

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 151**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2017 PCT/MX2017/000061**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17213486**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2017 E 17810608 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3470060**

54 Título: **Composición que comprende resveratrol, glicina, arginina y cisteína para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico**

30 Prioridad:

08.06.2016 US 201615176422
07.06.2017 MX 2017007448

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2024

73 Titular/es:

ASTUDILLO DE LA VEGA, HORACIO (100.0%)
Tuxpan 2-704, Col. Roma Sur
Ciudad de México 06760, MX

72 Inventor/es:

ASTUDILLO DE LA VEGA, HORACIO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 151 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende resveratrol, glicina, arginina y cisteína para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de un síndrome metabólico en un paciente mediante la disminución de los niveles elevados de grasa corporal, colesterol, ácido úrico, y los niveles de glucosa, en el que el paciente es un animal o un ser humano, composición que comprende la siguiente proporción de los componentes biológicamente activos: 3.000-7.000 mg de glicina, 300-5.000 mg de arginina, 200-2.500 mg de cisteína y 100-2.500 de resveratrol.

La invención se define en las reivindicaciones. Toda materia no comprendida en las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo y/o de referencia.

Antecedentes de la invención

El síndrome metabólico, anteriormente conocido como síndrome X, es un estado intermedio entre el metabolismo normal y la diabetes mellitus de tipo 2. Se trata de una epidemia emergente que se ha definido como una serie de factores de riesgo metabólicos que predisponen a padecer enfermedades cardíacas y coronarias e insuficiencia renal crónica, entre otros estados patológicos. El síndrome metabólico se asocia a obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión, estado proinflamatorio y protrombótico, con o sin alteración de la glucosa, es decir, diabetes. Los síntomas están relacionados con niveles altos de triglicéridos, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad, aumento de la presión arterial o hipertensión y aumento de los niveles de glucosa, y síntomas de inflamación. Cada una de estas características es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de disfunción vascular y enfermedades cardiovasculares, renales y hepáticas (Eckel R. H et al en Lancet, 2005, 365: 1415) El síndrome metabólico aumenta el riesgo de muerte prematura, por lo que estrategias eficaces y asequibles que ayuden a reducir los factores de alteración cardiometabólica y a controlar el síndrome son objetivos importantes para beneficiar a una amplia población de alto riesgo.

Actualmente, los principales enfoques para tratar a las personas con síndrome metabólico se dirigen a reducir las causas subyacentes, tratar la hipertensión y otros factores de riesgo cardiovascular, y controlar la resistencia a la insulina. El tratamiento del síndrome metabólico incluye cambios en el estilo de vida, junto con el tratamiento farmacológico. Además de tratar el síndrome metabólico aplicando pautas dietéticas y una actividad física adecuada para abordar los numerosos mecanismos subyacentes del síndrome metabólico, se han desarrollado una serie de medicamentos diseñados para controlar los niveles alterados de metabolitos asociados a la manifestación del estado de enfermedad, que incorporan diversos compuestos nutricionales biológicamente activos dirigidos al mismo objetivo. El conocimiento funcional del impacto de los nutrientes, especialmente los aminoácidos y los polifenoles de la dieta sobre diferentes dianas moleculares, permite desarrollar una composición de compuestos naturales para tratar la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes y el envejecimiento. A continuación se describen algunos conceptos y patentes relacionados con el objeto de la presente invención.

Lodder y Cassis (Lodder R A y Cassis L A en la patente US 2015/9060962 Jun. 23, 2015) patentaron composiciones farmacéuticas que comprenden D-tagatosa con o sin estilbeno o estilbenoide, o derivados de los mismos, para prevenir o tratar la aterosclerosis, el síndrome metabólico, la obesidad o la diabetes. Los estilbenoides como el resveratrol (3, 5, 4-trihidroxi-trans-estilbeno), que es un tipo de fenol natural y una fitoalexina producida en las plantas, se aplicaron durante la respuesta al ataque de patógenos u otras lesiones. Se pueden encontrar grandes cantidades de resveratrol en distintos tipos de bayas, uvas, arándanos, etc. (Fremont en Life Sci, 2000, 66.): 663). Antes de esa patente, Baur et al. (J. A. Baur et al en Nature, 2006, 444 (7117): 337) y Do et al. (Do G M et al en Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374 (1): 55) informaron del efecto del resveratrol para mejorar la salud y la supervivencia de ratones con dietas ricas en calorías, controlar las alteraciones en los niveles de colesterol, entre otras capacidades. Otro compuesto químicamente relacionado con el resveratrol, el pterostilbeno conocido como 3,5-dimetoxi-4-hidroxiestilbeno, se caracteriza por mostrar efectos similares a los del resveratrol.

Las sirtuinas son enzimas con actividad histona desacetilasa y algunos factores de transcripción que regulan vías metabólicas implicadas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento y la resistencia al estrés (Jiang W J Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, 373 (3): 341). Se considera que el resveratrol activa directa o indirectamente la SIRT1 (sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD) y la PGC-1 (coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas), y afecta al funcionamiento de las mitocondrias (Lagouge M. et al en Cells, 2006, 127 (6): 1109; Alcain F J y Villalba J M en Expert Opin Ther Pat, 2009, 19 (4): 403; Behr D. et al en Chem Biol Drug Des, 2009, 74 (6): 619). En las células tratadas con resveratrol, se produce un aumento de la acción de la SOD2 (MnSOD) (superóxido dismutasa 2, mitocondrial, también conocida como superóxido dismutasa dependiente de manganeso) reduciendo el superóxido, lo que implica resistencia a la disfunción mitocondrial, transición de permeabilidad y muerte por apoptosis en varias enfermedades. Se ha descubierto que el resveratrol también actúa como agonista del GPER (GPR30) (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, también conocido como receptor 30 acoplado a proteína G) (Prossnitz E. R. y Barton M. en Mol. Celda. Endocrin. 2014, 389 (1-2): 71). Un posible mecanismo de acción del resveratrol puede atribuirse a la modulación de la autofagia (autofagocitosis, destinada a eliminar los componentes disfuncionales del mecanismo) (Ghosh H. S. et al en PLoS ONE, 2010, 5 (2): e9199). Los animales de laboratorio han demostrado los efectos

- positivos del resveratrol como tratamiento antidiabético (Baur J A et al en *Nature*, 2006, 444 (7117): 337; Lagouge M. et al en *Cells*, 2006, 127 (6). 1109.). Este compuesto actúa como agonista de PPAR gamma (receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-γ o PPARG), también conocido como receptor de glitazonas, o R1C3 (receptor nuclear subfamilia 1, grupo C, miembro 3) es un receptor nuclear tipo II), considerado como diana farmacológica para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (L. Wang et al en *Biochem Pharmacol* 2014, 92 (1): 73). Los peroxisomas son orgánulos que pueden causar enfermedades y procesos de envejecimiento si no funcionan correctamente. La capacidad de estimular la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) e inhibir la agregación plaquetaria se atribuye al resveratrol (Vita J. A. Duffy S J en *Curr Opin Lipid*, 2003, 14 (1). 21; Olas B. y Wachowicz B. en *Platelets*, 2005, 16 (5) : 251).
- Los extractos vegetales pueden considerarse como fuente antioxidante, análogos del resveratrol. Patente US 2016/9,278,104, Mar. 8, 2016 para Romero T., estableció el uso de extracto de hoja de *Nelumbo nucifera* para reducir y/o eliminar uno o más factores de riesgo asociados con el síndrome metabólico. La composición tiene en cuenta la presencia de creatinina, un ácido orgánico nitrogenado muy parecido a la estructura de los aminoácidos que se encuentran en los músculos y las células nerviosas de diferentes organismos vivos. Se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y los riñones a partir de aminoácidos como la arginina, la glicina y la metionina, a razón de un gramo de creatina al día. Se considera un vector inmediato y directo para transportar ATP y suministrar energía a las miofibrillas musculares.
- Gokaraju G. R. et al., en la Patente US 2016/9,241,964, 26 de enero de 2016 establece la composición de fracciones fitoquímicas para uso farmacéutico o como suplemento dietético derivado de *Sphaeranthus indicus* y/o *Garcinia mangostana*. La composición se aplica para el control, la prevención y el tratamiento de la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes y otros trastornos metabólicos, y también para regular el gasto energético, prevenir las placas ateroscleróticas de las arterias coronarias y la aorta abdominal, aumentar la sensibilidad a la insulina, controlar los niveles de glucosa y triglicéridos y equilibrar los niveles de glucosa en los mamíferos. Se mencionan extractos que contienen aminoácidos entre otros componentes; sin embargo, éstos no se divulgan.
- El documento US 2012/258069A1 divulga que las afecciones asociadas con el síndrome metabólico pueden tratarse utilizando un polifenol conjugado con un polímero, en el que el polifenol puede ser resveratrol.
- El documento US 2006/034763A1 revela que el resveratrol tiene efectos antihiper glucémicos y puede utilizarse para reducir el azúcar en sangre en la diabetes de tipo 1 y de tipo 2.
- El documento WO 2014/152016A1 divulga que el resveratrol puede utilizarse ventajosamente para proteger/tratar enfermedades metabólicas.
- Es ampliamente conocido que los aminoácidos son una parte importante de la síntesis de varias proteínas implicadas en el metabolismo humano. Esta invención se considera la razón por la cual la composición puede ser seleccionada para el tratamiento y la prevención del síndrome metabólico.
- Varfolomeev S. D. y Gurevich K. G. (en *Russian Chemical Bulletin*, 2001, 50 (10): 1709) realizaron un análisis bioinformático que demostró que el aminoácido glicina se encuentra con mayor frecuencia (37,5%) en posiciones definidas de secuencias primarias en diferentes familias de enzimas. Los autores atribuyen esta propiedad al papel de la glicina en la arquitectura de las enzimas: al ser un aminoácido sin átomo quiral que permite movimiento y flexibilidad a las cadenas proteicas. Esto demuestra la importancia de la glicina para el metabolismo. Los 5 aminoácidos siguientes son el ácido aspártico (12,9%), la cisteína (6,7%), la histidina (6,2%) y la arginina (5,5%). La cisteína se encarga de mantener la conformación de diversas proteínas gracias a la formación de puentes de azufre. La histidina y la arginina, al igual que el ácido aspártico, son comunes en los sitios activos de las enzimas al desempeñar un papel en el sitio catalítico como agentes centrales y electrófilos.
- En el caso de la arginina (Wu G. A. B. et al en *Curr Opin Clin Nutr Metabol Care*, 2000, 3 (1): 59) se señala su capacidad para ayudar a reducir la resistencia a la insulina, lo que permite disminuir la cantidad de insulina en los tratamientos de la diabetes, aumentar la tolerancia a la glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina en la diabetes mellitus de tipo 2.
- La cisteína es el sustrato limitante para la síntesis de glutatión, responsable de la protección de las células frente a virus, bacterias, hongos y carcinógenos, así como frente a otros estados patológicos. No se recomienda la cisteína oral aplicada sin ningún otro componente porque se cataboliza rápidamente en el tracto gastrointestinal pasando a un estado tóxico. La cisteína tiene propiedades antioxidantes, debido a la capacidad de los tioles para participar en reacciones redox. Estas propiedades antioxidantes de la cisteína se expresan sobre todo en el tripeptido glutatión. La disponibilidad de glutatión por vía oral es insuficiente, por lo que debe biosintetizarse a partir de los aminoácidos que lo constituyen -cisteína, glicina y ácido glutámico-, de los cuales la cisteína es el sustrato limitante. Diferentes ensayos complementados con pruebas de laboratorio han demostrado que el envejecimiento se asocia directamente con una disminución progresiva de la concentración intracelular de cisteína y glutatión en plasma. Esta disminución conduce al estrés oxidativo relacionado con la edad. La suplementación con cisteína por encima de la dieta normal reduce los diversos procesos de envejecimiento al ayudar a los sistemas óseo y muscular, reducir la inflamación y los niveles de citoquinas (L. Wang et al. En *Biochem. Pharmacol.* 2014, 92 (1): 73).
- El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento de cualquier organismo. La alteración de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer, con una proliferación celular ilimitada e incontrolada debida

a mutaciones genéticas. Por el contrario, la pérdida de la capacidad de proliferación celular es uno de los factores causantes del envejecimiento.

