículo carnoso y los tejidos adherentes en el dorso. Se colocó una biopsia a cada lado del dorso. Se administraron sustancias de prueba (RAP4: 2000 mg/kg correspondientes a 112 µg/kg de Ribetril A y 492 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 240 µg/kg de Glucoindoles totales), (RAP16: 2000 mg/kg correspondientes a 3 µg/kg de Ribetril A y 18 µg/kg de Ribetrilos totales, así como 97 µg/kg de Glucoindoles totales o vehículo una vez al día por alimentación forzada oral. Después de la lesión por escisión, todos los grupos fueron tratados durante un total de 14 días consecutivos, incluido el día de la lesión cutánea designado como Día 1. Con anestesia con Hyponorm Dormicum ligera, las heridas se midieron 3 veces a la

semana. El borde de la herida se trazó sobre un portaobjetos de microscopio con un marcador permanente de punta fina. Los trazados se escanearon digitalmente y las áreas de la herida se analizaron y cuantificaron digitalmente (cegadas por el grupo de tratamiento) con ImageJ 1.47q (National Institutes of Health, US). Se aplicó ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett así como la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para la prueba de diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de prueba. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$.

Resultados

La administración oral de RAP4 y RAP16 a 2000 mg/kg/día en ratones sin pelo hembra durante 14 días con 7 días de pretratamiento promovió significativamente la curación de heridas en comparación con el grupo control. La diferencia observada fue altamente significativa estadísticamente para ambas composiciones de alcaloides de *Ribes* en todos los puntos temporales desde el Día 3 hasta el Día 8 (prueba no paramétrica de Mann-Whitney $p < 0,0001$) y significativa en el Día 10: RAP4: $p = 0,028$; RAP16: $p = 0,029$. En el día 8, las heridas en los grupos de tratamiento se habían cerrado casi por completo (89%) en comparación con el 69% en el grupo de Vehículo. Una ANOVA de una vía también demostró significancia en D 3, 5 y 8.

Los resultados se muestran en la Figura 5.

Conclusión

Los resultados del presente experimento demostraron un importante efecto promotor de la curación de heridas de las composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral en ratones hembra sin pelo. El experimento confirma los resultados en la curación de heridas demostrada anteriormente en varios estudios en ratones ICR machos y ratones diabéticos realizados en una localización diferente y con un diseño del estudio diferente, lo que demuestra que el efecto de curación de heridas de las composiciones de alcaloides de *Ribes* administradas por vía oral puede encontrarse a través de variaciones de especies y de género e independientemente de la localización del estudio y el diseño del estudio.

Ejemplo 16

Este ejemplo se refiere a la preparación de un producto nutritivo de acuerdo con la invención (referido como NP1 en lo sucesivo).

Objetivo

Para preparar una composición de producto nutritivo para administración oral que comprende un concentrado de alcaloides de *Ribes*.

Compuestos de prueba y productos químicos.

El concentrado de alcaloides de *Ribes* fue AP16 producido en el ejemplo 1.

Procedimiento experimental

La composición se preparó disolviendo 2000 g de RAP16 en agua purificada ajustada a un volumen total de 4000 ml después de la adición de 2,0 g de sorbato de potasio como conservante.

Resultados

Se obtuvo una formulación líquida fácilmente administrable NP1, estable y adecuada para el consumo diario.

Ejemplo 17

Objetivo

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de un producto nutritivo administrado por vía oral producido en el ejemplo 16, NP1 que comprende alcaloides de *Ribes*, sobre la curación de heridas agudas en un estudio piloto en humanos.

Materiales y procedimiento

La composición de alcaloide de *Ribes* NP1 se produjo en el ejemplo 1 y se formuló para ingesta oral como un líquido rojo claro, almacenado a 4° C. Una dosis diaria de 25 ml de NP1 dos veces al día (mañana y tarde) correspondiente a 30 g de RAP16 correspondiente a 45 µg de Ribetril A, 273 µg de Ribetrilos totales y 1455 µg de

Glucoindoles totales.

El estudio se realizó como un estudio cruzado abierto con dos períodos de heridas secuenciales. A un hombre sano de 45 años de edad con piel normal y sin historial de curación de heridas deteriorada se le realizaron 5
tuvo ocho biopsias de punción de la piel de 3 mm de espesor bajo anestesia local como una línea horizontal en la región glútea justo por encima de la cresta anei. La hemorragia se detuvo con Spongostan y las heridas se cubrieron con un vendaje de espuma Mepilex Border Lite. Las heridas se fotografiaron el día de la biopsia, designado Día 1. Una vez al día durante los siguientes 10 días, se fotografiaron las heridas y se aplicaron 20 µl de carboximetilcelulosa al 0,5%, pH 3.5 durante 20 minutos antes de cubrir las heridas con Mepilex. Después de 7 días de pretratamiento con NP1 administrado por vía oral, que se inició 3 semanas después de las primeras incisiones de la herida, se realizaron ocho nuevas biopsias de punción de piel de 3 mm de grosor total 1 cm por encima de las biopsias anteriores. El día de la incisión de la herida se designó como el día 1. El sujeto del estudio se trató con NP1 administrado por vía oral durante 10 días consecutivos después de las biopsias. Las heridas se trataron y documentaron como en el período de las heridas de control.

Mediciones y estadísticas: en la pantalla del ordenador, las heridas fotografiadas se estandarizaron a una escala de medición fotografiada y los márgenes de la herida se trazaron sobre portaobjetos de microscopio de vidrio transparente y se escanearon digitalmente. Las áreas de las heridas se midieron digitalmente con ImageJ 1.47q (National Institutes of Health, USA) y se calculó el porcentaje de cierre de la herida (%) en los Días 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 en comparación con el día 1. Se usó la prueba t de Student para determinar la diferencia significativa entre las heridas no tratadas y las tratadas. Se establece una diferencia significativa a nivel de $p < 0,05$.

