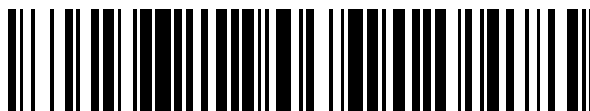


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 701**

51 Int. Cl.:
C07D 311/62 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C09K 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05743859 .0**
96 Fecha de presentación: **26.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1754702**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2007**

54 Título: **Dímeros o trímeros de epigallocatequina que tienen actividad inhibidora de lipasa y/o actividad antioxidante**

30 Prioridad:
27.05.2004 JP 2004158463

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2012

73 Titular/es:
SUNTORY HOLDINGS LIMITED
1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, JP

72 Inventor/es:
NAKAI, Masaaki;
FUKUI, Yuko y
ASAMI, Sumio

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 380 701 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

Dímeros o trímeros de epigalocatequina que tienen actividad inhibidora de lipasa y/o actividad antioxidante

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a dímeros o trímeros de epigalocatequina que tienen actividad inhibidora de lipasa y alimentos y bebidas que tienen esos dímeros o trímeros incluidos en los mismos. La invención también se refiere a dímeros o trímeros de epigalocatequina que tienen acción antioxidante y alimentos y bebidas que tienen esos dímeros o trímeros incluidos en los mismos. La invención se refiere además a procesos para producir esos dímeros y trímeros del epigalocatequina.

Antecedentes de la técnica15 Inhibidor de lipasa

Con la reciente occidentalización del estilo de vida en Japón, la ingesta de comidas con alto contenido de grasa de los japoneses es cada vez mayor. De acuerdo con la encuesta de nutrición nacional japonesa de 1999, la ingesta de energía de los japoneses se ha reducido cada año pero sin embargo su proporción de lípido a energía ha superado los niveles normales de aproximadamente el 25%. También se ha observado que el 50-60% de las personas con más de 60 años de edad tienen niveles de grasa neutra y colesterol más elevados de lo normal (Ministry of Health, Labor and Welfare, "1999 National Nutrition Survey Results Summarized", Rinsho Eiyou 2001, 98(5), 577-588).

La obesidad es una de las afecciones más graves en la sociedad moderna y se debe principalmente a la ingesta excesiva de lípidos. Además de la obesidad, la ingesta de lípidos excesiva se conoce que causa la aparición de enfermedades asociadas incluyendo diabetes, hiperlipemia, hipertensión y arteriosclerosis. El único fármaco que se ha aprobado en Japón para tratar la obesidad es el supresor del apetito Mazindol (marca registrada) pero se ha informado que Mazindol provoca efectos secundarios tales como boca seca, estreñimiento, malestar de estómago, vomitrición o náuseas, etc. (Rinsho Hyoka, 1985, 13(2), págs. 419-459; Rinsho Hyoka, 1985, 13(2), págs. 461-515). Fuera de Japón, Zenical (marca registrada), un fármaco que tiene suficiente actividad inhibidora de lipasa para suprimir la absorción de grasa intestinal, está en el mercado para el tratamiento de la obesidad, pero Zenical también se ha informado que causa diversos efectos secundarios tales como heces grasas, movimientos intestinales frecuentes, paso de heces sueltas, diarrea, dolor de estómago, etc. (Lancet, 1998, 352, págs. 67-172).

Otra forma que se conoce que es eficaz para prevenir la obesidad es reducir la ingesta calórica a través de un régimen dietético. Sin embargo, este enfoque requiere guía y control nutricional estrictos y, por lo tanto, es difícil de implementar en la vida diaria. Por lo tanto, si la absorción corporal de grasa obtenida de la comida se pudiera suprimir de una manera segura y sana, se podría ofrecer una medida práctica y eficaz para tratar la obesidad y enfermedades asociadas y promover la salud.

En estas circunstancias, está llamando la atención el desarrollo de "alimentos para usos sanitarios especificados" que se ha demostrado que son seguros y eficaces en seres humanos. Los elementos para usos sanitarios especificados que se han comercializado hasta la fecha como que tienen la capacidad de suprimir el aumento de los niveles de grasas neutras en suero postprandial incluyen un digerido de globina que suprime la absorción de grasa inhibiendo la lipasa pancreática (J. Nutr. 1988, 128, págs. 56-60; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1999, 52(2), págs. 71-77; Kenkou-Eiyou Shokuhin Kenkyu, Japan Health Food & Nutrition Food Association, 2002, 5(3), págs. 131-144), diacil glicerol que tiene características de digestión/absorción diferentes en comparación con triacil glicerol (J. Am. Coll. Nutr. 2000, 19(6), págs. 789-796; Clin. Chim. Acta. 2001, 11 (2), págs. 109-117) y ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) que se purifican a partir de aceite de pescado. Con el fin de suprimir la absorción de grasa de la dieta usando los alimentos para usos sanitarios especificados enumerados anteriormente, es deseable que los mismos se ingieran junto con las comidas. Sin embargo, se prevé que los alimentos enumerados anteriormente pueden influir sobre el sabor del alimento y la bebida que se tiene que ingerir con los alimentos enumerados anteriormente.

Se conocen algunos polifenoles que tienen actividad para inhibir la lipasa. Entre los ejemplos registrados hasta ahora se encuentran tanino obtenido a partir de cortezas de planta (documento JP 60-11912 B), taninos o flavonoides y glicósidos de los mismos que están contenidos en la planta leguminosa *Cassia nomame* (documento JP 8-259557 A), alimentos supresores de la absorción de lípidos que tienen incluidos en los mismos galato de epigalocatequina y galato de epicatequina que son los componentes principales en el té verde (documento JP 3-228664 A), inhibidores de lipasa que comprenden extractos de agua de pimiento verde, hongo shimeji, calabaza, *Grifola frondosa*, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell, té verde o té oolong (documento JP 3-219872 A), flavona y flavonoles (documento JP 7-61927 A), ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico) (documento JP 1-102022 A), compuestos de triterpeno y sus derivados (documento JP 9-40689 A) y fármacos antiobesidad que contienen procianidina de tamarindo como un ingrediente activo (documento JP 9-291039 A). También se conoce la acción inhibidora de lipasa del extracto de semillas de uva (Nutrition, 2003, 19, (10), págs. 876-879), la acción inhibidora de lipasa de polifenoles obtenidos de *Salacia oblonga* y su acción antiobesidad en rata (J. Nutr., 2002, 132, págs. 1819-

1824) y la acción antiobesidad del extracto de té oolong en ratón (Int. J. Obes., 1999, 23, págs. 98-105).

El efecto reductor de lípidos del té oolong se ha informado por muchos investigadores. En un informe, se permitió que los sujetos bebieran té oolong comercial en porciones de 1330 ml diariamente durante seis semanas para demostrar una caída significativa en los niveles de grasa neutra en sangre (Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 44(4), págs. 251-259) y en otro, a 102 sujetos masculino y femenino con obesidad simple se administró por vía oral té oolong (2 g x 4/día) durante seis semanas consecutivas y se observó una pérdida de peso de al menos 1 kg en el 67% de los sujetos y, adicionalmente, los sujetos que mostraban niveles de grasa neutra en sangre elevados mostraban mejoras significativas después de la ingestión del té oolong (Journal of The Japanese Society of Clinical Nutrition, 1998, 20(1), págs. 83-90).

J. Agric. Food Chem. 2005, 53(11), 4593-4598 describe los efectos inhibidores de los polifenoles del té oolong sobre la lipasa pancreática *in vitro*.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003, 67(2), 396-401 describe la evaluación de efectos antioxidativos (*in vitro*) de polifenoles del té.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1996, 6(6), 695-700 describe la evaluación de polifenoles del té como agentes anti-VIH.