El control extracelular de la división celular puede ser realizado por mitógenos del ciclo celular, varios factores de crecimiento así como por factores de supervivencia. Los mitógenos son proteínas que estimulan la división celular, contrarrestando los mecanismos intracelulares de parada (Rb) que bloquean la progresión del ciclo.

El crecimiento de cualquier organismo u órgano depende tanto del crecimiento como de la división celular. Si las células se dividieran sin crecer, cada vez serían más pequeñas. Los factores de crecimiento estimulan el crecimiento celular (aumento de la masa celular) promoviendo la síntesis e inhibición de proteínas y otras macromoléculas. El crecimiento celular no depende del ciclo celular. Por ejemplo, las células nerviosas y musculares crecen especialmente tras la división celular. Como la mayoría de los mitógenos, los factores de crecimiento se unen a receptores de la superficie celular que activan diferentes vías de señalización intracelular, que pueden inducir: un aumento de la síntesis de proteínas o una disminución de su degradación. Todo esto conducirá al crecimiento celular.

Los factores de supervivencia promueven la supervivencia celular suprimiendo los programas de muerte intracelular o apoptosis. Éstas señalan la necesidad de otras células para sobrevivir, ayudando a las células a sobrevivir sólo cuando y donde sea necesario. Las neuronas, por ejemplo, se producen en exceso y compiten entre sí para obtener factores de crecimiento y sobrevivirán las que tengan la mayor cantidad. Como mitógenos y factores de crecimiento, los factores de supervivencia tienden a unirse a receptores de la membrana celular que activan vías de señalización intracelular que inhiben la muerte celular, normalmente mediante la regulación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Algunos factores de supervivencia son IL-3, SCF, IGF-1, que son secretados principalmente por el hígado en respuesta a las señales de la hormona del crecimiento (GH).

Sobre la base de lo anterior y con el fin de resolver los problemas antes mencionados, el objeto de la presente invención es proporcionar el uso de una formulación que consiste en: resveratrol, glicina, arginina y cisteína, estableciendo el rango de concentraciones de los componentes basado en el estudio del modelo de *Artemia salina*. La formulación tiene el efecto novedoso de estimular la proliferación de cultivos celulares y linfocitos *in vitro*, sin evidencia de genotoxicidad, revelando la capacidad de disminuir la formación de grasa visceral observada en animales sanos de laboratorio inducidos a diabetes, controlabilidad del índice de glicemia con menos insulina o sin insulina demostrada en el modelo de diabetes inducida por aloxano, efecto citoprotector del tratamiento presentado en el páncreas de animales tratados con aloxano, corrección de los síntomas del síndrome metabólico y obesidad en pacientes tratados durante un período de 6 meses. En los ejemplos descritos a continuación se demuestra que la formulación tiene un ingrediente revitalizante que actúa a nivel de la producción de energía, la restauración del metabolismo del oxígeno y la reactivación de varios ciclos enzimáticos relacionados con el metabolismo del azúcar, los ácidos grasos y el colesterol, aumentando la energía disponible en las células para una mayor funcionalidad y vitalidad expresada en términos de una mayor proliferación. Los ejemplos demuestran que cuando dicha formulación se aplica en animales y humanos, se normalizan las funciones alteradas relacionadas con los factores negativos de la diabetes, la obesidad y/o el síndrome metabólico. Según estos ejemplos, el tratamiento con la formulación diseñada permite un tratamiento del síndrome metabólico.

Un artículo científico de M.S. Freiberg, et al se refiere a "El consumo de alcohol y la prevalencia del síndrome metabólico en EE.UU.": Un análisis transversal de los datos de la Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición "DIABETES CARE, vol. 27, n° 12, 1 de diciembre de 2004. Un artículo científico de Ling Liu, et al se refiere a " Consumo moderado de vino en la prevención del síndrome metabólico y sus complicaciones médicas relacionadas ", ENDOCRINE, METABOLIC & IMMUNE DISORDERS - DRUG TARGETS, vol. 8, n° 2, 1 de junio de 2008. Un artículo científico de M. Lagouge, et al se refiere a " El resveratrol mejora la función mitocondrial y protege contra enfermedades metabólicas activando SIRT1 y PGC-1 alfa. ", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 127, n° 6, 15 de diciembre de 2006.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Toxicidad expresada en términos de mortalidad de *A. salina*, mostrada por los componentes resveratrol (R), glicina (G), arginina (A) y cisteína (C) aplicados a diferentes concentraciones.

FIG. 2. Viabilidad de *A. salina* en presencia de diferentes concentraciones de la Formulación I.

FIG. 3. Número de linfocitos (arriba) y su viabilidad (abajo) en muestras tratadas con la Formulación I a diferentes concentraciones.

FIG. 4. Prueba de genotoxicidad de la Formulación I aplicada a diferentes concentraciones en células mononucleares (linfocitos) arriba,-placas de electroforesis; en el centro,-porcentaje de ADN integrado (cabeza) (* $p < 0,05$ vs. Blanco con RPMI); abajo,-el cálculo basado en los resultados del final de la muestra de electroforesis (* $p < 0,05$ vs. control positivo con 0,1 mM H₂O₂).

FIG. 5. Efecto de diferentes concentraciones de la Formulación I en la viabilidad del cultivo de células de la línea celular de riñón embrionario humano HEK-293 (arriba) y del cultivo de células de riñón de mono verde africano (Vero).

FIG. 6. Representación gráfica de los valores de los parámetros de química sanguínea en animales con y sin tratamiento con la Formulaci3n I: arriba, conejos macho; abajo, ratas macho, antes de la aplicaci3n de la dosis 3nica y despu3s de 14 d3as de aplicaci3n de 1000 mg/Kg.

FIG. 7. Dinámica del cambio de peso (arriba) y concentraci3n de glucosa (glucemia capilar) (abajo) en diferentes grupos de animales lagomorfos sometidos a tratamiento: I-insulina y 50, 70, 90 mg/kg-en dosis de la Formulaci3n I.

FIG. 8. Dinámica del cambio de peso (arriba) y concentraci3n de glucosa (glucemia capilar) (abajo) en diferentes grupos de roedores sometidos a tratamiento con: I-insulina y dosis de 50, 70, 90 mg/kg-en la formulaci3n I.

FIG. 9. Comparaci3n de los cambios histol3gicos observados a nivel del páncreas en conejos con diabetes inducida, tratados y no tratados con la Formulaci3n I e insulina. Arriba, - Secci3n histol3gica de tejido extraído de páncreas hembra tratado s3lo con insulina, destrucci3n completa del 3rgano demostrada: s3lo se encontr3 tejido adiposo con vasos sangu3neos congestionados y dos ganglios linfáticos con cambios reactivos, se realiz3 una b3squeda deliberada sin identificar tejido pancreático factible. Abajo-Secci3n histol3gica (10x) de tejido pancreático hembra tratado s3lo con la Formulaci3n I (izquierda), identificando la porci3n excretora del páncreas, preservaci3n de acinos sin cambios histol3gicos asociados, sin embargo, componente endocrino no se identifica (c3lulas de los islotes); Imagen (40x) corresponde a una aproximaci3n a la integraci3n de la porci3n excretora pancreática (acinos) (derecha).

FIG. 10. Comparaci3n de los cambios histol3gicos observados a nivel renal en conejos con diabetes inducida tratados y no tratados con la Formulaci3n I e insulina. Arriba-Secci3n histol3gica de tejido renal de hembra tratada s3lo con insulina: a nivel glomerular con aumento de c3lulas mesangiales sin atipia, engrosamiento focal de la pared de los vasos sangu3neos sin formaci3n de n3dulos escler3ticos, lo que corresponde a nefropatía diabética precoz caracterizada por ligero aumento mesangial (izquierda); corte de riñ3n de macho tratado s3lo con insulina, con buena conservaci3n de la corteza 3sea, glom3rulos abundantes con buena celularidad con ligera congesti3n, sin cambios de esclerosis. En el componente tubular hay cambios por necrosis coagulativa y picnosis de los n3cleos (derecha). En el corte medio-histol3gico de riñ3n hembra tratado con insulina y Formulaci3n I a 90 mg/kg, mostrando buena conservaci3n de la corteza 3sea, identificándose abundantes glom3rulos con buena celularidad con muy ligera congesti3n, sin cambios de esclerosis. En el componente tubular se observan cambios iniciales por necrosis coagulativa y n3cleos picn3ticos. Abajo,-secci3n histol3gica de tejido renal congestivo masculino bajo tratamiento con Formulaci3n I a 70 mg/kg (izquierda,-10x) con extravasaci3n de eritrocitos (hemorragia microsc3pica) en m3dula y corteza, identificando estructuras que muestran aumento de c3lulas mesangiales glomerulares sin atipia, ligera congesti3n; el dibujo corresponde a una aproximaci3n de glom3rulos congestivos (derecha- a 40x).

Descripci3n detallada de la invenci3n

Los detalles característicos de la invenci3n consisten en definir la Formulaci3n I, definir su aplicaci3n, los efectos biol3gicos en sistemas vivos a diferentes niveles (celular, animales sanos o inducidos por la diabetes, organismo humano). En los párrafos siguientes se describe el prop3sito de definir la invenci3n y su utilidad. Los siguientes ejemplos se basan en pruebas realizadas para definir la Formulaci3n I, así como para probar sus efectos en sistemas in vitro e in vivo.

La presente invenci3n se refiere a una composici3n para su uso en el tratamiento de un s3ndrome metab3lico en un paciente mediante la disminuci3n de los altos niveles de grasa corporal, colesterol, ácido úrico y los niveles de glucosa en animales o seres humanos, la composici3n que comprende la siguiente proporci3n de los componentes biol3gicamente activos: 3.000-7.000 mg de glicina, 300-5.000 mg de arginina, 200-2.500 mg de cisteína y 100-2.500 mg de resveratrol.

La descripci3n de la formulaci3n que comprende las composiciones básicas y la preparaci3n a la luz de la invenci3n, seg3n la presente invenci3n se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1		
FORMULACI3N I		
Tamaño de la dosis		5 g - 17 g
Dosis por bolsa		1 bolsa
Bolsas por caja		90
Componente	Intervalo de dosis (mín.-máx.)	Pureza (%)
Glicina*	3.000-7.000 mg	98,5-101,5%

Tabla 1
FORMULACIÓN I

L-Arginina HCl	300-5.000 mg	98,5%
L-cisteína HCl*	200-2.500 mg	98,5-101,5%
Resveratrol*	100-2.500 mg	98%

*Los valores diarios en la dieta no están establecidos. Cantidades aproximadas para un individuo de 70 kg de peso

Tabla 2

Tamaño de la dosis	6 g-19 g
Dosis por bolsa	1 bolsa
Bolsas por caja	90

Componente	Intervalo de dosis (mín.-máx.)	Pureza (%)	
L-Glicina*	3.000-7.000 mg	98,5-101,5%	
L-Arginina HCl*	2.000-5.000 mg	98,5%	
L-cisteína HCl*	1.000-2.500 mg	98,5-101,5%	
L_Metionina*	500-1.500 mg (500 mg en nanopartículas)	98,5-101,5% en 98,5-101,5%	
Vitamina B6 (piridoxina-HCl)	500-1.500 mg	98,5-101,5%	
Resveratrol*	500-1.500 mg (500 mg en nanopartículas)	98%	
*No se han establecido los valores diarios en la dieta			
**20 mg es el 100% de las necesidades diarias			

Ejemplo 1

5 El ensayo se realizó para evaluar la toxicidad de los componentes propuestos para la Formulación I (resveratrol, glicina, arginina y cisteína), en larvas nauplio de Artemia salina. Artemia salina es un crustáceo sensible a una amplia gama de compuestos con actividad biológica y estructuras químicas muy diferentes. Michael et al. (Michael A. S. et al en Science, 1956, 123.) 464) y Vanhaecke et al. (Vanhaecke et al en Ecotoxicol Environ Saf 1981, 5:382) propusieron su uso para pruebas de toxicidad. Es una prueba que permite realizar de forma práctica y económica estudios de toxicidad de sustancias de distinta naturaleza. Se ha observado una correlación muy buena con otras pruebas específicas de citotoxicidad. Este modelo está aceptado por la FDA (Food Drug Administration) y la EPA (Environmental Protection Agency en 2002), como prueba para evaluar la toxicidad y ecotoxicidad de productos farmacéuticos y/o alimentarios.