Resultados

El N-P1 administrado por vía oral en un hombre de 45 años de edad con piel normal durante 10 días con 7 días de pretratamiento promovió significativamente la curación de heridas agudas. La curación se promovió con un inicio temprano, acelerando el proceso de calentamiento a partir del día 2.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Día	Sujeto no tratado (control)		Sujeto tratado con NP1 administrado por vía oral	
	Cierre de Heridas (%)	SEM	Cierre de Heridas (%)	SEM
1	0	0	0	0
2	14.8	2.1	30.9*	4.3
3	19.3	7.2	54.8**	4.1
4	31.4	5.1	74.0**	2.9
5	43.1	4.0	79.5**	2.1
6	61.2	4.9	84.3**	2.7
7	63.1	3.8	85.2**	2.6
8	65.0	3.8	86.2**	2.1
9	65.7	4.6	90.8**	2.1
10	70.6	5.4	92.7*	1.8

*P < 0,01 **P < 0,001

Conclusión

Los resultados del presente experimento demostraron un efecto de promoción de curación de heridas significativo de un producto nutritivo administrado por vía oral que comprende los alcaloides de *Ribes*, NP1, en un sujeto humano. El rápido inicio de la promoción de la curación de heridas fue similar a los efectos observados en estudios de ratones de curación de heridas agudas. El estudio demuestra la relevancia de la invención en la

promoción de la curación de heridas en humanos.

Referencia

5 Montesinos 1997, J Exp Med;186:615-1620, 1997.

Ejemplo 18

10 Este ejemplo se refiere a la preparación de un producto nutritivo de acuerdo con la invención (referido como NP2 en los sucesivo).

Objetivo

15 Para preparar una composición de producto nutritivo para administración oral que comprende un concentrado de alcaloides de *Ribes*.

Compuestos de prueba y productos químicos

20 El concentrado de alcaloides de *Ribes* fue RAP4 producido en el ejemplo 1.

Procedimiento experimental

25 La composición se preparó disolviendo 1000 g de RAP4 en agua purificada ajustada a un volumen total de 4000 ml después de la adición de 2,0 g de sorbato de potasio como conservante y 2,0 g de Tween 80 como emulsionante.

Resultados

30 Se obtuvo una formulación líquida NP2 fácilmente administrable, estable y adecuada para el consumo diario.

Ejemplo 19

Objetivo

35 Este ejemplo se refiere al tratamiento de un sujeto humano que padece dislipidemia e IMC elevado con una composición de *Ribes*, que comprende una cantidad aumentada de la fracción de alcaloides en forma de la composición alimenticia funcional producida en el Ejemplo 18.

Procedimiento

40 Un hombre de 44 años con un historial familiar de hiperlipidemia tenía un nivel de colesterol total (TC) en suero elevado estable de 6,6, un nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de 4,8 y un nivel de triglicéridos de 1.86. Su peso corporal era de 81,8 kg el día del inicio del período de tratamiento, lo que corresponde a un IMC de 25,3. Desde este punto de partida, el sujeto inició una administración oral dos veces al día de la formulación alimenticia funcional NP2 producida en el ejemplo 18. La dosis diaria total fue de 100 ml de NP2 correspondiente a 25 g de RAP4 que se administró diariamente durante todo el período de tratamiento de 8 semanas. La dosis diaria de RAP4 correspondía a 1398 µg de Ribetril A, 6145 µg de Ribetrilos totales y 3000 µg de Glucoindoles totales. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante el período de tratamiento de 8 semanas.

Resultados

55 Después de cuatro semanas de tratamiento, el TC se redujo en un 23% a 5,1, el LDL se redujo en un 27% a 3,5 y los triglicéridos se redujeron en un 32% a 1,26. Además, el peso corporal se redujo de 2.0 kg a 79.8 y el IMC se redujo a 24.7.

60 Después de 8 semanas de tratamiento, el TC se redujo en un 26% a 4,9, el LDL se redujo en un 35% a 3,1 y el nivel de triglicéridos se redujo en un 31% a 1,29. Además, el peso corporal se redujo en 2,7 kg a 79,1 y el IMC a 24,4.

Conclusión

65 En conclusión, el producto nutritivo administrado por vía oral en forma de una formulación alimenticia que comprende un extracto de alcaloides de *Ribes* normalizó el perfil de lípidos en sangre del sujeto y ayudó a obtener

un IMC normal.

Ejemplo 20

5 Este ejemplo se refiere a la preparación de un producto nutritivo de acuerdo con la invención (referido como NP3 en lo sucesivo).

Objetivo

10 Para preparar una composición de producto nutritivo para administración oral que comprende una combinación de concentrado de alcaloides de *Ribes* derivado de *Ribes rubrum* en combinación con el concentrado de alcaloides de *Ribes* derivado de *Ribes nigrum*.

Compuestos de prueba y productos químicos

15 NP3 está compuesto por los siguientes componentes (proporción en peso %):

• RAP16 (preparado en el ejemplo 1)	40.00%
• RAP17 (preparado en el ejemplo 1)	40.00%
• Agua, purificada	16.505%.
• Heptahidrato de sulfato de magnesio	2.027%
• Hidróxido de potasio	1.300%
• Sorbato de potasio	0.100%
• Sucralosa	0.068%

Procedimiento experimental

NP3 se mezcla secuencialmente sin calentamiento. El producto resultante es estable y se puede verter para una administración conveniente.

La dosis diaria de 25 ml corresponde a 30 g de NP3 y se toma una vez al día diluida en agua 1:4, lo que resulta en una bebida de bayas de sabor agradable.

La dosis diaria proporciona 65 µg de Ribetril A, 336 µg de Ribetrilos totales y 708 µg de Glucoindoles totales.

Ejemplo 21

Objetivo

Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un sujeto humano en relación con la salud de las articulaciones, por la ingesta oral diaria de un producto nutritivo que comprende una cantidad aumentada de alcaloides de *Ribes* en la forma de NP3 producido en el ejemplo 20.