Chem. Pharm. Bull. 1989,37(12), 3255-3263 describe 8-C-ascorbil (-)-epigallocatequina 3-O-galato y flavan-3-oles diméricos, homobisflavinas A y B de oolong, a partir del té oolong.

J. Nutr. 2002, 132(7), 1819-1824 describe efectos específicos de *Salacia reticulata* y sus constituyentes polifenólicos.

El documento JP 3-228644 se refiere a un alimento obtenido combinando un alimento con galato de (-)-epicatequina o galato de epigallocatequina.

- Documento no de patente 1: Ministry of Health, Labor and Welfare, "1999 National Nutrition Survey Results Summarized" Rinshou Eiyou 2001, 98(5)577-588
- Documento no de Patente 2: Rinsho Hyoka, 1985, 13(2), págs. 419-459
- Documento no de Patente 3: Rinsho Hyoka, 1985, 13(2), págs. 461-515
- Documento no de Patente 4: Lancet, 1998, 352, págs. 67-172
- Documento no de Patente 5: J. Nutr. 1988, 128, págs. 56-60
- Documento no de Patente 6: Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1999, 52(2), págs. 71-77
- Documento no de Patente 7: Kenkou-Eiyou Shokuhin Kenkyu, Japan Health Food & Nutrition Food Association, 2002, 5(3), págs. 131-144
- Documento no de Patente 8: J. Am. Coll. Nutr. 2000, 19(6), págs. 789-796
- Documento no de Patente 9: Clin. Chim. Acta. 2001, 11 (2), págs. 109-117
- Documento no de Patente 10: Nutrition, 2003, 19, (10), págs. 876-879
- Documento no de Patente 11: J. Nutr., 2002, 132, págs. 1819-1824
- Documento no de Patente 12: Int. J. Obes., 1999, 23, págs. 98-105
- Documento no de Patente 13: Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 44(4), págs. 251-259
- Documento no de Patente 14: Journal of The Japanese Society of Clinical Nutrition, 1998, 20(1), págs. 83-90
- Documento no de Patente 15: J. Agric. Food Chem. 2005, 53(11), 4593-4598
- Documento no de Patente 16: Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003, 67(2), 396-401
- Documento no de Patente 17: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1996, 6(6), 695-700
- Documento no de Patente 18: Chem. Pharm. Bull. 1989, 37(12), 3255-3263
- Documento no de Patente 19: J. Nutr. 2002, 132(7), 1819-1824
- Documento de Patente 1: J P 60-11912 B
- Documento de Patente 2: JP 8-259557 A
- Documento de Patente 3: JP 3-228664 A
- Documento de Patente 4: JP 3-219872 A
- Documento de Patente 5: JP 7-61927 A
- Documento de Patente 6: JP 1-102022 A
- Documento de Patente 7: JP 9-40689 A
- Documento de Patente 8: JP 9-291039 A
- Documento de Patente 9: JP 3-228664 A

Divulgación de la invención

Problemas a solucionar por la invención

Los inhibidores de lipasa informados previamente mostrados anteriormente no tienen una eficacia para nada satisfactoria. Incluso si se demuestra que el extracto de una planta determinada es eficaz, su actividad inhibidora de

lipasa es difícil de mantener de una manera consistente a menos que la cantidad del ingrediente activo en el extracto de planta esté clarificada, debido a que el extracto es de origen natural.

5 Adicionalmente, un inhibidor de lipasa obtenido a partir de una planta que no se adecua al gusto de muchos consumidores muy probablemente influirá sobre el sabor del alimento o bebida en el cual se incorpora. Por lo tanto, los inhibidores de lipasa que se originan del té que se adecuan al gusto de muchos consumidores pueden ser candidatos prometedores. Por otra parte, si se desea reducir el nivel de lípido con té oolong que se adecua al gusto de muchos consumidores, tiene que beberse en cantidades lo suficientemente grandes para demostrar su eficacia pero esto no es práctico en la vida diaria. El suministro de un concentrado simple de té oolong no es un método
10 práctico, tampoco, ya que es demasiado amargo y picante y también tiene un contenido elevado de cafeína.

15 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de actividad de lipasa que demuestre actividad inhibidora elevada frente a lipasa pancreática para suprimir la absorción de triglicéridos obtenidos de la comida y/o que contribuya a suprimir y prevenir la obesidad.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de lipasa de origen de té oolong que se adecue al gusto de muchos consumidores y que no altere el sabor del alimento o bebida cuando se incluya en los mismos.

20 Otro objeto además de la presente invención es proporcionar procesos para producir dichos inhibidores de lipasa.

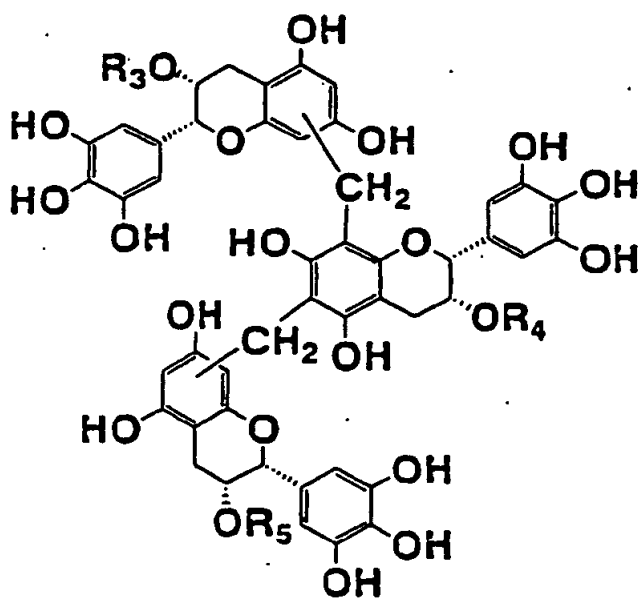
Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar alimentos y bebidas que tienen los inhibidores de lipasa de la invención incluidos en los mismos.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un antioxidante que pueda prevenir una diversidad de afecciones que se producen como resultado del oxígeno activo incluyendo, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como hipertensión, diabetes e hiperlipemia, enfermedades cardíacas tales como arteriosclerosis y envejecimiento y cáncer.

30 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un inhibidor de lipasa y/o un antioxidante, una cantidad eficaz del cual se puede incluir de forma correcta en alimentos o bebidas.

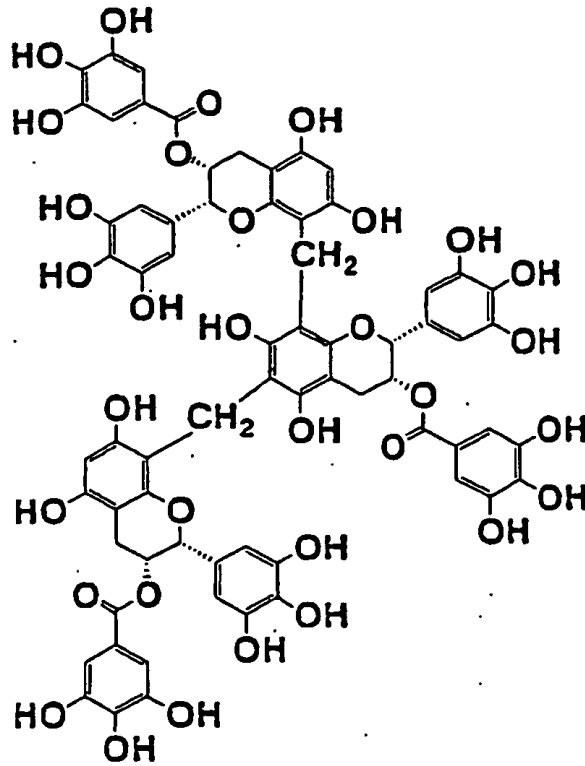
La presente invención se resume mediante los siguientes aspectos [1] a [15]