10 El ensayo se realizó según el método estandarizado utilizando diferentes diluciones de cada uno de los componentes de la Formulación I. En un incubador de Artemia salina, se incubaron 0,5 g de quistes de Artemia salina en agua de mar artificial a 37 g/L a una temperatura de 27° C. con aireación constante durante 24 h. En cada 5 pocillos de una placa de 96 pocillos, se aplicaron 0,1 mL de agua de mar artificial (37 g/L) con una pipeta monocal con diez larvas nauplio, se separaron del incubador y se contaron una a una para conseguir una separación exacta de 10 larvas nauplio. A partir de una solución madre de 2000 ppm de resveratrol, se realizaron diluciones seriadas de glicina, arginina y cisteína. Utilizando

una micropipeta multicanal, se añadieron 0,1 mL de las soluciones preparadas en la placa, alcanzando una concentración final de 62,5, 125, 250, 500 y 1000 ppm por cinco pocillos de larvas nauplio. Para las muestras en blanco, se colocaron 10 larvas nauplio no tratadas en un volumen de 0,2 mL de agua de mar artificial (37 g/L). La microplaca se incubó a 25 °C durante 24 h. Tras el período de incubación, se contaron las larvas nauplio vivas y muertas de *A. salina* con un microscopio estereoscópico y se determinó el % de mortalidad. La toxicidad se expresó como porcentaje de mortalidad de las larvas nauplio de *A. salina*: 0-10% no tóxico, moderadamente tóxico 11-50%, 51-90% altamente tóxico y 100% extremadamente tóxico, considerando la escala de Gualdrón et al. (Gualdrón R. et al en Chem Rev. Col. Farm, 1997, 26.) 15 a 19). Las soluciones componentes de la Formulación I se probaron 5 veces. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Graph Pad Prism versión 6, mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados del análisis de datos se expresaron como el promedio \pm desviación típica y se presentan en la FIG. 1. La glicina, la arginina y la cisteína no presentan toxicidad en ninguna de las concentraciones probadas, lo que sugiere que si puede producirse toxicidad, sólo puede ser justo por encima de 1000 ppm (FIG. 1). En el caso del resveratrol, en la solución de 62,6 ppm se produjo una mortalidad del 38% (toxicidad moderada), mientras que la CL50 (concentración letal para el 50% de las larvas nauplio) se estimó en 89,48 ppm, lo que sugiere que a partir de esta concentración el resveratrol es altamente tóxico. Estos datos se tienen en cuenta para definir la Formulación I: la concentración de resveratrol se seleccionó por debajo de CL50; en el caso de los aminoácidos puede utilizarse cualquier concentración por debajo de 1000 ppm.

Ejemplo 2

Como Formulación I aquí ejemplificada se considera la siguiente composición de los componentes biológicamente activos: 5,7 mg de resveratrol, 74,3 mg de glicina, 5,7 mg de arginina y 2,9 mg de cisteína/kg de peso o kg de disolvente, para su uso en mamíferos (incluidos los seres humanos) o cultivos celulares, respectivamente. La concentración de resveratrol se seleccionó teniendo en cuenta los resultados definidos en el Ejemplo 1, es decir, unas 15 veces inferior a su CL50 para evitar la manifestación de toxicidad. El peso de la arginina se consideró equivalente al del resveratrol, el de la cisteína aproximadamente 2 veces menor que el del resveratrol y el de la glicina 13 veces mayor que el del resveratrol. La formulación I es un ejemplo de mezcla de componentes biológicamente activos, que no debe limitar el ámbito de la invención. En este caso se define la dosis de la Formulación I de 88,6 mg/kg.

Utilizando la Formulación I se realizó un ensayo similar al descrito en el Ejemplo 1 para definir el rango de toxicidad de la misma. Los resultados se presentan en la FIG. 2. Se demuestra que a una concentración inferior o igual a 500 ppm, el 100% de las larvas nauplio de *A. salina* se mantienen vivas y a 1000 ppm de la Formulación I sólo el 58%. Esto indica que según el modelo aplicado la Formulación I no es tóxica a una concentración de hasta 500 ppm, pero a concentraciones más altas de hasta 1000 ppm se muestra un comportamiento moderadamente tóxico. Esto demuestra que utilizando la Formulación I, la concentración de la misma puede variarse en un amplio rango de concentraciones y dosis considerando la ausencia de toxicidad.

Ejemplo 3

La formulación I se aplicó a una prueba para determinar sus efectos en células humanas, es decir, para estimular efectos de crecimiento (efecto mitogénico) o causar la muerte celular (efecto citotóxico).

Para el ensayo, se utilizó un sistema biológico in vitro de cultivo de células mononucleares de sangre periférica-linfocitos humanos periféricos. Se seleccionó este sistema porque forman del 25 al 35% de los leucocitos y son las principales células promotoras de la respuesta inmunitaria, ya que reconocen antígenos extraños y activan mediadores celulares de la respuesta inmunitaria, provocando fenómenos de proliferación o supresión ante estímulos endógenos o exógenos. Estos cultivos se utilizan ampliamente en investigación para evaluar los efectos de diversos compuestos (Marti-Centelles R. et al en J. Med Chem Eur, 2015, 103: 488). Se evaluaron los efectos sobre la proliferación celular y se determinaron la CL50 y la CL100 (concentraciones que disminuyen la cantidad de células vivas al 50 y al 100%, respectivamente) de la Formulación I sobre linfocitos humanos in vitro. Como control positivo se realizó la prueba con concanavalina A (Con A), que es una proteína globular de origen vegetal que induce la mitosis en los linfocitos provocando una proliferación clonal (Ganem y Martín González Báez F A O. en Universo Diagnóstico, 2000, 1 (1):1). El ensayo con RPMI-1640 (medio sin tratamiento) se realizó como blanco. El efecto de la Formulación I, aplicada en un intervalo de concentración de 200 a 2000 ppm, se evaluó contando el número total de células y de células muertas teñidas con colorante azul tripán.

Se preparó 1L de cultivo en medio RPMI-1640 (SIGMA) suplementado con 10% de FBS, añadiendo 1 ml de solución 1x de estreptomycin y anfotericina B (SIGMA), esterilizado mediante unidades de filtración estériles (Corning) utilizando membranas de 0,22 micras. Se prepararon diluciones seriadas a partir de una solución madre de 2000 ppm de la Formulación I a 200, 400, 600, 800, 1000 y 2000 ppm.

Se obtuvieron 30 mL de sangre periférica de donantes voluntarios sanos mediante venopunción, que se recogió en tubos de plástico que contenían EDTA como anticoagulante. A continuación, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) por centrifugación a 1.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos a 25° C. Las PBMC se lavaron dos veces con PBS 1x, el sedimento celular se resuspendió finalmente en medio de cultivo. Las PBMC están formadas por monocitos y linfocitos. Las células

- monocíticas se caracterizan por ser células adherentes que carecen de potencial proliferativo. De lo contrario, representan los linfocitos, que son células en suspensión, capaces de proliferar tras un estímulo endógeno o exógeno. Para separar los monocitos de los linfocitos, las PBMC obtenidas se cultivaron horizontalmente en cajas de 25 cm para que los monocitos se adhirieran a la superficie durante un periodo de 5 horas a 37° C. con atmósfera humidificada, en una atmósfera con un 5% de CO₂. Tras el tiempo de incubación, los linfocitos -las células que quedaban en suspensión- se separaron en tubos estériles de 1,5 ml y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810-R); a continuación, se añadió 1 mL de medio de cultivo al paquete celular. Se preparó una suspensión de 500.000 células/mL en tubos Eppendorf, a la que se añadieron diferentes concentraciones de la Formulación I (200, 400, 600, 800, 1000 y 2000 ppm) añadiendo un control positivo de 1,25 mg/mL de concanavalina A -un inductor de la proliferación celular- y como blanco se añadieron células no tratadas. Las muestras se incubaron a 37° C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante 48 horas, tiempo suficiente para que los linfocitos completaran la división celular mostrando un control positivo de proliferación similar (Con A) por el producto o causando toxicidad celular en caso contrario. Al finalizar la incubación, los tubos Eppendorf que contenían las distintas muestras se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de RPMI-1640.
- Se utilizó un microscopio óptico de luz con un objetivo de 40x. Las células se contaron con cámara de Neubauer utilizando 0,05 mL de suspensión de cada muestra resuspendida en 0,4 mL de PBS 1x y 0,05 mL de azul tripán. El ensayo se realizó por triplicado en tres eventos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) con el programa SPSS versión 16 y, a continuación, se aplicó la prueba de Dunnet para discernir si existían diferencias entre los tratamientos de control y experimental, considerando significativos los valores de $p < 0,05$.
- FIG. 3 muestra los resultados de la prueba. El efecto de la Formulación I aplicada a 200 ppm para aumentar la concentración de células es aparente (número de células por mililitro) al 15% significativamente ($p < 0,05$) cuando se compara con el blanco no tratado: 6.372.333 y 5.518.333 cel/mL, respectivamente. Como la concanavalina A que contó un aumento del número de células al 65% para obtener 9.101.667 células/mL (FIG. 3) confirmando su actividad mitogénica. Por otra parte, en presencia de concentraciones de 1000 y 2000 ppm de la Formulación I se produjo una disminución del número de células: 4.291.667 y 3.540.333 células/mL, respectivamente.

Se calcularon los porcentajes de viabilidad celular relativa (VCR) y se encontró que en presencia de concentraciones de 200, 400 y 600 ppm, el 97% de las células estaban vivas como en los controles en blanco y positivo. A partir de 800 ppm, así como de 1000 y 2000 ppm de la Formulación I la viabilidad celular de los linfocitos humanos disminuyó significativamente (FIG. 3), con los siguientes porcentajes: 90,58%, 84,38% y 64,96%, respectivamente. La CL50 y la CL100 para la Formulación I se estimaron en 2.726,8 ppm y 5.165,82 ppm, respectivamente. Este valor es significativamente superior al detectado en el ensayo con A. salina y prueba que la Formulación I carece de citotoxicidad a la salina y prueba que la Formulación I carece de citotoxicidad a las dosis aplicadas. A dosis de 50-90 ppm la Formulación I no es citotóxica según ambas pruebas. Estas dosis están en el rango de estimulación de la proliferación de linfocitos confirmando su importante efecto para el procedimiento de tratamiento del envejecimiento.

35 Ejemplo 4

El siguiente ejemplo muestra que el efecto proliferativo y el efecto inhibitorio mostrados en el Ejemplo 3 no están relacionados con el nivel de daño del ADN (ácido desoxirribonucleico). Para ello se desarrolló el ensayo cometa, un procedimiento rápido, sensible, sencillo y cuantificable para medir el grado de daño a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este ensayo es aceptado como herramienta para investigar compuestos o efectos deletéreos sobre la reparación del ADN (Azqueta A. y A. R. Arch Toxicol Collins, 2013, 87: 949). Se utiliza en sistemas in vivo, in vitro, ex vivo en diferentes disciplinas científicas para pruebas de genotoxicidad, estudios preclínicos y clínicos, pruebas genéticas de ecotoxicología, citogenética, fotogenotoxicidad y similares.