Sujeto

Un hombre de 47 años (76 kg) en una buena salud general sin afecciones médicas que padecía de artrosis en la primera articulación carpometacarpiana de la mano izquierda con síntomas crecientes de dolor, hinchazón, rigidez y disfunción articular durante más de 2 años antes del diagnóstico por un cirujano de manos en base a rayos x. Después del diagnóstico, repitió la inyección intra-articular de corticosteroides cada tres meses durante un año; sin embargo, las inyecciones de corticosteroides solo dieron alivio transitorio e incluso el uso más leve del pulgar causaría dolor severo, lo que hizo que muchas de las tareas manuales requeridas fueran extremadamente dolorosas. Los síntomas finalmente se volvieron tan graves y debilitantes que se le ofreció una cirugía destinada a hacer que la articulación fuera funcional y sin dolor. En el período de espera antes de la operación, el sujeto recibió una ingesta oral diaria del producto nutritivo. Se usó una dosis diaria de 25 ml (30 g) de NP3 una vez al día.

Procedimiento

El sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 20 semanas. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante la duración del período de tratamiento.

Resultados

Durante las primeras 6 semanas de tratamiento, el sujeto experimentó una disminución gradual del dolor y

la inflamación intermitente de la primera articulación carpometacarpiana y, en este punto, el sujeto estimó que el dolor se había reducido en un 60%. Después de 12 semanas de tratamiento, todos los síntomas, incluido el dolor y la hinchazón de la articulación afectada, estaban totalmente ausentes y el sujeto era capaz de usar su pulgar sin restricciones en todo tipo de actividades diarias y tareas manuales sin provocar dolor ni ningún otro síntoma de la articulación carpometacarpiana (el dolor se estimó que se había reducido un 100%). Durante las siguientes 8 semanas de tratamiento, la mejora se mantuvo estable y, por lo tanto se canceló la operación de la articulación. El sujeto ha podido reanudar todas las tareas de trabajo manual empleando su mano izquierda incluyendo tocar la guitarra para su gran deleite.

10 Conclusión

En conclusión, el producto nutritivo administrado por vía oral que comprende los alcaloides de *Ribes* eliminó completamente los síntomas graves de la osteoartritis de la primera articulación carpometacarpiana del sujeto, haciendo la articulación funcional y que no tenga dolor y, por lo tanto, eliminando la necesidad de una operación planificada de la articulación. Esto demuestra de manera convincente los efectos de mejora del producto nutritivo en los déficits de salud provocados por procesos inflamatorios excesivos en el cuerpo. También indica un efecto beneficioso sobre la salud del cartílago que es un factor principal en la osteoartritis.

20 Ejemplo 22

Objetivo

Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un sujeto humano en relación con la salud de las articulaciones, por la ingesta oral diaria de un producto nutritivo de la invención que comprende una cantidad aumentada de alcaloides de *Ribes* en la forma del producto nutritivo producido en el Ejemplo 20, NP3.

Sujeto

Una mujer de 43 años había sufrido un aumento del dolor y una movilidad articular reducida en la primera articulación metatarsofalángica del pie derecho durante 4 años y del pie izquierdo durante 3 años. Se le había diagnosticado osteoartritis según se evaluó por un cirujano ortopédico y por rayos x, provocando un aumento de la rigidez y de dolor en las articulaciones en forma diaria con un marcado empeoramiento durante el año anterior al inicio del tratamiento. Le ofrecieron cirugía, pero sin promesa de alivio del dolor. Los síntomas de dolor y la movilidad reducida de las articulaciones fueron particularmente molestos para el sujeto durante y, en particular, después de las actividades que le causaron estrés o presión en los dedos gordos, incluido el uso de tacones altos o si realizaba actividades físicas como correr. Temía por su movilidad futura.

Procedimiento

El sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 4 semanas. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante la duración del período de tratamiento.

Resultados

Después de 2 semanas de tratamiento, los dolores en la primera articulación metatarsofalángica de ambos pies se redujeron en un 80% según lo estimado por el sujeto y la movilidad de las articulaciones habían vuelto casi a la normalidad. El sujeto fue capaz de caminar con tacones altos sin dolor e incluso pudo realizar actividades físicas como correr sin dolor y sin empeoramiento posterior. Esta mejora pronunciada en los síntomas de la osteoartritis se mantuvo estable durante las siguientes dos semanas de tratamiento, lo que indica un efecto robusto y duradero del tratamiento. El sujeto no había experimentado una mejoría de la condición en los últimos 4 años; al contrario, la condición había ido empeorando. Por lo tanto, se sintió muy aliviada al experimentar una reducción de los síntomas en un grado tan pronunciado. Decidió continuar el tratamiento después de los resultados de las primeras 4 semanas.

Conclusión

En conclusión, un producto nutritivo administrado por vía oral que comprende una fracción de alcaloides de *Ribes* mejoró los síntomas del sujeto de osteoartritis en las articulaciones metatarsofalángicas de los dedos gordos hasta tal punto que obtuvo una movilidad de las articulaciones casi normal y ya no padecía de dolor y rigidez significativos durante las actividades que habían provocado dolor y empeoramiento de los síntomas antes del tratamiento. Este ejemplo indica claramente una actividad antiinflamatoria en la osteoartritis del producto nutritivo que comprende una fracción de alcaloides de *Ribes*.

Ejemplo 23

Objetivo

5 Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un sujeto humano por la ingesta oral diaria de un producto nutritivo de la invención que comprende una cantidad aumentada de alcaloides de *Ribes* en forma del producto alimenticio producido en el Ejemplo 20, NP3. El sujeto humano padecía de fatiga general relacionada con la edad en relación con el ejercicio físicamente exigente.

Sujeto

10 Un hombre de 81 años (72 kg de peso corporal) con buena salud general había realizado un programa de entrenamiento regular de tenis durante 2 horas dos veces a la semana (dobles con los mismos compañeros de tenis) durante muchos años. A pesar de que tenía este programa de entrenamiento regular, a lo largo de los años el sujeto experimentó una reducción gradual de la energía durante el entrenamiento y un aumento de la fatiga después de las sesiones de entrenamiento que atribuyó a su aumento de edad. Por lo tanto, siempre estaría demasiado agotado para continuar jugando otra ronda después de haber jugado las dos horas programadas de tenis dobles.