35 [1] Un trímero de epigalocatequina en el cual las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8;



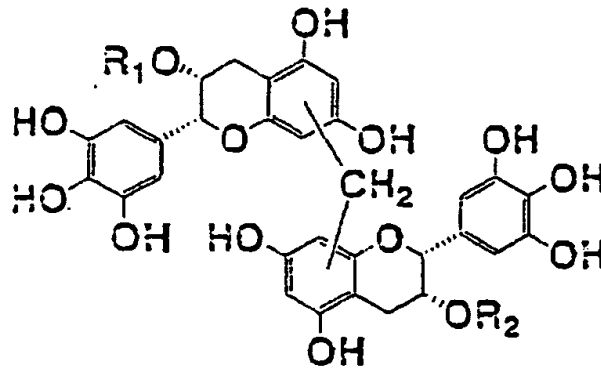
40 en el que R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o un grupo galoílo.

[2] Un trímero de galato de epigalocatequina de la fórmula:

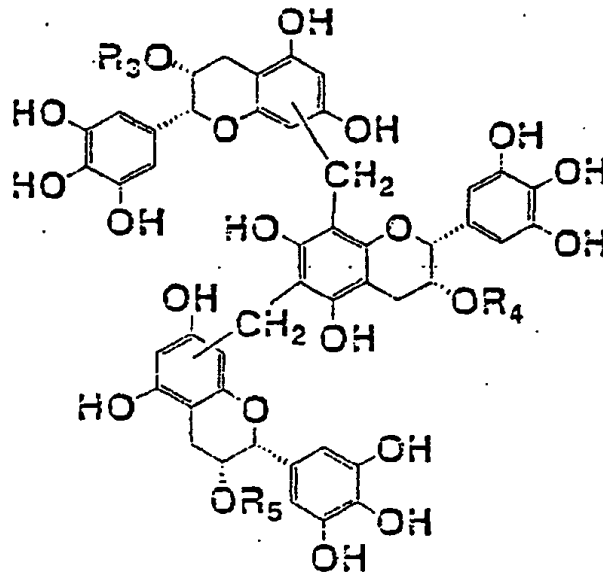


[3] Una composición que comprende un dímero de epigalocatequina en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de un grupo metileno que une sus anillos de cromano en la posición 6 u 8:

5

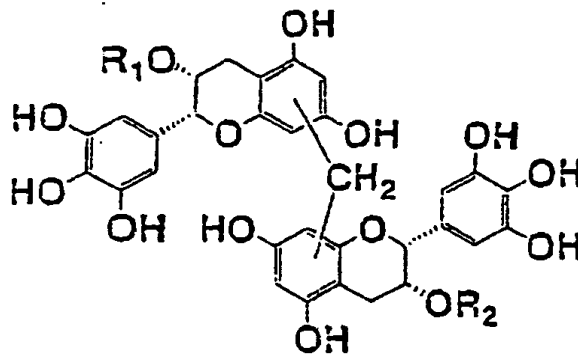


10 en el que R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o un grupo galoilo, y/o un trímero de epigalocatequina en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8:

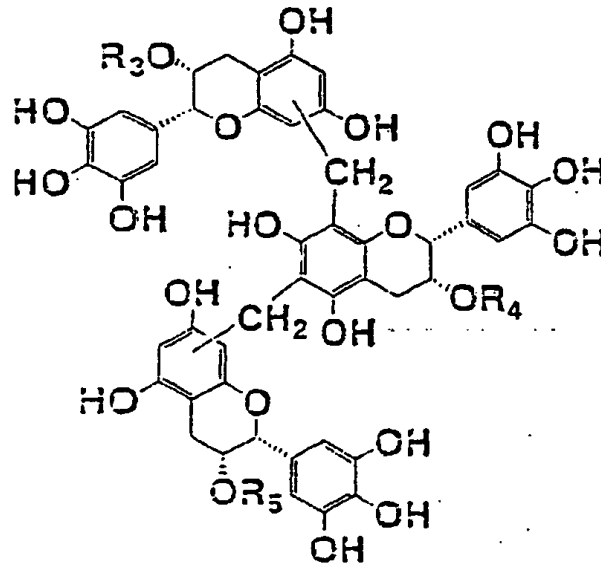


en el que R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo para uso en la supresión de la obesidad y/o la prevención de la obesidad.

- 5 [4] Uso de un dímero de epigalocatequina en el cual las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de un grupo metileno que une sus anillos de cromano en la posición 6 u 8:



- 10 en el que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo y/o un trímero de epigalocatequina en el cual las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8:



en el que R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo para la preparaci3n de una composici3n para uso en la supresi3n de la absorci3n corporal de grasa obtenida de la comida, supresi3n de la elevaci3n de grasa neutra en sangre, supresi3n de la obesidad y/o prevenci3n de la obesidad.

5 [5] La composici3n de acuerdo con el aspecto 3 o el uso de acuerdo con el aspecto 4, en el que la composici3n es una composici3n farmac3utica, alimento o bebida.

10 [6] Un alimento o bebida que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en el aspecto 1 3 2 incluido en el mismo.

[7] Una bebida de t3 que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en el aspecto 1 3 2 incluido en la misma.

15 [8] Una composici3n farmac3utica que comprende el tr3mero de epigalocatequina como se define en el aspecto 1 3 2.

[9] Un cosm3tico que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en el aspecto 1 3 2 incluido en el mismo.

20 [10] Un proceso para producir el d3mero de galato de epigalocatequina de acuerdo con la F3rmula 3 como se define en el aspecto 3 que comprende someter a reacci3n un flavan-3-ol con formaldehido en presencia de un 3cido o que comprende la etapa de disolver un flavan-3-ol en sulf3xido de dimetilo y calentar la soluci3n.

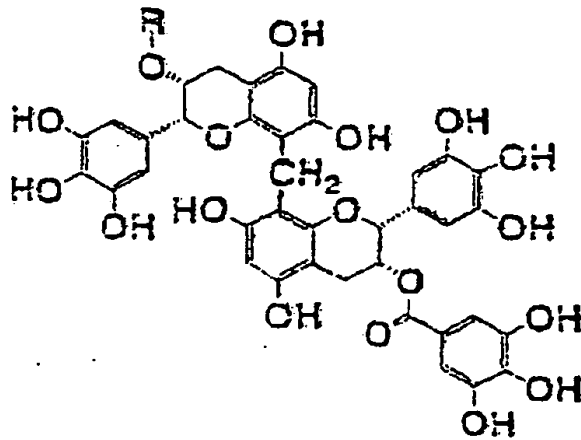
25 [11] Un proceso para producir el tr3mero de galato de epigalocatequina como se define en el aspecto 1 3 2 que comprende someter a reacci3n un flavan-3-ol con formaldehido en presencia de un 3cido o que comprende la etapa de disolver un flavan-3-ol en sulf3xido de dimetilo y calentar la soluci3n.

30 [12] Uso no terap3utico de una composici3n que comprende el d3mero de epigalocatequina de F3rmula 3 o el tr3mero de epigalocatequina de F3rmula 4 como se define en el aspecto 3 para suprimir la absorci3n corporal de grasa obtenida de la comida y/o suprimir la elevaci3n de grasa neutra en sangre.