Las células mononucleares y los linfocitos de sangre periférica humana se separaron según la misma metodología descrita en el Ejemplo 3. Utilizando medio de cultivo, la concentración de células se ajustó a 1×10^6 células/mL. Las células obtenidas se sembraron en viales Eppendorf a una densidad de 3×10^5 células/mL y se incubaron a 37° C. y 5% CO₂ durante 24 horas para estabilizarse. Posteriormente, los viales se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min a 22° C. y el sobrenadante se sustituyó por soluciones de la Formulación I a 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125, 250, 500 y 1000 ppm ($n=4$ cada una). Las células de ensayo en blanco se resuspendieron en medio de cultivo ($n=8$) y otras con peróxido de hidrógeno 0,1 mM (control positivo, $n=8$). Las células se sometieron a 1200 rpm durante 5 min y se trataron con 0,1 mL de tripsina (0,25%) durante 3 min a 37° C. y 5% CO₂. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI 1640 y se centrifugaron de nuevo a 1200 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y las células se incubaron con 1 mL de solución de lisis (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris HCl 10 mM y Tritón 1%) a 4° C. durante 24 h. Después de 24 h, los viales se centrifugaron a 1200 rpm a 4° C. El sobrenadante se desechó y las células se trataron con 1 mL de tampón de neutralización (Tris 0,4 M pH 7,5) durante 5 min a 4° C. Los viales se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4° C., las células se resuspendieron en 0,02 mL de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 50%, Tris-HCl 10 mM y Na₂EDTA 50 mM). Los geles de agarosa se prepararon disolviendo el 1% en tampón fosfato salino (PBS) en una placa calefactora a 100° C. Una vez disueltos, y a 60° C, se añadieron 0,01 mL de Gelred (compuesto de ADN teñido fluorescente). Esta mezcla se colocó en una cámara de electroforesis horizontal durante 60 min. Las células lisadas se cargaron en geles de agarosa y se incubaron con la solución de electroforesis (1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH a pH 13,5) durante 20 min a 4° C. La electroforesis se realizó a 25 V y 300 mA durante 30 min a 4° C. Los geles se retiraron de la cámara de electroforesis y se revelaron en una cámara de análisis de señales fluorescentes. Las imágenes generadas

se adquirieron con una cámara digital de alta resolución (FIG. 4, arriba) y analizadas con el software ImageQuant TL v8.1. El área de la cabeza del cometa que representaba ADN intacto se cuantificó mediante análisis densitométrico y se representó como porcentaje frente al control negativo (medio de cultivo) (FIG. 4, en el centro). La cola del cometa que representa el ADN dañado se midió en milímetros y se representó como el porcentaje del control positivo (H₂O₂). Los datos se expresaron como media±desviación típica media (FIG. 4, más abajo). Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando en caso se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando en caso de cualquier diferencia una prueba post-hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism v6.0, a p<0,05.

Resultados (FIG. 4) muestran que las células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con diversas concentraciones de la Formulación I en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS no mostraron daños en el ADNds (ADNds). No se generó un daño aparente en la cabeza del cometa (ADN intacto) (FIG. 4, en el centro). Por el contrario, el peróxido de hidrógeno (0,1 mM), conocido por ejercer efectos genotóxicos, muestra un comportamiento en el que se produce una difusión mucho más rápida del ADNds (FIG. 4, arriba y abajo), que es una indicación de genotoxicidad, y debido a este fenómeno el área de medición de la lectura es mucho mayor en comparación con el blanco (FIG. 4, más abajo). El comportamiento de las muestras tratadas con la Formulación I fue similar al del Blanco, lo que indica que el tratamiento con ésta durante 24 h no genera efectos deletéreos sobre el ADN de las células mononucleares de sangre periférica (FIG. 4). Además, el efecto genotóxico inducido por el peróxido de hidrógeno (Azqueta A. y A. R. Collins en Arch Toxicol, 2013, 87: 949) se reprodujo, lo que indica que, en condiciones experimentales, la metodología desarrollada es sensible y fiable. La formulación I provoca efectos sobre el crecimiento celular sin generar efectos deletéreos sobre el ADN de las células mononucleares humanas.

Ejemplo 5

El efecto de diferentes concentraciones de la Formulación I se evaluó en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK-293) y en la línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano), utilizando un ensayo de microdilución con 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mosmann T. en J. Immunol Methods, 1983, 65 (1-2): 55). El procedimiento MTT, basado en el bromuro de difeniltetrazolio, es un ensayo que refleja la función metabólica de las células. El MTT es un colorante amarillo reducido a formazán (colorante azul) por las deshidrogenasas mitocondriales, que forman parte de la cadena respiratoria de las células viables (Hwa et al., 2015). Se utiliza en un procedimiento cuantitativo de microdilución colorimétrica aplicado para la determinación de la supervivencia y la capacidad proliferativa de las células de mamíferos (Mosmann T. en J. Immunol Methods, 1983, 65 (1-2): 55). Es una prueba in vitro adecuada para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad porque es sencilla, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura y eficaz en cuanto a la población de células viables.

Se utilizó el Medio de Cultivo Mínimo Esencial de Eagle modificado de Dulbecco/F12 (DMEM/F12), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1 mL de una mezcla de antibióticos (200.000 UI de penicilina y 0,5 g de estreptomicina). Se preparó una solución de tripsina (Difco) al 0,25%. Se prepararon diluciones seriadas a partir de una solución madre de 2000 ppm de Formulación I y Tritón X-100 como disolvente DMEM/F12. Se preparó 1 mL de cada dilución para obtener concentraciones de 1,95, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125, 250, 500 y 1000 ppm. Las células de cada cultivo celular se cultivaron en placas de cultivo DMEM/F12 de 25 cm hasta obtener una monocapa confluyente en la superficie de la placa. Las condiciones utilizadas para el cultivo celular fueron 37 °C, atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. La monocapa celular confluyente se retiró de las placas de 25 cm utilizando tripsina al 0,25%. Esto se hizo de la siguiente manera: Se eliminó el medio DMEM/F12, después se lavó la monocapa de 1 a 3 veces con tampón fosfato salino 1× y después se añadieron 0,5 mL de tripsina al 0,25%, y se incubó el contenido a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 5 min. se añadieron 3 mL de DMEM/F12 sobre las células levantadas, se resuspendieron las células con una micropipeta de 0,1-1 mL y se colocaron en un tubo cónico estéril de 15 mL, posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se retiró DMEM/F12 del tubo cónico. se añadieron 3 ml de DMEM/F12 al paquete celular, se resuspendieron las células y se realizó un recuento en una cámara de Neubauer. A continuación, se preparó una suspensión celular de 250.000 células/mL. 0.se añadió 1 mL de la suspensión celular de 250.000 células/mL por pocillo de microplaca en todos los pocillos de una microplaca de 96 pocillos, la microplaca se incubó a 37° C. en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 h. Se retiró el medio DMEM/F12 de cada pocillo con vacío, manteniendo la monocapa en el fondo de cada pocillo, y después se añadieron 0,1 mL de cada dilución preparada a partir de la Formulación I y Tritón X-100 (1,95, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ppm). Además, se dejaron 8 pocillos con células sin tratar utilizadas como control de viabilidad celular (medio de cultivo celular sin tratamiento-en blanco), a los que se añadieron 0,1 mL de DMEM/F12. Posteriormente, la microplaca se incubó a 37 °C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante 24 h. A continuación, se eliminó el medio DMEM/F12 con las muestras de Formulación I y Tritón X-100, y los pocillos se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato. 0.02 mL se añadieron a una solución de MTT a 5 mg/mL y el contenido se incubó a 37° C. durante 2 h, para llevar a cabo un proceso completo de reducción del MTT a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Posteriormente se retiró la solución de MTT, reteniendo las sales de formazán formadas, luego se añadieron 0,1 mL de alcohol isopropílico y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Synergy HT con software integrado GEN 5. En el cálculo del porcentaje de viabilidad celular, la absorbancia detectada en los pocillos con células proliferadas en medio de cultivo no tratado se consideró del 100% de células vivas. Las soluciones de la Formulación I se probaron por quintuplicado y las soluciones de control positivo se probaron por triplicado. El ensayo se llevó a cabo en tres eventos separados. Los datos de CL50 de la Formulación I y del Tritón X-100 se estimaron utilizando el paquete estadístico Graph Pad Prism versión 6,

mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). Los resultados del análisis de los datos se expresan como media \pm desviación típica (FIG. 5).

Se demostró que para la Formulación I en concentraciones inferiores a 500 ppm, se observó estimulación de la proliferación y actividad mitocondrial de las líneas celulares HEK-293 y Vero. El aumento en la línea HEK-293 fue del 140% con una concentración de 1,95 ppm y de más del 40% con una concentración de 62,5 ppm, mientras que en el caso de las células Vero sólo fue del 10% en comparación con el blanco. Los resultados demuestran el efecto de la Formulación I para estimular la proliferación celular.

Se observó un efecto citotóxico dependiente de la dosis por encima de 500 ppm, ya que a medida que se aumentaba la concentración de la Formulación I se producía una disminución de la viabilidad celular (FIG. 5).

En ambas líneas celulares, el control positivo (Tritón X-100) mostró un efecto dependiente de la dosis, ya que se observó una disminución de la absorbancia al aumentar la concentración de esta sustancia, según lo esperado por tratarse de un compuesto citotóxico, sin aumento de la viabilidad (valores superiores al 100%), en ninguna de las concentraciones ensayadas, pero sí se detectó una disminución de la absorbancia en comparación con el Blanco (sin tratamiento).

La CL50 para la Formulación I y Tritón X-100 se estimó con valores de $2.417,00 \pm 65,77$ y $764,10 \pm 21,93$ ppm para la línea celular HEK-293 y $4.289,00 \pm 289,90$ y $42,80 \pm 1,60$ ppm para la línea celular Vero, respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran que no se observa citotoxicidad de la Formulación I a concentraciones del rango 50-90 ppm. A esta dosis se observa una estimulación del metabolismo celular. El fenómeno observado es similar al descrito en el Ejemplo 3 y demuestra que la Formulación I debe considerarse un factor promotor del crecimiento y del metabolismo celular.

Ejemplo 6

El efecto de la Formulación I se observó en animales de laboratorio sanos, como modelos de roedores y lagomorfos (ratas Wistar y conejos de Nueva Zelanda) en el ensayo de toxicidad aguda (aplicación única, seguimiento durante 14 días) con dosis altas, superiores a la CL50 del ensayo de A. salina descrito en el Ejemplo 2 (1000 y 1350 mg/kg) y en el ensayo de toxicidad subcrónica (aplicación diaria dos veces al día durante noventa días con dosis de 50, 70 y 90 mg/kg). Los mismos procedimientos de adición de placebo (agua purificada), medición de peso y glucemia se realizaron en paralelo en animales de control negativo de cada especie animal.

En todas las pruebas realizadas en animales de laboratorio, el tratamiento se administró por vía oral en función del peso, mediante cánula orogástrica, tras el consumo de pienso convencional para roedores y lagomorfos (Comisión de las Comunidades Europeas en Off. J. Eur. Comm (L 383 A), 1992, 35: 110), respectivamente.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y se observaron continuamente durante las primeras 24 h después de la administración de la Formulación I, continuando la observación y los cuidados veterinarios intermedios necesarios para cada período de prueba, registrándose en un libro de registro cualquier respuesta del animal. Se determinó el peso corporal y se registró al principio y al final del experimento. También en el caso de los conejos, se realizaron pruebas de laboratorio clínico antes y después de cada prueba: biometría hemática, química sanguínea y actividad de las enzimas transaminasas: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (TGP) y transpeptidasa gamma glutamil transaminasa (GGT). En las ratas, estos parámetros se determinaron sólo al final de la prueba para evitar la pérdida de sangre. Por último, se procedió a la eutanasia de los animales aplicando una serie de anestésicos y cloruro potásico (KCl). Posteriormente, se realizó un examen macroscópico de órganos y tejidos fundamentales y una necropsia, que incluyó principalmente corazón, riñón, bazo, páncreas, pulmón, hígado, ovarios y testículos, según cada caso. Las muestras tomadas se enviaron para realizar un estudio histopatológico.