Procedimiento

20 El sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 4 semanas. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante la duración del período de tratamiento.

Resultados

25 Después de 2 semanas de tratamiento, el sujeto experimentó una marcada disminución de la fatiga después de 2 horas de tenis dobles en comparación con el inicio del tratamiento. Se sentía tan lleno de energía y fuerza que pudo jugar durante una hora más antes de terminar los dobles. Además, no se sintió más cansado después de esta sesión prolongada de lo que solía hacerlo después de solo dos horas de jugar a tenis dobles. Este patrón de disminución de la fatiga y la capacidad de aguantar períodos más largos de jugar al tenis que el habitual se repitió durante las siguientes dos semanas de tratamiento, permitiendo el sujeto continuar jugando aproximadamente un 50% más que antes del tratamiento antes de alcanzar el mismo nivel de fatiga agotamiento físico.

Conclusión

35 En conclusión, el producto nutritivo administrado por vía oral que comprende una fracción de alcaloides de *Ribes* disminuyó la fatiga general y el nivel de agotamiento del sujeto en relación con el rendimiento físico prolongado. La fatiga se atribuyó a un umbral generalmente disminuido relacionado con la edad para la resistencia y disminución de la fuerza y la función muscular. Después de 2 semanas de tratamiento con el producto nutritivo que comprende una fracción de alcaloides de *Ribes*, estos síntomas relacionados con la edad de energía reducida y fatiga aumentada disminuyeron de manera impresionante y extendieron considerablemente el período durante el cual el sujeto pudo realizar actividad física antes del agotamiento en condiciones estandarizadas.

Ejemplo 24Objetivo

45 Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un atleta joven sano con respecto al rendimiento físico y la resistencia por la ingesta oral diaria del producto nutritivo de la invención que comprende una cantidad aumentada de un alcaloide de *Ribes* en forma del producto alimenticio producido en el Ejemplo 20, NP3.

Sujeto

55 Un hombre de 16 años (78 kg) era un sujeto bien entrenado físicamente con un programa de entrenamiento estable de 5 sesiones a la semana que consistía de natación y entrenamiento en tierra firme. El entrenamiento de natación fue una mezcla de las 4 disciplinas con pases tanto máximos como de resistencia en el entrenamiento semanal. El entrenamiento en tierra firme consistía de varios ejercicios de alta intensidad que se enfocaban principalmente en fortalecer la zona del tronco y la parte superior del cuerpo. El nivel de aptitud y resistencia obtenido por el sujeto estaba bien establecido, era estable y estaba cuantificado regularmente como parte del régimen de entrenamiento del sujeto.

Procedimiento

65 Se realizó una prueba de natación la noche anterior al inicio del tratamiento. La prueba se realizó como una prueba máxima enfocada en la rapidez con la que el sujeto podía nadar cada uno de los tres pases en estilo libre

con una pausa de 15 segundos entre cada pase. Los tres pases fueron los siguientes:

- Primer pase: 100 m.
- Segundo pase: 50 m.
- Tercer pase: 50 m.

Después de la prueba, el sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 14 días. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante la duración del período de tratamiento.

Después de 7 días de tratamiento, el sujeto realizó otra prueba de natación idéntica a la realizada antes del inicio del tratamiento.

Después de 14 días adicionales de tratamiento sin ningún cambio en el régimen de entrenamiento del sujeto, se realizó una tercera prueba de natación.

Resultados

El tiempo total para la prueba de natación estilo libre de 200 m de distancia compilada fue de 143,14 segundos antes del tratamiento en comparación con 133,33 segundos después del tratamiento. Esto es una mejora de 9,21 segundos, que corresponde a una mejora del 6,4%. Los tiempos mejorados se obtuvieron únicamente en los dos últimos pases de la prueba, es decir, una mejora total del 12,1% en los dos últimos pases de la segunda prueba.

Después de 14 días adicionales, el tiempo total para la prueba de natación de estilo libre de 200 m de distancia compilada fue similar a los resultados de la segunda prueba de natación (134,62 segundo). De nuevo, el tiempo total mejorado fue atribuible a las mejoras en los últimos pases de la prueba de natación. El joven describió un "excedente de potencia" que sintió durante las pruebas y quedó muy impresionado cuando presentó los resultados.

Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

Prueba de natación	Antes de la administración oral de composición de alcaloides de <i>Ribes</i> , NP3	Después de 7 días de la administración oral de composición de alcaloides de <i>Ribes</i> , NP3	Después de 21 días de la administración oral de composición de alcaloides de <i>Ribes</i> , NP3
Distancia (metros)	Tiempo (segundos)	Tiempo (segundos)	Tiempo (segundos)
100 metros	66.64	66.69	66.36
50 metros	37.88	33.94	34.09
50 metros	38.62	33.30	34.17
Total 200 metros	143.14	133.93	134.62

Conclusión

Después de 7 días de la administración oral de un producto nutritivo que comprende una cantidad aumentada de una fracción de alcaloide de *Ribes* a un nadador masculino en forma joven, con tiempos estables en sus pases de entrenamiento, se obtuvo una mejora pronunciada en el tiempo total de la prueba de natación del 6,4% con una mejora impresionante en la segunda mitad de la prueba de natación del 12,1%, lo que demuestra un aumento en el rendimiento de resistencia del sujeto. Esta fue una mejora excepcional que de otra manera solo se podría obtener a través de un régimen de entrenamiento altamente intensificado durante un período de tiempo más largo. Como demuestran los resultados de la tercera prueba de natación, los resultados fueron muy sólidos, lo que indica que el sujeto había alcanzado un nuevo nivel más alto de resistencia y rendimiento, demostrando los efectos de mejora de rendimiento y resistencia física del producto nutritivo que comprende una cantidad aumentada de una fracción de alcaloide de *Ribes*.