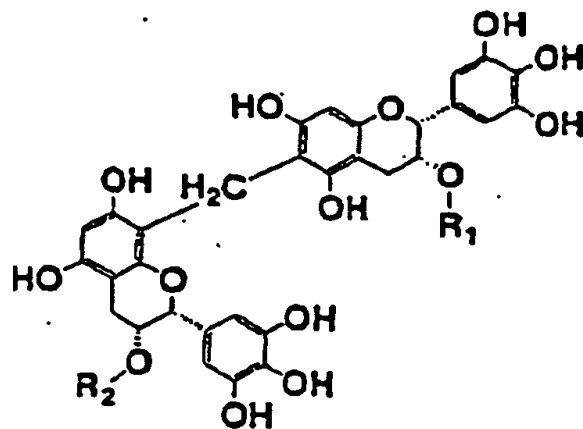
[13] El uso de acuerdo con el aspecto 12, en el que la composici3n es un alimento o bebida.

35 [14] El uso de acuerdo con el aspecto 12, en el que la composici3n es una bebida de t3.

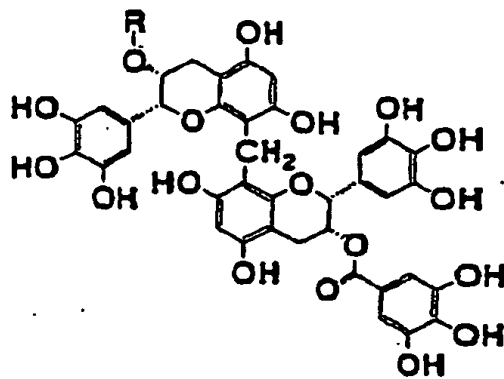
[15] La composici3n de acuerdo con el aspecto 3 3 5, el uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos 4, 5 3 12 a 14, el alimento o bebida de acuerdo con el aspecto 6, la bebida de t3 de acuerdo con el aspecto 7, en los que el d3mero de epigalocatequina se selecciona entre homobisflav3n A de oolong.



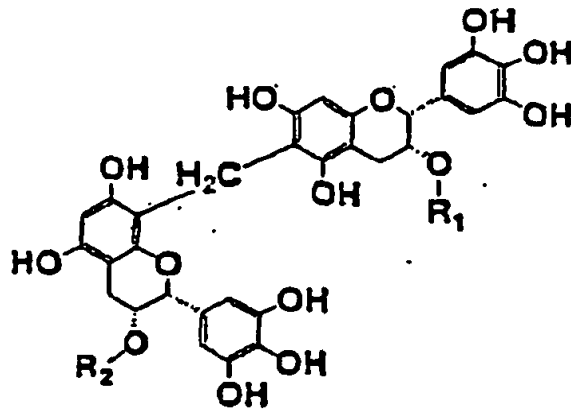
en el que R es un grupo galóilo;
homobisflaván B de oolong



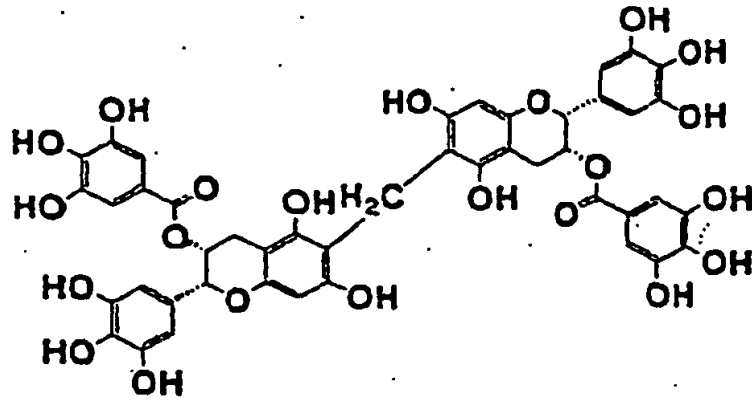
5
en el que R¹ y R² son grupos galóilo;
homobisflaván A de monodesgalloil oolong



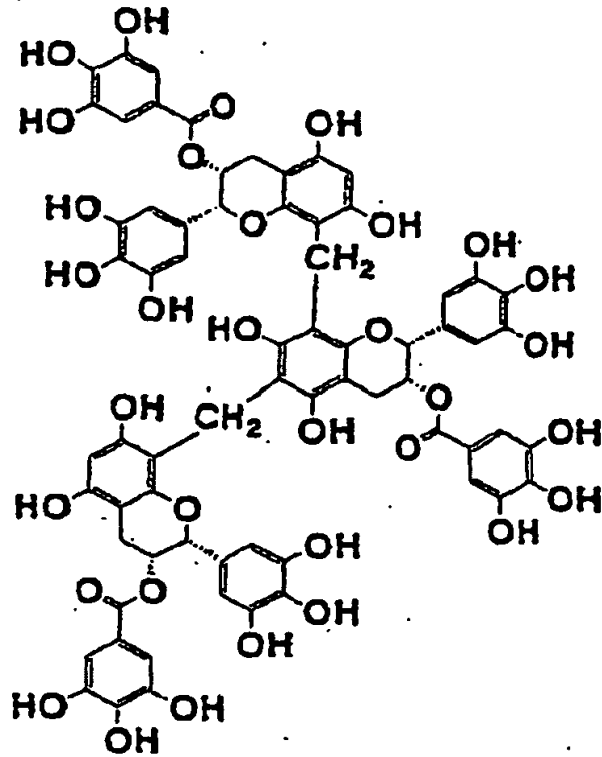
10
en el que R es H;
homobisflaván B de didesgalloil oolong



en el que R¹ y R² son H; u
homobiflaván C de oolong



5 y/o en el que el trímico de epigallocatequina es

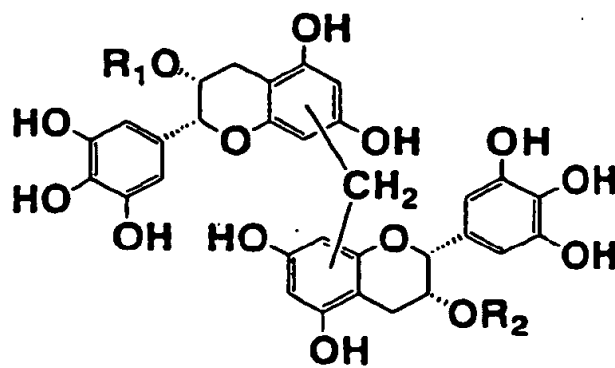


Medios para resolver los problemas

5 Dímeros y trímeros de epigalocatequina

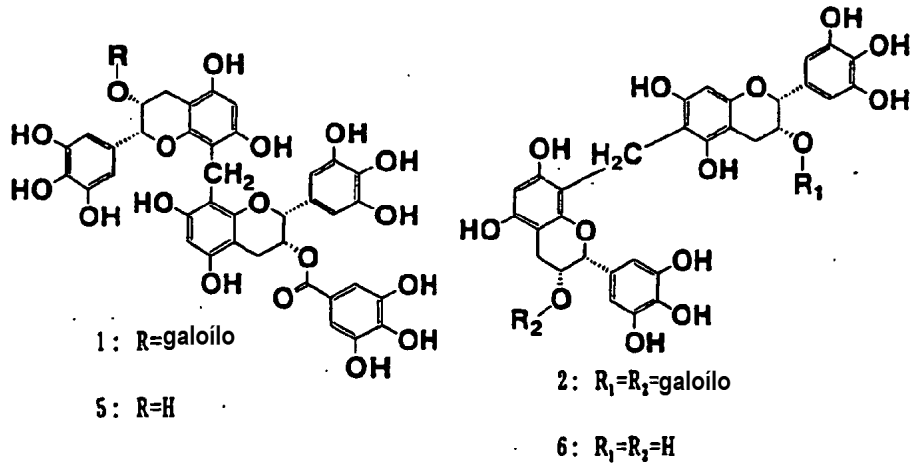
Como medios para alcanzar esos objetos, los presentes inventores encontraron ingredientes en el té oolong que inhibían la lipasa pancreática esencial para la absorción de grasa. Los presentes inventores evaluaron la actividad inhibidora de lipasa de los diversos polifenoles presentes en el té oolong y encontraron que un dímero de epigalocatequina de la siguiente estructura en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de un grupo metileno que une sus anillos de cromano en la posición 6 u 8:

10



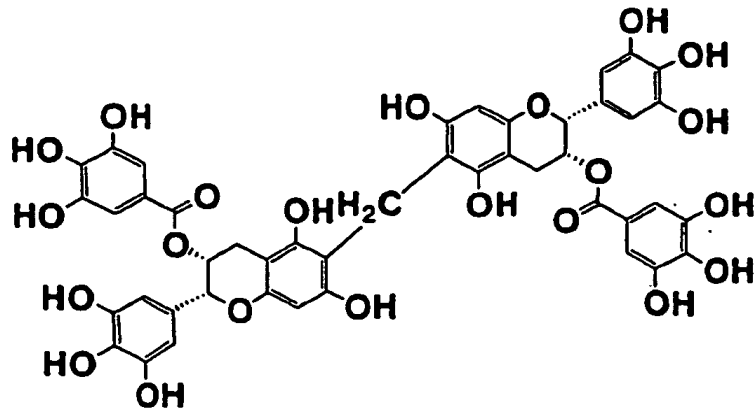
en el que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo, tenían actividad inhibidora elevada.

15 Los dímeros preferidos de la presente invención son compuestos representados por las siguientes fórmulas:



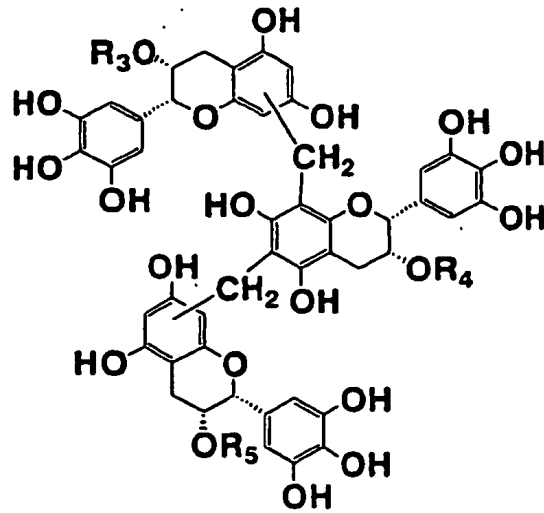
que son homobisflaván A de oolong (1), homobisflaván B de oolong (2), homobisflaván A de monodesgalloil oolong (5) y homobisflaván B de oolong didesgalloilo (6).

- 5 Un dímero de epigalocatequina novedoso sintetizado, denominado homobisflaván C de oolong (3):



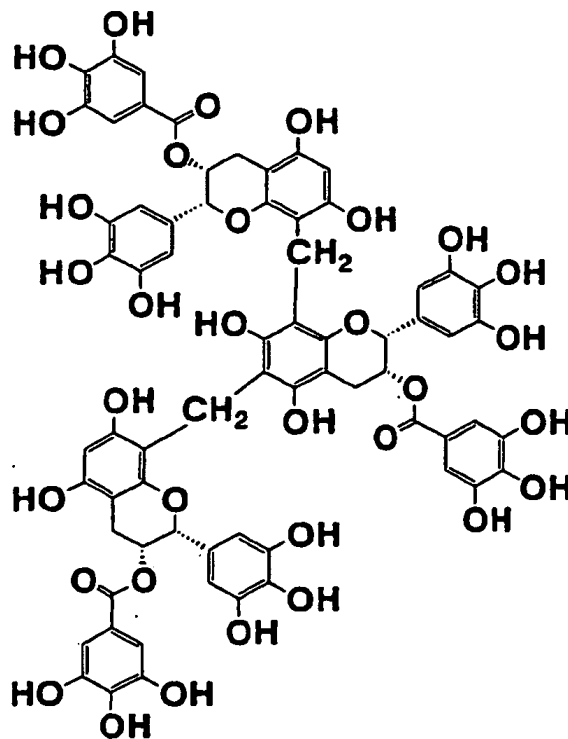
también tenía actividad inhibidora de lipasa elevada.

- 10 También de acuerdo con la presente invención, un trímero de epigalocatequina de la siguiente estructura en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan mediante grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8:



en el que R_3 , R_4 y R_5 son cada uno independientemente H o un grupo galoió, también tenía actividad inhibitora de lipasa marcada.

5 Un trímero de epigalocatequina preferido es un compuesto representado por la siguiente fórmula:



que se denomina compuesto (4).

10

Producción de dímeros y trímeros de epigalocatequina

Los dímeros de epigalocatequina útiles en la presente invención se pueden sintetizar en su mayoría o purificar para recuperación mediante métodos bien conocidos por los expertos. Por ejemplo, homobisflaván A(1) y B(2) de oolong que son ambos dímeros de epigalocatequina se pueden sintetizar mediante el método descrito en Chem. Pharma. Bull. 37 (12), 3255-3563 (1989), mientras que homobisflaván A(5) de monodesgaloiol oolong y homobisflaván B(6) didesgaloió se pueden recuperar a partir de hojas de té mediante el método descrito en Chem. Pharma. Bull. 37 (12), 3255-3563 (1989).

15

- Los trímeros de la presente invención se producen mediante el siguiente procedimiento. En resumen, los mismos se pueden producir mediante un proceso que incluye la etapa de someter a reacción flavan-3-oles tales como epigallocatequina-3-O-galato (7) con formaldehído en un disolvente tal como metanol o etanol, preferentemente metanol, en presencia de un ácido tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, preferentemente ácido clorhídrico 0,01 N. La temperatura de reacción no está limitada a ningún valor particular siempre y cuando los materiales de partida y el producto sean estables pero se prefiere llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente. Como alternativa, los trímeros se pueden producir disolviendo flavan-3-ol tal como epigallocatequina-3-O-galato (7) en dimetil sulfóxido (DMSO) y calentar la solución. Las condiciones de la reacción de calentamiento no se limitan a ninguna forma particular siempre y cuando los materiales de partida y el producto sean estables pero la reacción preferentemente se lleva a cabo a 150-200°C, más preferentemente a 180°C, durante un periodo que preferentemente es entre 1 y 30 minutos, más preferentemente durante 15 minutos. La concentración de formaldehído en la solución de reacción preferentemente es el 3-37% p/v. El producto resultante se puede esterificar, hidrolizar o tratarse de otra manera opcionalmente para preparar formas derivadas.
- Los métodos descritos anteriormente para producir los trímeros también son adecuados para producir los dímeros. Por ejemplo, como se describirá posteriormente en el Ejemplo 3, algunos dímeros incluyendo homobisflaván C novedoso (3) se produjeron mediante esos métodos.