La dosis máxima probada en el ensayo de toxicidad aguda fue de 1350 mg/kg porque el volumen máximo aplicado por cánula orogástrica es de 1 o 3 ml para roedores y lagomorfos, respectivamente, y el uso de dosis más altas llevó a obtener una solución más viscosa con dificultad para pasar la cánula orogástrica. Con las concentraciones ensayadas, no se observó ninguna muerte de animales de laboratorio, por lo que no se determinó el valor LD50. En relación con la presente invención, se demostró que la mayoría de los parámetros evaluados, incluidos el peso y la actividad de las enzimas hepáticas y la biometría hemática, no mostraron diferencias significativas antes y después del tratamiento y en comparación con el blanco (sin tratamiento). Sin embargo, en los animales tratados se observó una disminución de los niveles de glucosa, de ácido úrico y de colesterol (FIG. 6). Dado que estos parámetros están relacionados con el síndrome metabólico, la gota y la diabetes, los resultados de las pruebas indican que la aplicación de una única dosis elevada de la Formulación I conduce a la disminución de los niveles de metabolitos mencionados y confirma el efecto del uso de este tratamiento para las patologías mencionadas.

La misma tendencia se observó en el caso de los resultados del estudio de toxicidad subcrónica. Se observó una disminución de los niveles de glucosa, colesterol, ácido úrico, creatinina y enzimas hepáticas con la aplicación de la Formulación I a diferentes dosis. Sin embargo, la diferencia estadísticamente probada sólo se obtuvo con el control de la glucosa, mientras que el cambio de otros parámetros se caracteriza por una gran desviación típica asociada a la individualidad del sujeto en los animales objeto de estudio. El aumento del peso corporal en el caso de los animales tratados fue inferior al del control. Además, se observó una disminución repetida de la actividad de las enzimas hepáticas,

lo que puede considerarse una prueba del efecto de la formulación I para mejorar la actividad hepática. La observación característica al realizar las autopsias fue que los animales tratados con la Formulación I en la evaluación macroscópica presentaban un desarrollo muscular significativo y poco desarrollo de grasa corporal, del mismo modo no mostraban esteatosis hepática. Todo ello a pesar de haber permanecido encerrados durante 90 días con muy poco movimiento dentro de las jaulas, es decir, sin ejercicio y con una ingesta de alimentos normal de acuerdo con el peso y la edad. Estos resultados también confirman que la aplicación de la Formulación I permite el control del peso mediado por una disminución de la cantidad de tejido adiposo, el control de la glucosa y ocasionalmente otras características de la química sanguínea, sin alterar la biometría hemática ni la función hepática en mamíferos sanos.

Ejemplo 7

Además, se realizó la prueba en ratas y conejos con diabetes inducida por aloxano. En esta prueba, así como en el estudio de toxicidad subcrónica, se aplicaron tratamientos a tres dosis de la Formulación I (50, 70 y 90 mg/kg). se examinaron 5 grupos de animales con tratamientos (insulina más Formulación I a las tres dosis mencionadas, Formulación I a 70 mg/kg e insulina sola). La insulina glargina se administró por vía subcutánea a una dosis de 0,7 U/kg en una única administración matinal cada 24 h.

Una comparación de los resultados de la química sanguínea en conejos inducidos por diabetes al principio y al final del ensayo, encontró que incluso bajo tratamiento, la glicemia se manifiesta a alto nivel. Se observó un aumento de la urea y la creatinina, lo que confirma el daño renal. Sin embargo, en el caso de los conejos tratados con la Formulación I, se observó una disminución de los niveles de ácido úrico y colesterol.

Los resultados de la biometría hemática de la sangre de conejo antes y después de 21 días de aplicación de los tratamientos mostraron una disminución de los parámetros relacionados con la presencia de monocitos, plaquetas y hemoglobina como resultado de la diabetes inducida en los animales. La monocitosis es una enfermedad en la que aumenta la presencia de un tipo de células sanguíneas en blanco denominadas monocitos. Los monocitos se forman en la médula ósea y desempeñan un papel importante en el funcionamiento normal del sistema inmunitario. Las plaquetas intervienen en la coagulación de la sangre, ayudando a detener las hemorragias en caso de lesión. Los cambios observados indican que, durante el tratamiento de la diabetes inducida por aloxano, se formaron trastornos sanguíneos o de la médula ósea.

Durante el seguimiento clínico, varios ejemplares de conejo mostraron pérdida de peso asociada a alteraciones en la ingesta de alimentos y agua (periodos de anorexia con polidipsia), datos clínicos esperables en cualquier organismo diabético. En algunos conejos del grupo de animales tratados con 90 mg/kg de Formulación I e insulina, no se detectó una pérdida de peso como en todos los demás animales, teniendo incluso evidencias de aumento de peso, lo que demuestra que la Formulación I muestra protección orgánica. La FIG. 7 (arriba) muestra la tendencia del cambio de peso en diferentes grupos de animales probados en el estudio. Se aprecia que la aplicación de la Formulación I conduce a una menor pérdida de peso. Para los grupos tratados con la Formulación I e insulina, el mayor aumento de peso se observa en el grupo con aplicación de 90 mg/kg. Esto demuestra que el efecto depende de la dosis.

Asimismo, todos los especímenes manipulados con Insulina y Formulación I corroboraron que muestra un efecto hipoglucémico como en los Ejemplos 5 y 6. La FIG. 7 (abajo) muestra los valores medios de los niveles de glucosa capilar en diferentes días de aplicación del tratamiento. Se observa que el efecto varía con las diferentes dosis y es superior a 50 y 70 mg/kg en comparación con 90 mg/kg.

La FIG. 8 (arriba) muestra los valores medios de cambio de peso por grupo de ratas con diabetes inducida. En el caso de los animales del grupo tratado con insulina pura (I) es mucho más visible una tendencia a la disminución de la pérdida de peso en comparación con los demás grupos sometidos al tratamiento del estudio. La FIG. 8 (abajo) presenta los valores medios de cambio de la concentración de glucosa (glucosa capilar). En las ratas tratadas sólo con insulina se observa un aumento de la tendencia de la glucosa capilar hasta los 19 días de tratamiento. Se aprecia que en este período el aumento de glucosa se controla más eficientemente aplicando sólo la Formulación I a 70 mg/kg. La mayor disminución de los niveles de glucosa en animales diabéticos de tipo 1 se observa con dosis de 70 mg/kg.

En el seguimiento clínico de ratas con diabetes inducida (diabetes tipo 1), los especímenes de los grupos tratados sólo con insulina o con la Formulación I mostraron cambios en la ingesta de alimento y agua (periodos de anorexia con polidipsia), al igual que en los conejos, se esperan estos datos clínicos en cualquier organismo diabético. Sin embargo, los grupos sometidos a tratamiento con la Formulación I más insulina no mostraron estos datos clínicos de forma tan marcada, es decir, la aplicación de los tratamientos ayudó a mejorar la calidad de vida de los animales y el tratamiento conjunto con insulina pudo mejorar el estado clínico de los animales con diabetes mostrando el efecto reivindicado en la presente invención.

Los niveles de glucosa en ratas tratadas con 50 y 70 mg/kg de Formulación I más insulina (Glargina) tendieron a la normalización (FIG. 8, más abajo). En cuanto al seguimiento del grupo tratado con 90 mg/kg e Insulina (Glargina), aunque la glicemia tendió a no normalizarse en este corto periodo de exposición, se observaron datos muy similares a los obtenidos en la especie lagomorfo con las mismas dosis de tratamiento (FIG. 7). En ambos casos, los resultados demuestran que la Formulación I muestra una protección orgánica de los mamíferos con diabetes.

La comparación de los resultados de los análisis de química sanguínea entre los diferentes grupos de ratas de la prueba demuestra que, aún bajo tratamiento, la glicemia se manifiesta a niveles elevados y se observaron valores altos de urea y creatinina, lo que confirma daños en los riñones. Los resultados de la biometría hemática no muestran diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

- 5 En el estudio macroscópico tras autopsia de conejo y rata con diabetes tipo I, se observó que los grupos tratados sólo con suplemento o insulina presentaban las alteraciones pancreáticas más graves, habiéndose confirmado en las secciones histopatológicas (FIG. 9). Así pues, el aloxano, como inductor de la diabetes, afecta a este órgano y se esperaban alteraciones en todos los animales. Sin embargo, los animales tratados con la Formulaci3n I e insulina, no mostraron alteraciones detectables macrosc3picamente. Es conocido el efecto del resveratrol para aumentar la
- 10 sensibilidad de los receptores de insulina (Chachay V. S. et al en Br J Clin Pharmacol, 2011, 72 (1): 27). Sin embargo, en la descripci3n de la presente invenci3n la Formulaci3n I tambi3n demuestra un efecto citoprotector adicional en3rganos animales y un efecto de recuperaci3n de tejidos da3ados cuando actúa en presencia de insulina.

- Según los resultados histopatol3gicos realizados con muestras de animales inducidos con diabetes, se observa da3o renal (resultado coherente con el an3lisis de qu3mica sangu3nea). Sin embargo, en las muestras de los grupos tratados con insulina y la Formulaci3n I, se observ3 menos da3o renal que en las muestras tratadas s3lo con la Formulaci3n I o con insulina sola. Junto con los resultados del control del peso y de la glicemia capilar, estos resultados proporcionan pruebas de que durante el per3odo de prueba (21 d3as) el tratamiento aplicado con la Formulaci3n I junto con insulina conduce a la protecci3n de3rganos como el riñ3n y el p3ncreas frente a los cambios causados por la diabetes.
- 15

- Los ejemplos aqu3 mostrados confirman la capacidad de la Formulaci3n I para proteger los3rganos de mam3feros con diabetes tipo 1 contra el deterioro cuando se aplica con insulina. Adem3s, se nota la capacidad de controlar el azúcar en sangre, que se potencia en presencia de insulina, y se observa el efecto de mantener el aumento de peso, reduciendo el colesterol y el ácido úrico.
- 20

Ejemplo 8

- Un hombre de 48 a3os present3 molestias torácicas y posteriormente se le diagnostic3 s3ndrome metab3lico. El examen f3sico mostr3 a una persona obesa con un peso corporal de 87 kg, una altura de 170 cm y un IMC de 32 kg/m. La presi3n arterial (PA) era de 160/110 mm Hg, la glucosa plasmática en ayunas (GA) de 150 mg/dL, los triglic3ridos (Tg) de 215 mg/dL, el colesterol total (CT) de 320 mg/dL, el LDL-C de 212 mg/dL, el HDL-C de 37 mg/dL y la HbA1c de 8,46%. El paciente fue sometido a tratamiento con la Formulaci3n I descrita en el Ejemplo 2, tres veces al d3a despu3s de cada ingesta de alimentos durante los 6 meses siguientes. La forma de aplicaci3n de la Formulaci3n I se prepar3 en un vaso de agua o suspensi3n de zumo. Se realizaron evaluaciones peri3dicas para estimar la terapia de afinidad y evitar cualquier efecto secundario. Tras este periodo de tratamiento con la Formulaci3n I, se procedi3 a realizar estudios bioqu3micos. Los valores detectados fueron: GA 115 mg/dL, HbA1c 6,69%, TC 235 mg/dL, LDL-C 123,7 mg/dL, HDL-C 40 mg/dL, Tg 119 mg/dL y su peso descendió 74 kg. El nivel de 11-dehidro tromboxano B2 y la agregaci3n plaquetaria se redujeron respectivamente en un 75% y un 90% en comparaci3n con el valor basal. La respuesta a la terapia fue del 100%. Con este procedimiento, la paciente modific3 considerablemente los factores de riesgo del s3ndrome metab3lico.
- 25
- 30
- 35