Ejemplo 25

Objetivo

Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un atleta joven indicado por el nivel de VO2 Max basado en una prueba de Conconi después de la ingesta oral diaria de un producto nutritivo de la invención que comprende una cantidad aumentada de alcaloides de *Ribes* en forma del producto alimenticio producido en el Ejemplo 20, NP3.

Sujeto

Un hombre de 28 años (73 kg) era un sujeto bien entrenado físicamente con un nivel bien conocido de aptitud física en el área de triatlón con un programa de entrenamiento estable de 5 sesiones a la semana que consistía en carreras de larga distancia y ciclismo de montaña. El nivel de aptitud física y resistencia obtenido por el sujeto era conocido y estable y se cuantificó regularmente mediante la prueba de Conconi como parte del régimen de entrenamiento del sujeto. La prueba era bien conocida por el sujeto.

Procedimiento

Se realizó una prueba de Conconi la mañana anterior al inicio del tratamiento. La prueba de Conconi se usa principalmente en deportes de resistencia para determinar el umbral anaeróbico y calcular el VO2 Máx. Consiste en someter al sujeto a una carga de trabajo que aumenta progresivamente mientras se mide la frecuencia cardíaca del sujeto. En el presente caso, el sujeto corría en una cinta para correr y la velocidad se aumentaba en 0,5 km/hora cada 200 metros hasta que el sujeto ya no podía mantener la velocidad. La frecuencia cardíaca se monitorizó y registró cada 5 segundos. Se representó en un gráfico la velocidad frente a la frecuencia cardíaca a partir del cual se pudo calcular el VO2 Max del sujeto. Un VO2 Max más alto permite que un atleta tolere el ejercicio de intensidad más alta durante periodos de tiempo más largos.

Después de la prueba, el sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 7 días. No hubo cambios en el régimen de ejercicio, ingesta de alimentos, estilo de vida o medicación durante la duración del periodo de tratamiento.

Después de 7 días de tratamiento, el sujeto realizó otra prueba de Conconi idéntica a la realizada antes del inicio del tratamiento.

Resultados

En base a las mediciones de la prueba de Conconi realizada antes del inicio de la administración oral de un producto nutritivo de la invención, se calculó un VO2 Max de 55,27 ml/kg/min. Después de 7 días de administración oral del producto nutritivo de la invención, se calculó un VO2 Max de 59,56 ml/kg/min en base a las mediciones de la prueba Conconi. La diferencia en el VO2 Max fue de 4,27 ml/kg/min, una mejora del 7,8%.

El sujeto describió una sensación de exceso de energía durante la última prueba a pesar de correr hasta su límite máximo (velocidad).

Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

Prueba de Conconi	VO2 Max (ml/kg/min)
Antes de la administración oral de la composición de alcaloides de <i>Ribes</i> , NP3	55.27
Después de 7 días de la administración de la composición de alcaloides de <i>Ribes</i> , NP3	59.56
Diferencia	4.27 {7.8%}

Conclusión

Después de solo 7 días de administración oral del producto nutritivo a un corredor de larga distancia masculino, en forma, joven con tiempos estables en sus pases de entrenamiento, se obtuvo una mejora en el VO2 Max calculado del 7,8% sin ningún cambio en el régimen de entrenamiento del sujeto durante el período de tratamiento. Esto fue una mejora excepcional, considerando el alto nivel de condición física del sujeto y

consecuentemente, un VO2 Max muy alto antes del tratamiento, lo que normalmente requeriría un entrenamiento de intervalos duros durante un período de tiempo más largo para mejorar notablemente.

Ejemplo 26

5

Objetivo

Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un atleta masculino con respecto a la resistencia física y el umbral de lactato después de la ingesta oral diaria de un producto nutritivo que comprende una cantidad aumentada de un alcaloide de *Ribes* en forma del producto alimenticio producido en el Ejemplo 20, NP3.

10

Sujeto

Un hombre de 48 años (80 kg) era un sujeto bien entrenado físicamente con un programa de entrenamiento estable de una media de 5 sesiones por semana (5 horas de ciclismo/semana). El nivel de condición física, resistencia y frecuencia cardíaca media obtenidos por el sujeto durante pases de entrenamiento a alta velocidad de larga distancia fue bien conocido a lo largo de años de entrenamiento y carreras. Por lo tanto, la frecuencia cardíaca máxima durante los pases de entrenamiento a alta velocidad de larga distancia nunca estuvo por encima de 175 bpm (es decir, un umbral anaeróbico de 175 bpm).

15

20

Procedimiento

El sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 20. La ingesta diaria duró 7 días. No hubo cambios en el régimen de ejercicio, ingesta de alimentos, estilo de vida o medicación durante la duración del período de tratamiento.

25

Resultados

Después de 4 días de tratamiento, se probó al sujeto en una carrera en carretera en el sur de Francia en las montañas. El sujeto usó una unidad GPS que mide la frecuencia cardíaca, el tiempo y la velocidad. Sorprendentemente, se observó durante una escalada larga y una cresta de alta velocidad de paso sucesiva que la frecuencia cardíaca se mantuvo estable en aproximadamente 185 bpm durante aproximadamente 20 minutos, lo que era un 5,7% más alto que su umbral anaeróbico conocido anteriormente, lo que indica un umbral anaeróbico significativamente más alto que el obtenido anteriormente.

30

35

Conclusión

La frecuencia cardíaca media durante el entrenamiento de larga intensidad a larga distancia es un indicador del umbral anaeróbico y la capacidad de resistencia. En este ejemplo, después de solo 4 días de administración oral diaria del producto nutritivo, un hombre físicamente bien entrenado de 48 años de edad con un umbral cardíaco anaeróbico bien establecido de 175 bpm durante entrenamiento de ciclismo de alta intensidad a larga distancia mejoró su frecuencia cardíaca media un 5,7% a 185 bpm durante 20 minutos durante un pase de entrenamiento de alta intensidad a larga distancia, lo que indica un rápido inicio de acción y un aumento de la resistencia y el umbral de lactato ejercidos por los alcaloides de *Ribes*.