Actividad inhibidora de lipasa

- Los compuestos como se ha descrito anteriormente tienen actividad inhibidora de lipasa, en particular, actividad inhibidora de lipasa pancreática.
- La actividad inhibidora de lipasa se puede medir mediante uno cualquiera de los ensayos de actividad de lipasa que se describen en las solicitudes anteriores mencionadas en los Antecedentes de la Técnica. Con respecto a la actividad inhibidora frente a lipasa pancreática, se puede usar un éster oleico de 4-metilumbeliferona fluorescente como un sustrato para medir la fluorescencia de 4-metilumbeliferona que se forma mediante reacción con la lipasa. La cantidad de una muestra que proporciona el 50% de inhibición de actividad de lipasa (CI_{50}) se puede sustituir para expresar la actividad inhibidora de lipasa de acuerdo con el método habitual.
- Como se mostrará en el Ejemplo 1, los compuestos útiles en la presente invención tenían valores de CI_{50} muy bajos frente a lipasa pancreática en comparación con el inhibidor de lipasa conocido epigallocatequina-3-O-galato (7).
- Por lo tanto, los inhibidores de lipasa se pueden usar en cantidades más pequeñas que los inhibidores de lipasa conocidos hasta ahora de origen natural y pueden suprimir la absorción corporal de grasa obtenida del alimento, suprimiendo de ese modo la elevación de grasa neutra en sangre y/o previniendo la obesidad. Debido a que los compuestos útiles en la presente invención son de origen natural, los mismos presentan niveles de seguridad elevados y son adecuados para la ingesta diaria y/o prolongada de forma que los mismos puedan mostrar la eficacia pretendida. Adicionalmente, los compuestos útiles en la presente invención que se originan a partir del té oolong tienen la ventaja de adecuarse al gusto de la mayoría de los consumidores.

Actividad antioxidante

- Los presentes inventores también observaron que los dímeros y trímeros como se han descrito anteriormente tenían la actividad de captación de radicales de anión superóxido.
- Los radicales de anión superóxido (O_2^-) son un tipo de oxígeno activo formado dentro del organismo vivo, donde los radicales no sólo muestran acción esterilizante sino también inducen una reacción de oxidación indiscriminada y marcada. Este efecto se cree que causa afecciones tales como envejecimiento y formación de cáncer en el organismo vivo, típicamente través de la peroxidación de ácidos grasos insaturados en membranas celulares (véase, por ejemplo, NANZANDO'S MEDICAL DICTIONARY, 18ª ed., pág. 329, publicado el 16 de enero de 1998). Además, una reacción de peroxidación de ácidos grasos insaturados en alimentos conducirá a su deterioro y puede incluso implicar la emisión de olor desagradable a partir del alimento. Por lo tanto, los compuestos como se han definido anteriormente que pueden captar radicales de anión superóxido tienen características beneficiosas en el sentido de que los mismos pueden prevenir una diversidad de afecciones que se producen como resultado del oxígeno activo, incluyendo, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como hipertensión, diabetes e hiperlipemia, enfermedades cardíacas tales como arteriosclerosis, envejecimiento y cáncer.
- La actividad de captación de radicales de aniones superóxido se midió mediante el método que se describirá en el Ejemplo 5. En resumen, se generó O_2^- por medio de reacción de hipoxantina-xantina oxidasa y se usó 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido como un agente de captura para realizar la medición mediante ESR. La medición se condujo en presencia o ausencia de compuestos de epigallocatequina y los resultados se expresaron como CI_{50} o la cantidad de una muestra que proporcionaba el 50% de supresión de generación de O_2^- .
- De acuerdo con el Ejemplo 5, los compuestos de epigallocatequina tenían valores de CI_{50} muy bajos en comparación con el compuesto (7), un captador de radicales de anión superóxido conocido.

Por lo tanto, estos compuestos se pueden usar en cantidades más pequeñas que los captadores de radicales de anión superóxido convencionales de origen natural y pueden aún prevenir una diversidad de afecciones que se producen como resultado del oxígeno activo incluyendo, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como hipertensión, diabetes e hiperlipemia, enfermedades cardíacas tales como arteriosclerosis, envejecimiento y cáncer. Adicionalmente, ya que los compuestos de epigalocatequina son de origen natural, los mismos presentan niveles de seguridad elevados y se pueden ingerir durante un periodo de tiempo prolongado para mostrar la eficacia pretendida.

Alimentos y bebidas que tienen inhibidor de lipasa y/o antioxidante incorporados en los mismos.

Los dímeros y/o trímeros de epigalocatequina se pueden incluir en té con el fin de potenciar los polifenoles en el mismo, produciendo de ese modo alimentos y bebidas que tienen no sólo la acción de reducir la grasa natural y prevenir la peroxidación de lípidos, el envejecimiento y la obesidad, sino también la acción de prevenir una diversidad de afecciones que se producen como resultado del oxígeno activo, incluyendo, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como hipertensión, diabetes e hiperlipemia, enfermedades cardíacas tales como arteriosclerosis, envejecimiento y cáncer.

Los ejemplos de bebidas en las cuales se pueden incorporar los compuestos de epigalocatequina incluyen bebidas gaseosas, bebidas de té, tónicos líquidos, bebidas saludables, bebidas de suministro nutricional, bebidas deportivas y bebidas carbonatadas (incluyendo concentrados líquidos y polvos de preparación de estas bebidas) y los alimentos ilustrativos en los que los compuestos se pueden incorporar incluyendo gomas, caramelos, jaleas, dulces en forma de comprimidos, alimentos saludables, alimentos de suministro nutricional y suplementos dietéticos.

Composición farmacéutica que comprende inhibidor de lipasa y/o antioxidante

Los dímeros y/o trímeros de epigalocatequina se pueden usar para producir agentes farmacéuticos que tengan no sólo acciones tales como la de reducir los triglicéridos, sino también la acción de prevenir una diversidad de afecciones que se producen como resultado del oxígeno activo incluyendo, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como hipertensión, diabetes e hiperlipemia, enfermedades cardíacas tales como arteriosclerosis, envejecimiento y cáncer.

Si los compuestos que se han descrito anteriormente se tienen que usar como medicinas, los mismos se proporcionan en forma de polvo, gránulo, comprimido, cápsula, solución, inyección, solución dérmica, emulsión, ungüento, etc.

Cosméticos que tienen inhibidor de lipasa y/o antioxidante incorporado en los mismos

Los dímeros y/o trímeros de epigalocatequina se pueden usar para producir cosméticos que tienen acciones diversas incluyendo la prevención de peroxidación de lípidos, retardo del envejecimiento y blanqueamiento de la piel.

Los cosméticos en los que los compuestos de epigalocatequina se pueden incluir son cremas faciales, de piel y de cabello, lociones, geles, espuma, champú, enjuague, etc.

Los compuestos de epigalocatequina que pueden ser productos sintetizados o extracción purificada, se pueden usar independientemente en alimentos/bebidas, composiciones farmacéuticas o cosméticos; como alternativa, una mezcla que comprende más de uno de estos compuestos se puede añadir a alimentos o bebidas.

Por lo tanto, si un extracto a partir de un material de partida tal como hojas de té, contiene más de un compuesto como se ha descrito anteriormente, la mezcla extraída se puede emplear como un inhibidor de lipasa sin separar los componentes individuales.

Ventajas de la invención

Mediante la adición de cualquier polifenol de té oolong o dímeros y/o trímeros de epigalocatequina que es un componente de la actividad inhibidora de lipasa más elevada, se pueden proporcionar bebidas que conservan el sabor del té, se adecuan al gusto de muchos consumidores y sirven a los propósitos de prevenir la obesidad y promover la salud.