REFERENCIAS

- Alcain, F. J., Villalba, J. M. (2009). "Activadores de sirtuinas". Expert Opin Ther Pat., 19(4): 403-414. doi:10.1517/13543770902762893. PMID 19441923. Azqueta, A., Collins A. R. (2013). "El ensayo cometa esencial: una gu3a completa para medir el da3o y la reparaci3n del ADN". Archivos de toxicolog3a, 87: 949-968. Baur, J. A. y otros, (2006). "El resveratrol mejora la salud y la supervivencia de ratones sometidos a una dieta hipercal3rica". Nature, 444 (7117): 337-342.
- 40
- Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S. C., Atangan, L., Wang, M.- (2009). "El resveratrol no es un activador directo de la actividad de la enzima SIRT1". Chem Biol Drug Des., 74 (6): 619-624. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00901.x.PMID 19843076.
- 45
- Chachay, V. S, Kirkpatrick, C. M. J., Hickman, I. J., Ferguson, M., Prins, J. B., Martin, J. M. (2011). "¿P3ldoras de resveratrol para sustituir una dieta sana?" Br J Clin Pharmacol. 72(1): 27-38 Comisi3n de las Comunidades Europeas. (1992). "Anexo de la Directiva 92/69/CEE de la Comisi3n, de 31 de julio de 1992, por la que se adapta, por decimos3ptima vez, al progreso t3cnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximaci3n de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificaci3n, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. B.1 Toxicidad aguda (oral)". Off. J. Eur. Com. (L 383 A) 35: 110-112.
- 50
- Do, G. M. y otros, (2008). "Efectos a largo plazo de la suplementaci3n con resveratrol sobre la supresi3n de la formaci3n de lesiones aterog3nicas y la s3ntesis de colesterol en ratones con deficiencia de apo E". Biochem. Biophys. Res. Commun., 374(1): 55-59.
- Duffy, S. J., Vita, J. A. (2003). "Efectos de los fen3licos en la funci3n endotelial vascular". Opini3n actual en lipidolog3a, 14 (1): 21-27. doi:10.1097/01.mol.0000052857.26236.f2, PMID 12544657.
- 55

Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. (2005). "El síndrome metabólico". *Lancet*, 365: 1415-1428. Agencia de Protección del Medio Ambiente (2002). "Procedimientos para medir la toxicidad aguda de los efluentes y las aguas receptoras para los organismos marinos y de agua dulce". Quinta edición. Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU. Oficina del Agua (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, D.C. 20460 PP. 178-184.

5 Fremont, L. (2000). "Efectos biológicos del resveratrol". *Life Sci.*, 66: 663-673. Ganem Báez, F. A., Martín González, O. (2000). "Lectina concanavalina A: obtención y purificación". *Universo Diagnóstico*. 1(1): 1-41.

Ghosh, H. S., McBurney, M., Robbins, P. D., McBurney, R. (2010). "SIRT1 regula negativamente la diana de rapamicina en mamíferos". *PLoS ONE* 5 (2): e9199. Bibcode:2010PLoSO. 5.9199G. doi:10.1371/journal.pone.0009199.PMC 2821410.PMID 20169165.

10 Gokaraju G. R., Gokaraju, R. R., Golakoti, V. K. R. R., Bhupathiraju, T., Sengupta, K., Alluri, K., Raju, V. K. (2016). Composición de *Sphaeranthus indicus* y *Garcinia mangostana* para el control del síndrome metabólico. Patente US 2016/9.241.964, 26 de enero de 2016.

Gualdrón, R., López, S., Sanabria, A. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev. Col. Quím. Granja*. 26:15-19. Jiang, W. J. (2008). "Sirtuinas: nuevas dianas para enfermedades metabólicas en el desarrollo de fármacos". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373(3): 341-344.

15 Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. (2006). "El resveratrol mejora la función mitocondrial y protege contra la enfermedad metabólica mediante la activación de SIRT1 y PGC-alfa". *Célula* 127 (6): 1109-1122. doi:10.1016/j.cell.2006.11.013. PMID 17112576.

20 Lodder, R. A., Cassis L. A. (2016). Composiciones a base de D-tagatosa y procedimientos para prevenir y tratar la aterosclerosis, el síndrome metabólico y sus síntomas. Patente US 2015/9,060,962, 23 de junio de 2015. Martí-Centelles, R., Falomir, E., Murga, J., Carda, M., Marco, J. A. (2015). Efecto inhibitorio de los estilbenos citotóxicos relacionados con el resveratrol sobre la expresión de los genes VEGF, hTERT y c-Myc. *Eur J Med Chem*. 103: 488-496. Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* como organismo de ensayo para un bioensayo. *La ciencia*. 123: 464.

Mosmann, T. (1983). Ensayo calorimétrico rápido de crecimiento y supervivencia celular: aplicación a ensayos de proliferación y citotoxicidad. *J Immunol Methods*. 65(1-2): 55-63. Olas, B., Wachowicz, B. (2005). "El resveratrol, un antioxidante fenólico con efectos sobre las funciones de las plaquetas sanguíneas". *Plaquetas* 16 (5): 251-260.

30 Prossnitz, E. R., Barton, M. (2014). "Biología del estrógeno: Nuevos conocimientos sobre la función de GPER y oportunidades clínicas". *Endocrinología Molecular y Celular*. 389 (1-2): 71-83. doi: 10.1016/j.mce.2014.02.002. ISSN 0303-7207.

Romero, T. (2016). Procedimientos y materiales para reducir los múltiples factores de riesgo asociados al síndrome metabólico. Patente US 2016/9,278,104, 8 de marzo de 2016. Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P. (1981). "Propuesta de ensayo de toxicidad a corto plazo con larvas nauplio de *Artemia*". *Ecotoxicol Environ Saf.* 5: 382-387.

35 Varfolomeev, S. D., Gurevich, K. G. (2001). Sitios activos de enzimas: bioinformática, arquitectura y mecanismos de acción. *Boletín químico ruso*. 50 (10): 1709-1717. Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., Blazevic, T., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Heiss, E. H., Schuster, D., Kopp, B., Bauer, R., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Atanasov, A. G. (2014). "Una revisión de los agonistas de productos naturales del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPARγ)". *Biochem Pharmacol* 92 (1): 73-89. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.018. PMC 4212005. PMID 25083916. Wu, G. A. B., Meininger, C. J., Knabe, D. A., Baze, F. W. A., Rhoads, J. M. (2000) "Nutrición con arginina en el desarrollo, la salud y la enfermedad". *Opinión actual en nutrición clínica y atención metabólica*. 3 (1): 59-66.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de un síndrome metabólico en un paciente mediante la disminución de los altos niveles de grasa corporal, colesterol, ácido úrico y los niveles de glucosa en el que el paciente es un animal o un ser humano, comprendiendo la composición la siguiente proporción de los componentes biológicamente activos: 3.000-7.000 mg de glicina, 300-5.000 mg de arginina, 200-2.500 mg de cisteína y 100-2.500 mg de resveratrol.
2. La composición su uso según la reivindicación 1, en el que la composición es una suspensión acuosa, un comprimido o una cápsula polimérica.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir el nivel de colesterol sérico total, en la sangre del paciente.
4. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir la concentración de ácido úrico en la sangre del paciente.
5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir el volumen de placa en las arterias del paciente.
6. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir la grasa corporal del paciente.
7. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir la concentración elevada de glucosa en la sangre del paciente.
8. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir la gravedad de la progresión del síndrome metabólico del paciente.
9. La composición para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición se administra en una cantidad eficaz para estimular la proliferación celular en órganos del paciente dañados por el síndrome metabólico.