40

45

Ejemplo 27

Objetivo

Este ejemplo se refiere a los beneficios para la salud obtenidos en un sujeto humano por la ingesta oral diaria de un producto nutritivo que comprende una cantidad aumentada de alcaloides de *Ribes* en la forma del producto alimenticio producido en el Ejemplo 19. El sujeto padecía de persistencia física y fatiga mental en el periodo de rehabilitación tras un traumatismo cerebral grave.

50

55

Sujeto

Una mujer de 75 años (57 kg) sin afecciones médicas y con una buena salud y constitución física general estaba en una fase de reconstitución después de una hemorragia intracraneal traumática (caída-accidente) 3 meses antes, que la había puesto en coma y necesitaba una evacuación quirúrgica aguda de la hemorragia para aliviar la presión sobre el tejido cerebral. El hematoma epidural intracraneal se considera la complicación más grave del traumatismo cerebral. Después del accidente, como consecuencia del impacto de la hemorragia y la conmoción cerebral en el tejido cerebral, sufrió una afasia expresiva en la fase más temprana, y se sentía físicamente débil y agotada fácilmente tanto mental como físicamente con una necesidad notablemente aumentada de dormir. Se recuperó de manera gradual y constante durante los siguientes meses, pero sufría de fatiga severa y dormía 1½ horas más a la mañana y se acostaba y dormía 2 horas antes que antes del accidente. En total, su necesidad de

60

65

sueño eran 3½ más que antes del accidente. Tampoco tenía la energía para ir a su paseo diario habitual. A pesar de que estaba en un programa de rehabilitación física de rutina que mejoró su capacidad física, su grave fatiga seguía siendo su mayor desafío.

5 Procedimiento

El sujeto inició una administración oral una vez al día de 30 g del producto nutritivo NP3 producido en el ejemplo 19. La ingesta diaria duró 4 semanas. No hubo cambios en la ingesta de alimentos, estilo de vida, ejercicio o medicación durante la duración del período de tratamiento.

10

Resultados

Después de 1 semana de tratamiento, el sujeto experimentó un aumento pronunciado en su sensación general de energía física y mental. Ahora podía levantarse de la cama a las siete en punto como antes del accidente (1½ horas antes) e incluso realizar las tareas domésticas que siempre había realizado antes del accidente sin cansarse. Pudo continuar durante el día con una sensación de exceso de energía e irse a la cama a las 22 h, 1 hora más tarde que antes de iniciar la ingesta diaria del producto nutritivo, que correspondió a una reducción del 71% de su necesidad adicional de dormir provocada por el trauma.

15

20

Después de 2 semanas de tratamiento, el sujeto sintió un excedente de energía adicional y tuvo una reducción del 100% de la necesidad adicional de dormir y también pudo volver a caminar diariamente debido a su energía recuperada. La mejora convincente de su umbral de agotamiento mental y físico positivo no estuvo precedida por ningún cambio en su programa de entrenamiento u otros cambios en sus circunstancias físicas o mentales, y fue tan considerable que se sintió cerca de volver a su estado físico y mental de antes del accidente. Esta mejora fue estable durante el resto del período de tratamiento.

25

Conclusión

En conclusión, la fatiga física y mental continua que persistió sin descanso durante el período de rehabilitación disminuyó dramáticamente al de una semana de tomar un producto nutritivo que comprende una fracción de alcaloide de *Ribes*. Esto indica una importante contribución a la mejora y la normalización del funcionamiento del sistema nervioso central, lo que fue muy significativo ya que el sujeto pudo reanudar sus rutinas y actividades diarias a un nivel comparable a su capacidad anterior con una velocidad asombrosa.

35

40

45

50

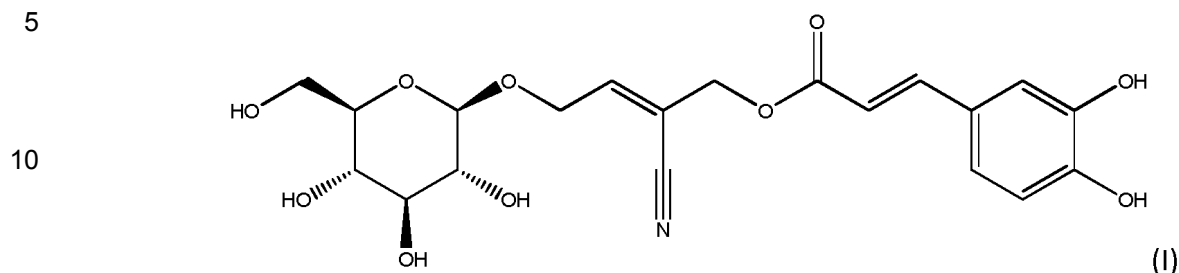
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de alcaloide de acuerdo con la fórmula (I):



2. El compuesto de alcaloide de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es (E)-(E)-2-ciano-4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)but-2-en-1-il 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato ("Ribetril A").

20 3. Un uso no terapéutico de un alcaloide de acuerdo con la fórmula (I) de la reivindicación 1, para apoyar, normalizar o mejorar la función muscular, el rendimiento atlético, la función mitocondrial, la función metabólica o para disminuir por lo menos un signo fisiológico del envejecimiento.

25 4. Un alcaloide de acuerdo con la fórmula (I) de la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.

5. El uso de un alcaloide de acuerdo con la fórmula (I) de la reivindicación 1 para preparar un medicamento, en donde dicho medicamento es para el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionado del grupo que consiste de una enfermedad cardiovascular, un trastorno dislipidémico, un trastorno pre-diabético, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, obesidad, sarcopenia, osteoartritis, una enfermedad inflamatoria y enfermedades asociadas con disfunción mitocondrial o para el tratamiento o prevención de una herida.