Los compuestos así como los alimentos y bebidas también tienen actividad antioxidante y contribuyen a la prevención de peroxidación de lípidos y envejecimiento.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra las fórmulas estructurales químicas de las muestras sometidas a la evaluación de su actividad inhibidora de lipasa y actividad antioxidante;

[Fig. 2] La Fig. 2 es un espectro de ¹H-NMR de homobisflaván C de oolong (3);

[Fig. 3] La Fig. 3 es un espectro de ^{13}C -NMR de homobisflaván C de oolong (3);
 [Fig. 4] La Fig. 4 es un espectro de ^1H -NMR de trímero (4); y
 [Fig. 5] La Fig. 5 es un espectro de ^{13}C -NMR de trímero (4).

- 5 La presente invención se describe más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos que de ninguna manera tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

Ejemplo

10 Medición de la actividad inhibidora de lipasa

Para la medición de la actividad de lipasa, se usó un éster oleico de 4-metilumbeliferona fluorescente (4-UMO) como un sustrato y se midió la fluorescencia a partir de 4-metilumbeliferona formada mediante reacción enzimática.

- 15 El tampón usado en la medición fue tris-HCl 13 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 150 mM y CaCl_2 1,36 mM. El sustrato 4-UMO (producto de Sigma-Aldrich Co.) se preparó como una solución 0,1 M en DMSO y después se diluyó 1000 veces con el tampón. La lipasa sometida a medición de enzima era lipasa pancreática de cerdo (producto de Sigma) que se había diluido hasta una concentración de 400 U/ml con el tampón.

- 20 Para comenzar la reacción enzimática, 50 μl de solución 4-UMO tamponada y 25 μl de agua destilada (o una solución acuosa de la muestra) se cargaron y mezclaron en una placa de micro titulación de 96 pocillos y 25 μl de la solución de lipasa tamponada se añadieron posteriormente. Después de reacción de 30 minutos, se añadieron 100 μl de solución tamponada de citrato 0,1 M (pH 4,2) para interrumpir la reacción y se midió la fluorescencia a partir de 4-metilumbeliferona (longitud de onda de excitación: 355 nm; longitud de onda de fluorescencia: 460 nm), que se generó mediante la reacción, con un lector de placa de fluorescencia (Fluoroskan Asent CF: producto de Labsystems).

La actividad inhibidora de la muestra de ensayo se determinó como su cantidad que proporcionaría el 50% de inhibición de la actividad de lipasa (CI_{50} en μl) en comparación con la actividad del control (agua destilada).

30

Ejemplo 2

Muestras de medición

- 35 Homobisflaván A de oolong (1) y homobisflaván B de oolong (2) se sintetizaron de acuerdo con el artículo Chem. Pharm. Bull. 37(12), 3255-3563 (1989). Homobisflaván A de monodesgaloil oolong (5) y homobisflaván B de monodesgaloil oolong (6) se extrajeron y purificaron a partir de hojas de té mediante el método descrito en Chem. Pharm. Bull. 37(12), 3255-3563 (1989). Como alternativa, los mismos se pueden obtener mediante hidrólisis de homobisflaván A de oolong (1) y homobisflaván B de oolong (2) con tanasa. Los compuestos novedosos, homobisflaván C de oolong (3) y trímero (4), se sintetizaron y purificaron mediante los métodos de los Ejemplos 3 y 4 y a partir de entonces se determinó mediante análisis instrumental que tenían las estructuras mostradas en la Fig. 1. Incidentalmente, (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG, compuesto 7) se adquirió en Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

45 Ejemplo 3

Síntesis y purificación de homobisflaván de oolong (OHBF)

A. Síntesis:

50

Cien miligramos de (-)-epigallocatequina-3-O-galato (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) se disolvieron en 2 ml de metanol que contenía HCl 0,01 N y formaldehído al 18,5% y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Al final de la reacción, la mezcla se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

55 B. Condiciones de HPLC preparatoria:

Columna: Develosil C30-UG-5 (2 cm ϕ x 25 cm; Nomura Chemical Co., Ud.)
 Fase móvil: A, 0,1 % TFA/ H_2O ; B, 90% CH_3CN , 0,1 % TFA/ H_2O ; 6 ml/min
 Programa de gradiente: B 10% \rightarrow 40% (0-40 min); B 40% iso (40-60 min)

60

Detección: A 280 nm

- La HPLC preparatoria se realizó en las condiciones especificadas anteriormente, produciendo OHBF-A, OHBF-B, OHBF-C y el trímero en cantidades respectivas de 24,2 mg, 17,2 mg, 5,6 mg y 13,8 mg. Los compuestos individuales se sometieron a EM mediante Q-TOF de micromasa en un modo positivo, tras lo cual se detectaron

65

picos de ión $[M+H]^+$ a m/z 929, 929, 929 y 1399 para OHBF-A, OHBF-B, OHBF-C y el trímero, respectivamente. Los datos espectrales para OHBF-A y OHBF-B concordaron con los que se muestran en Chem. Pharm. Bull. 37(12), 3255-3563 (1989), determinando que aquellos compuestos tenían las estructuras representadas por las fórmulas 1 y 2 en la Fig. 1. Con respecto a OHBF-C y el trímero, las mediciones de NMR para $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}\text{-HSQC}$, $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}\text{-HMBC}$, TOCSY y DQF-COSY se realizaron con espectrómetro DMX-750 (BRUKER BIOSPIN) para mostrar que esos compuestos tenían las estructuras representadas por las fórmulas 3 y 4 en la Fig. 1. Los espectros de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ de OHBF-C se muestran en las Figs. 2 y 3, mientras que los espectros de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ del trímero se muestran en las Figs. 4 y 5.

10 Ejemplo 4

Actividades inhibitoras de lipasa de homobisflaván de oolong y sus trímeros

15 Las actividades inhibitoras de lipasa de seis compuestos (dímeros de OHBF y su trímero), así como del galato de epigallocatequina (EGCG) se midieron de acuerdo con el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en la Tabla 1. Las fórmulas estructurales químicas de los compuestos evaluados en el Ejemplo 4 se enumeran en la Fig. 1.

20 Los dímeros de flavan-3-ol que tienen un grupo galoilo unido al anillo de cromano en la posición 3 a través de un enlace éster, por ejemplo, homobisflaván A, B y C de oolong, así como el trímero mostraron actividad inhibitora de lipasa potente en comparación con EGCG, que era el control, de forma que se sugirió que los dímeros y trímeros en los que EGCG están polimerizados serían útiles como inhibidores de lipasa.

Entre esos compuestos, se ha verificado que homobisflaván A y B de oolong que tienen actividad inhibitora de lipasa particularmente marcada están contenidos en el té oolong.

Tabla 1. Actividades inhibitoras de lipasa de diversos polifenoles

[Tabla 1]

	CI_{50} (μM)
Homobisflaván A de oolong (1)	0,049
Homobisflaván B de oolong (2)	0,108
Homobisflaván C de oolong (3)	0,097
Trímero (4)	0,129
Homobisflaván A de monodesgaloil oolong (5)	2,271
Homobisflaván B de oolong didesgaloilo (6)	2,083
Epigallocatequina-3-O-galato (7)	0,349

30 Ejemplo 5

Actividad de captura de oxígeno activo

35 Se realizó la evaluación de la actividad de captura de radicales de anión superóxido generada por reacción de hipoxantina-xantina oxidasa, un tipo de oxígeno activo.