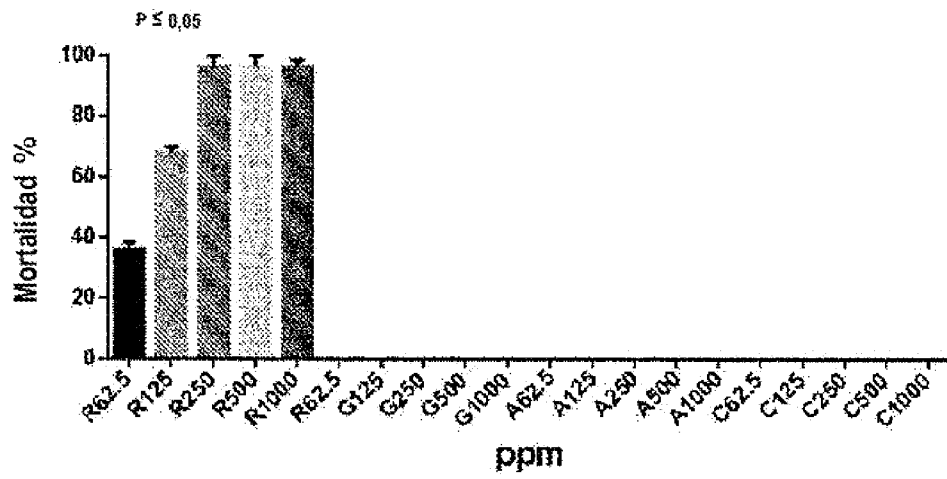


Figura 1

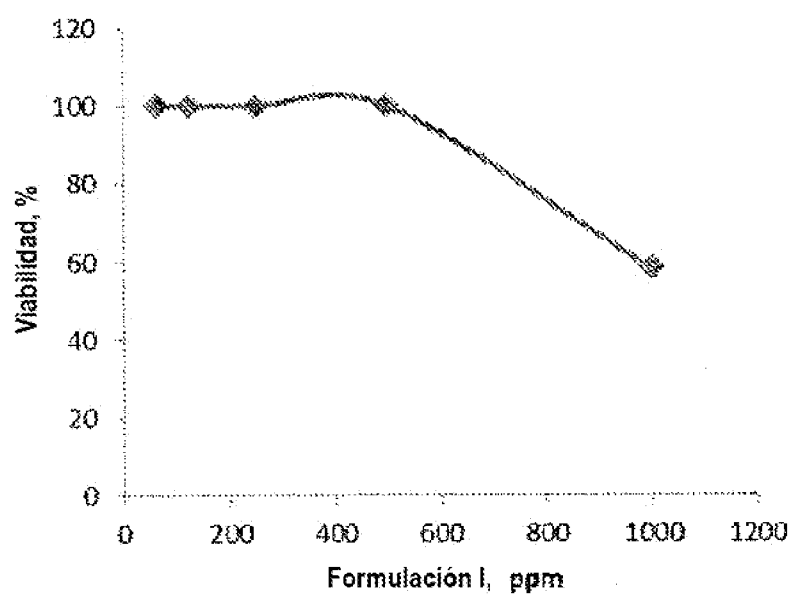


Figura 2

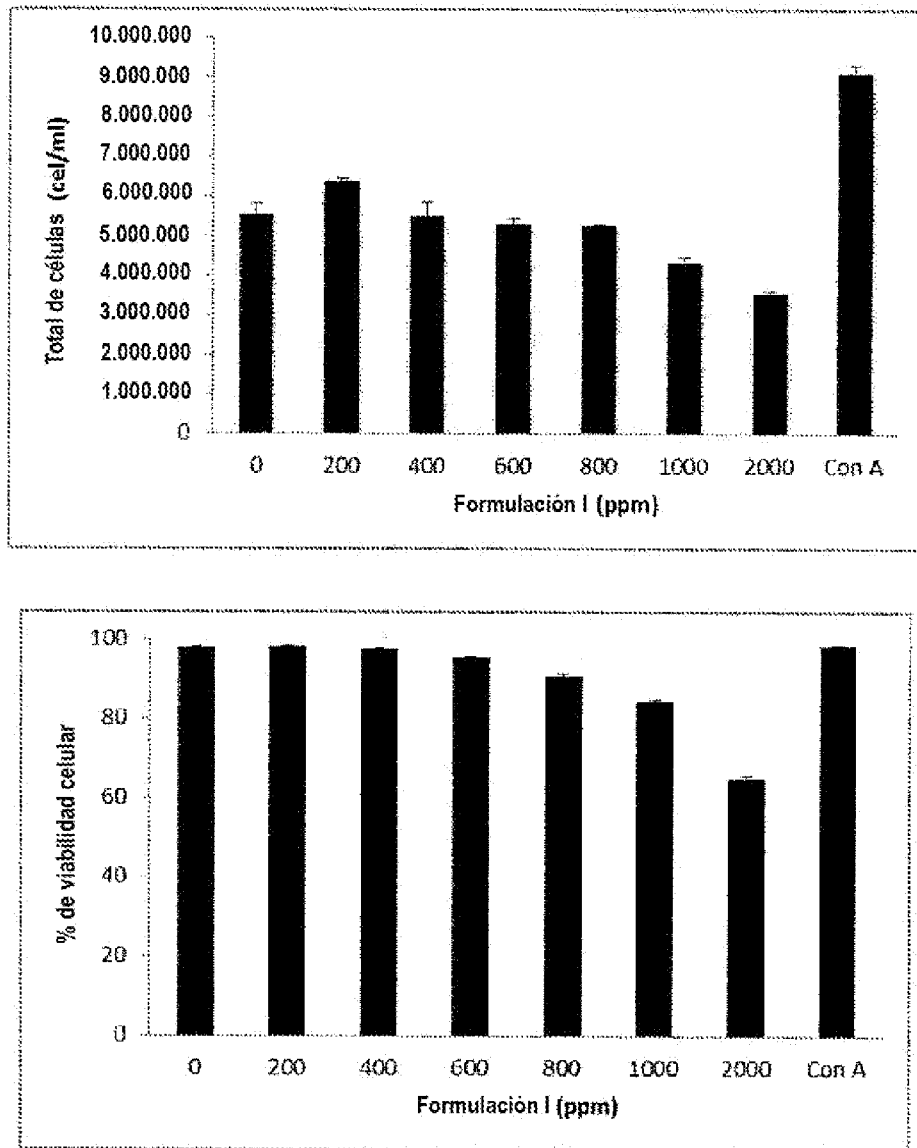


Figura 3

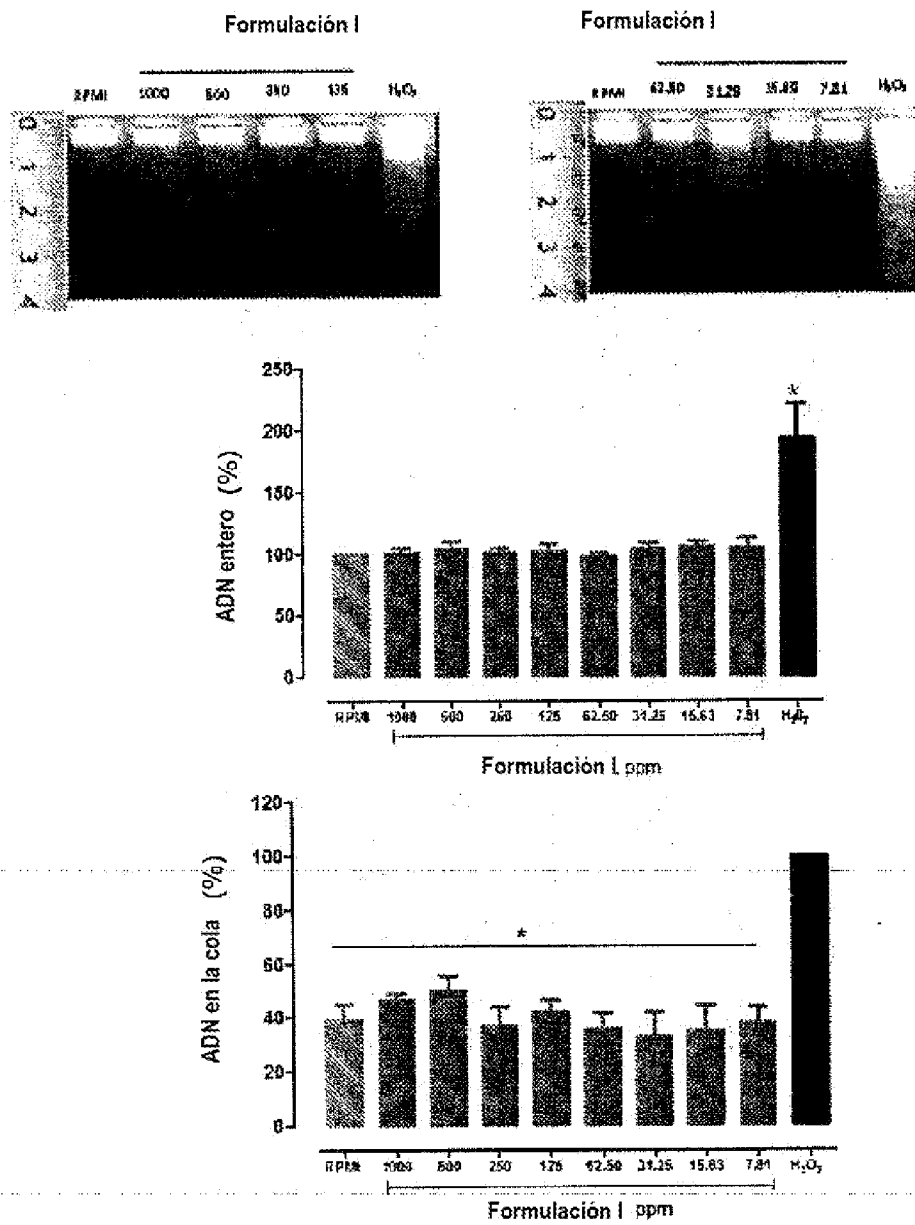


Figura 4

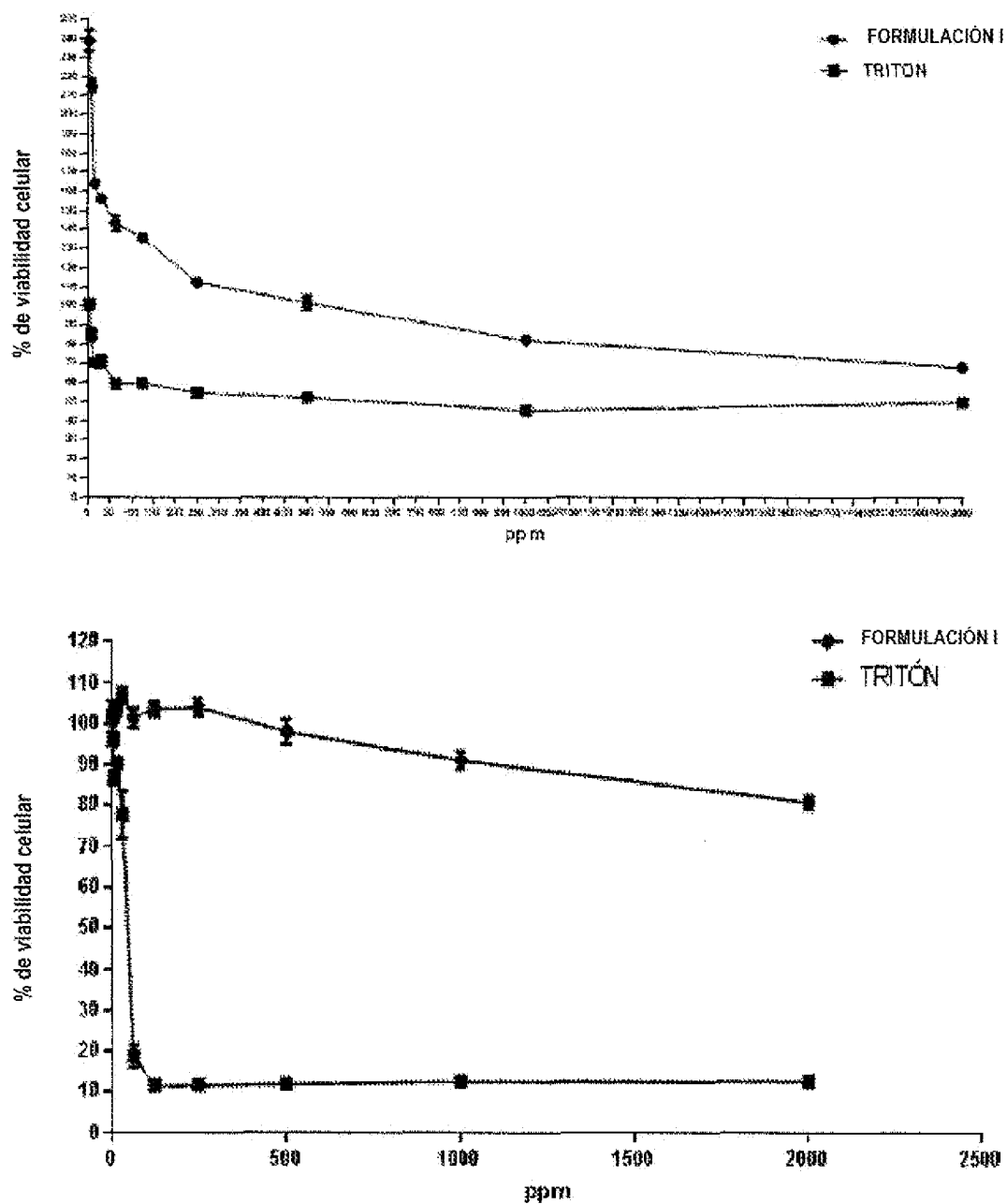


Figura 5

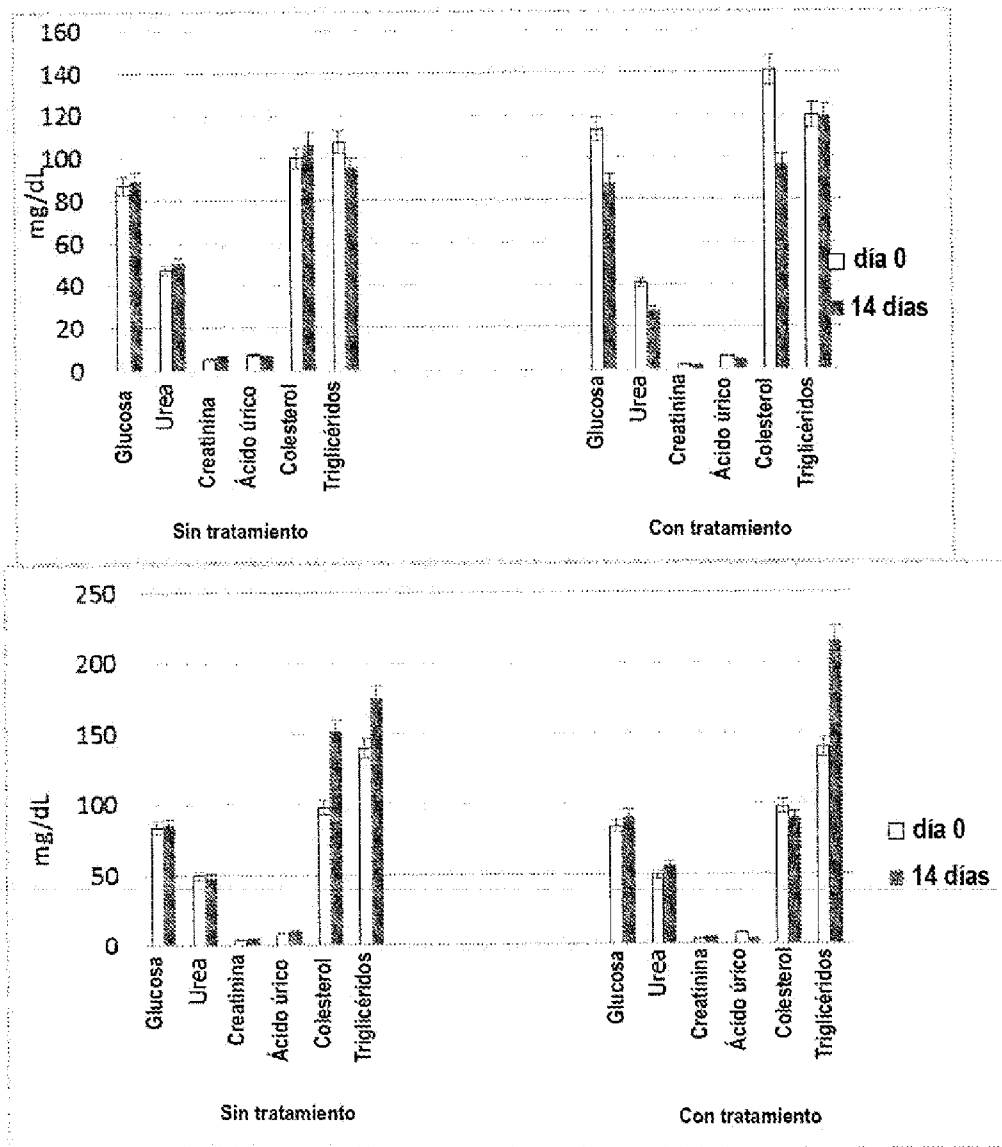