35

40

45

50

55

60

65

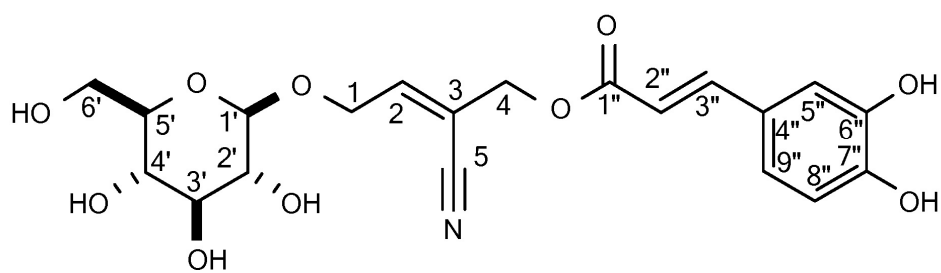


FIG. 1

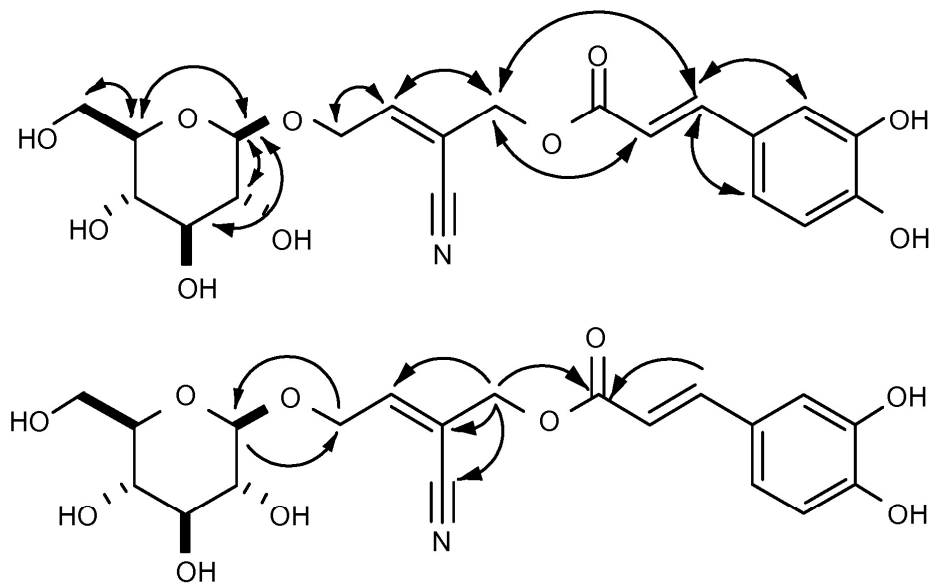


FIG. 2