Figura 6

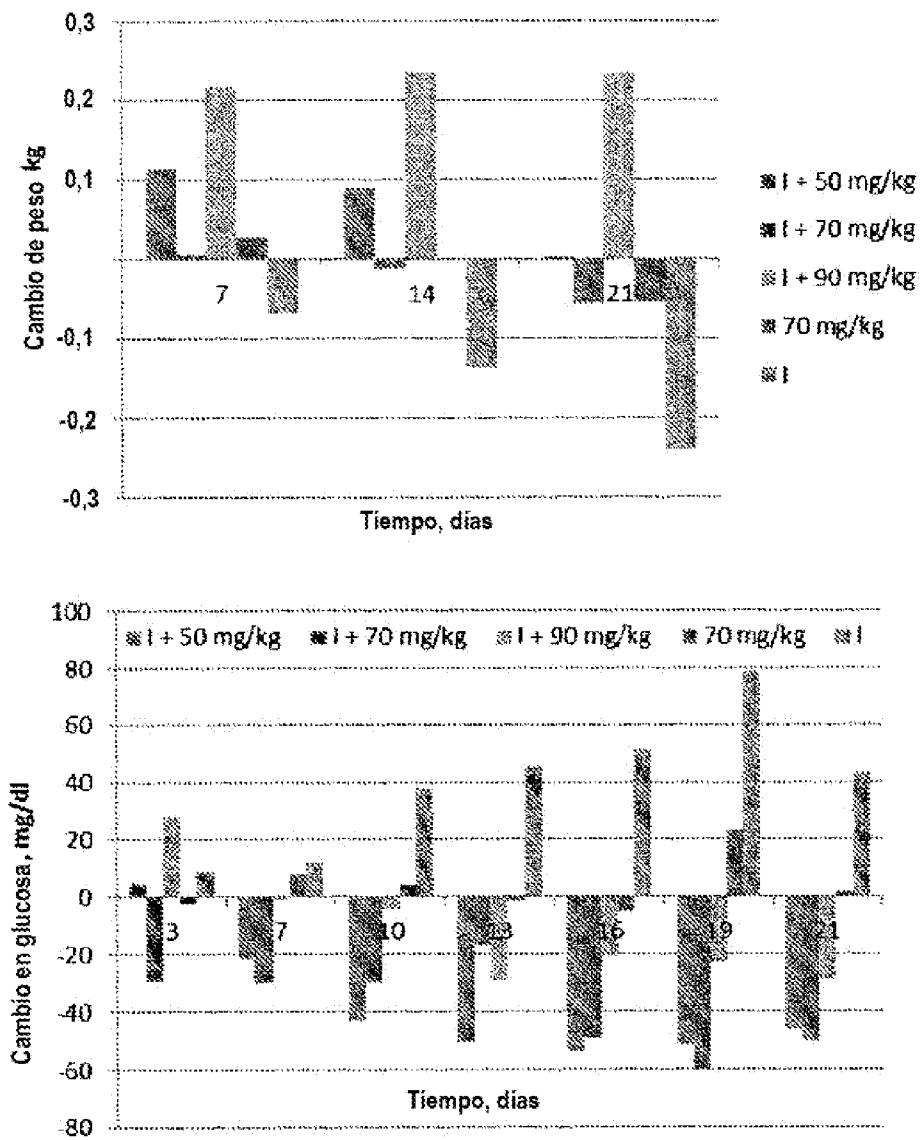


Figura 7

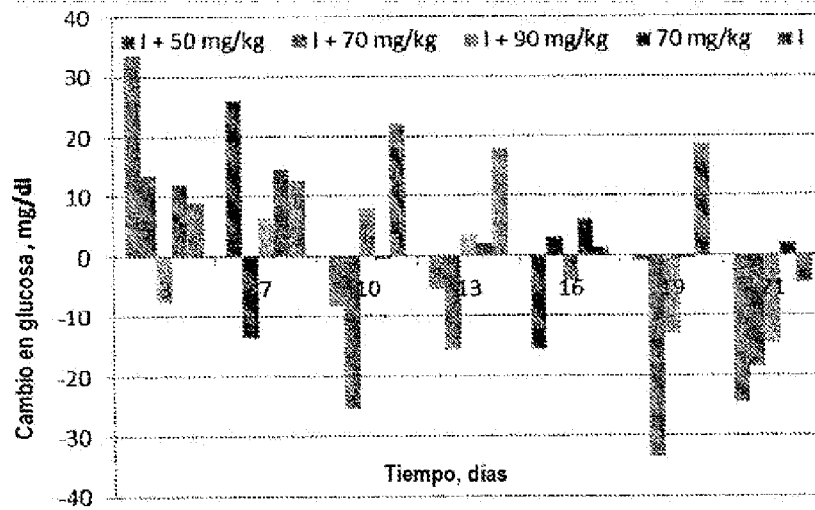
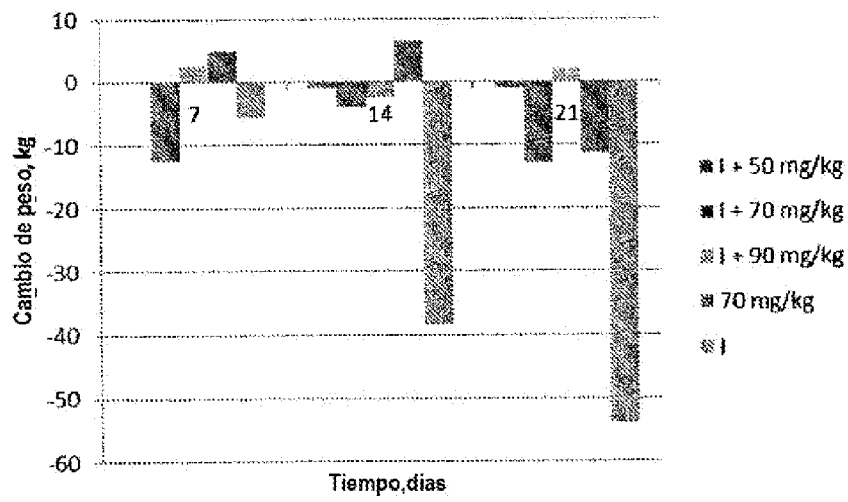


Figura 8

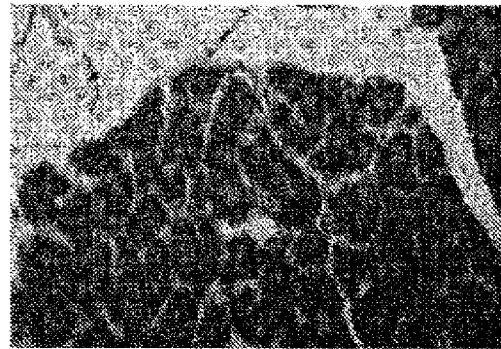
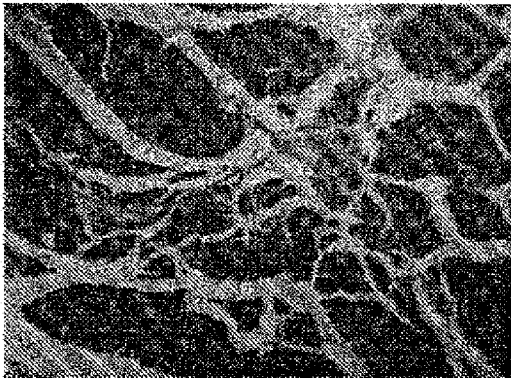


Figura 9

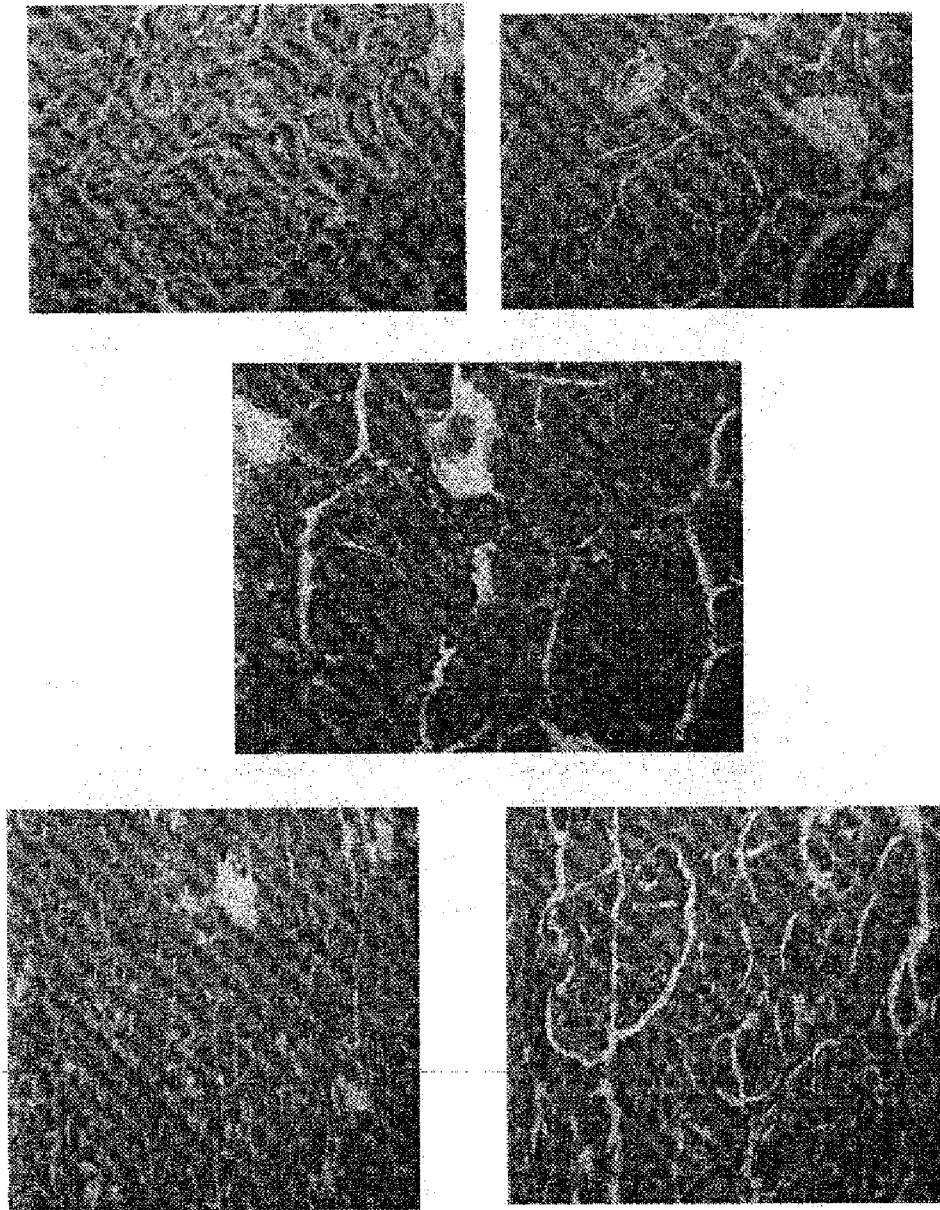


Figura 10