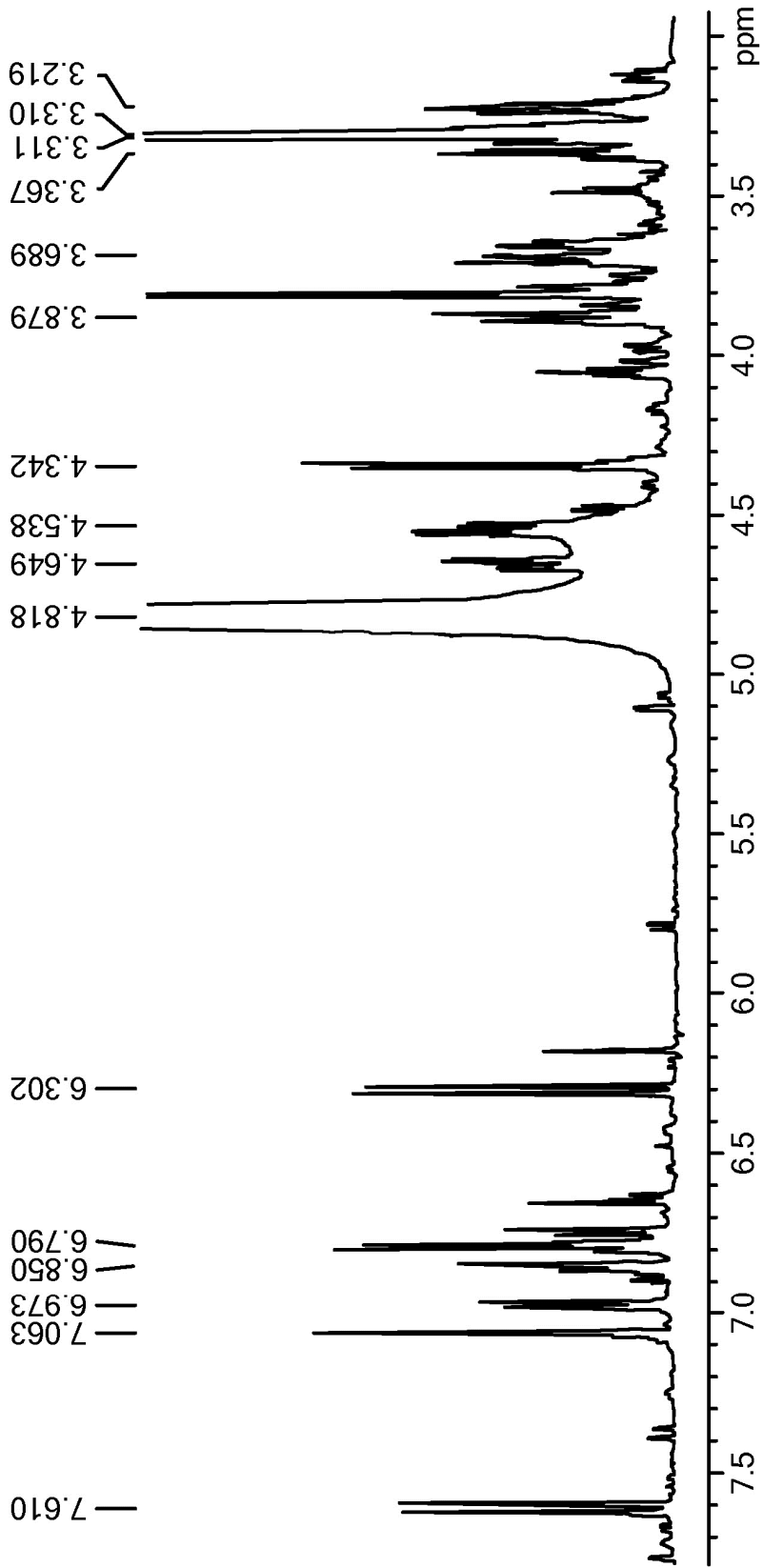


FIG. 3

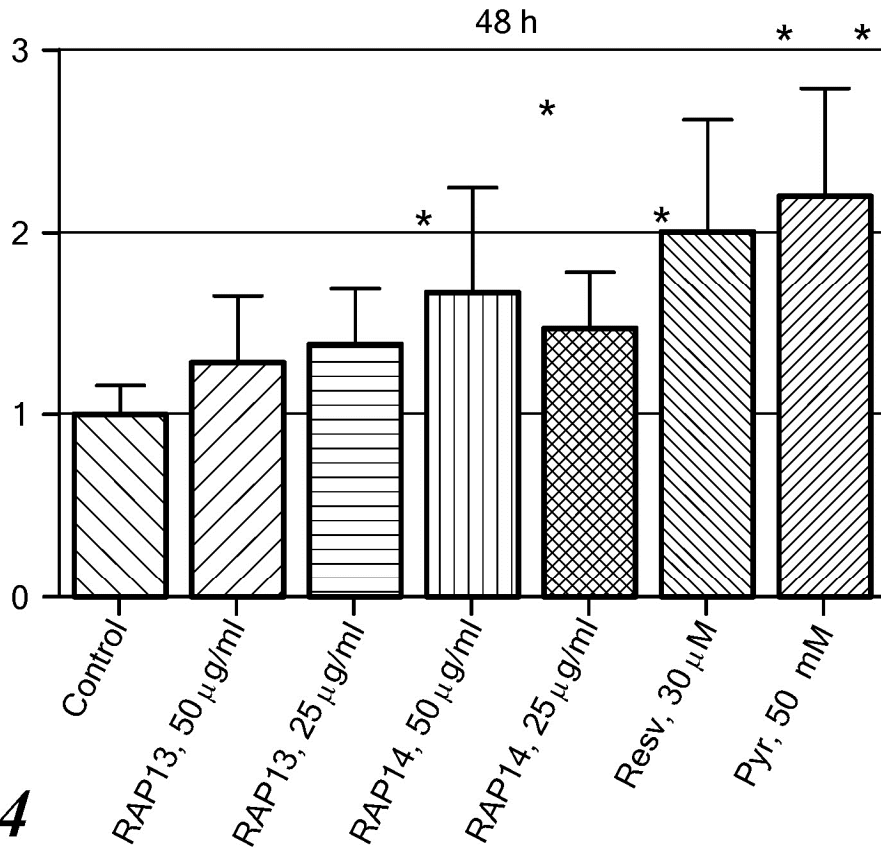


FIG. 4

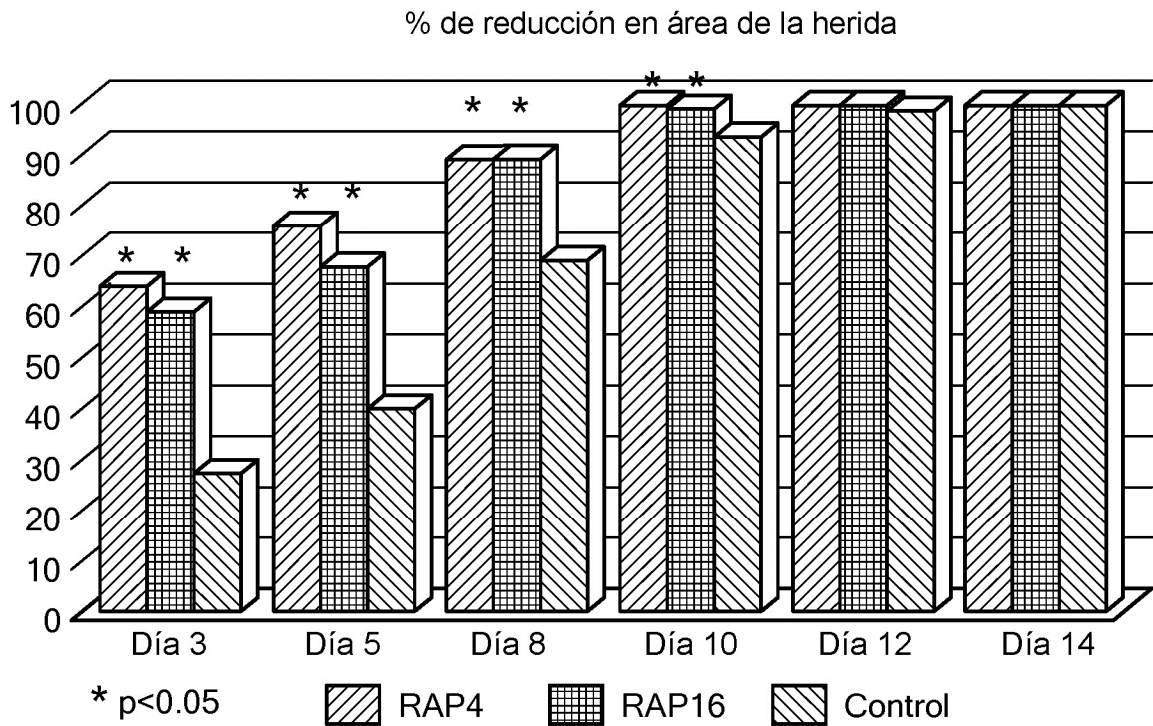


FIG. 5