Método:

40 Después de preparar (1) solución de hipoxantina 3 mM (disuelta en solución tamponada de fosfato 0,1 M a pH 7,4) y (2) ácido dietilentriamina-pentaacético 5,5 mM (disuelto en solución tamponada de fosfato 0,1 M a pH 7,4), 5,0 ml de la solución (1), 3,5 ml de la solución (2) y 1,5 ml de 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido (DMPO, producto de LABOTECH) se mezclaron para preparar el reactivo 1. Una parte de 50 μl del reactivo 1 se colocó en un microtubo de 1,5 ml y se incubó a 37°C durante 4 minutos. Al reactivo 1 incubado, se añadió una solución de metanol de la muestra en una cantidad de 20 μl y después se añadieron 50 μl de xantina oxidasa (0,4 unidades/ml), seguido por agitación durante 10 segundos. La mezcla de reacción se inyectó en un tubo de hematocrito, que se colocó en un aparato de ESR y el barrido en un campo magnético se comenzó 60 segundos después de la adición de xantina oxidasa. Las condiciones de medición de ESR fueron las siguientes: Potencia, 4 mW; Campo C, 335,5 mT, Ancho Sw (\pm), 5 mT; Tiempo Sw, 1 min; Ancho Mod, 0,1 mT; Amp, 160; TiempoC, 0,1 s; Temperatura, 20°C.

Entre las señales de ESR de DMPO-OOH, la señal de la potencia de campo más baja se comparó en altura con la señal de Mn^{2+} de patrón interno y la proporción (S/M) se asumió que representaba la cantidad de O_2^- y la actividad de captura de O_2^- se calculó mediante la siguiente fórmula:

55 **Actividad de captura de O_2^- (%) = $100 - \{100 \times (\text{S/M en presencia de la muestra}) / (\text{S/M en ausencia de la muestra})\}$**

Resultados:

5 Para evaluar de capacidad de homobisflaván A, B y C de oolong (dímeros), así como del trímero de capturar radicales de anión superóxido (O_2^-), se calcularon sus concentraciones capaces de capturar el 50% de O_2^- (CI_{50}) en μM . El control fue galato de epigalocatequina (EGCG). En comparación con EGCG, los homobisflaván de oolong (dímeros y trímeros) se observó que tenían actividad de captura de O_2^- más fuerte.

[Tabla 2]

Tabla 2. Actividad de captura de radical superóxido

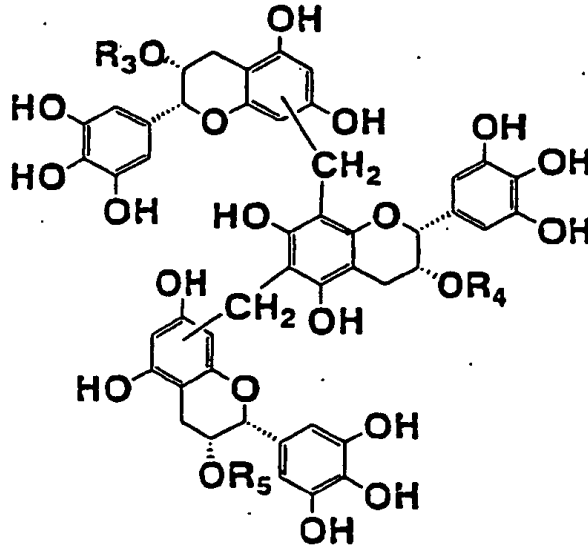
Muestra	P.M.	CI_{50} (μM)
Homobisflaván A de oolong (1)	928	7,9
Homobisflaván B de oolong (2)	928	8,1
Homobisflaván 3 de oolong (1)	928	10,1
Trímero (4)	1398	10,1
EGG (7)	458	14,0

10

REIVINDICACIONES

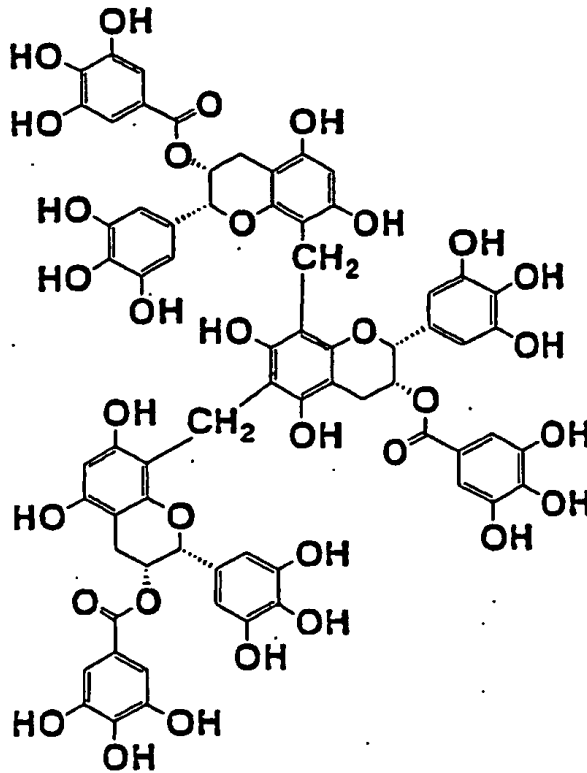
1. Un trímero de epigalocatequina en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8;

5



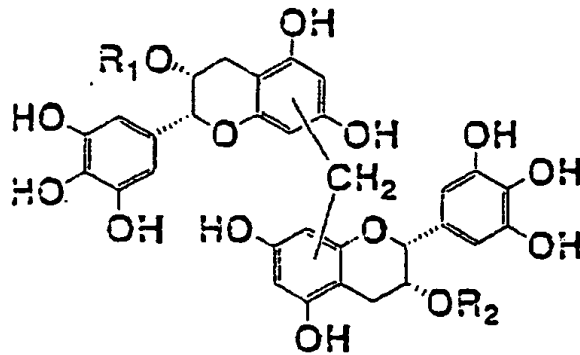
en el que R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo.

10 2. Un trímero de galato de epigalocatequina de la fórmula:



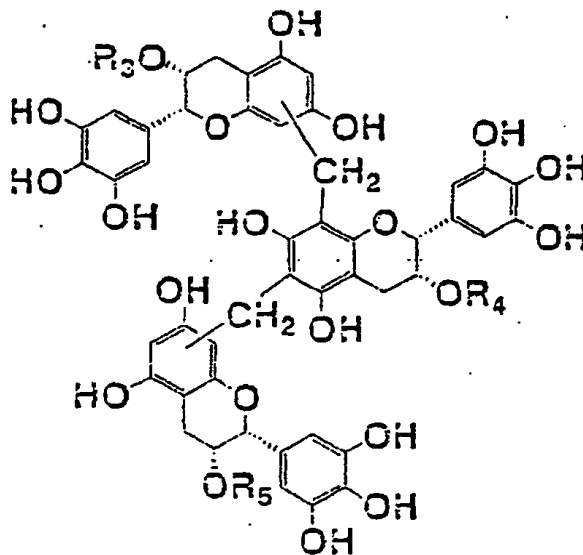
3. Una composición que comprende un dímero de epigalocatequina en el que las unidades de epigalocatequina se polimerizan a través de un grupo metileno que une sus anillos de cromano en la posición 6 u 8:

15



en el que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo, y/o un trímero de epigallocatequina en el que las unidades de epigallocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que unen sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8:

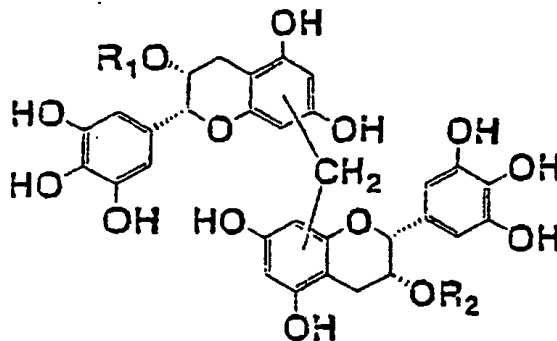
5



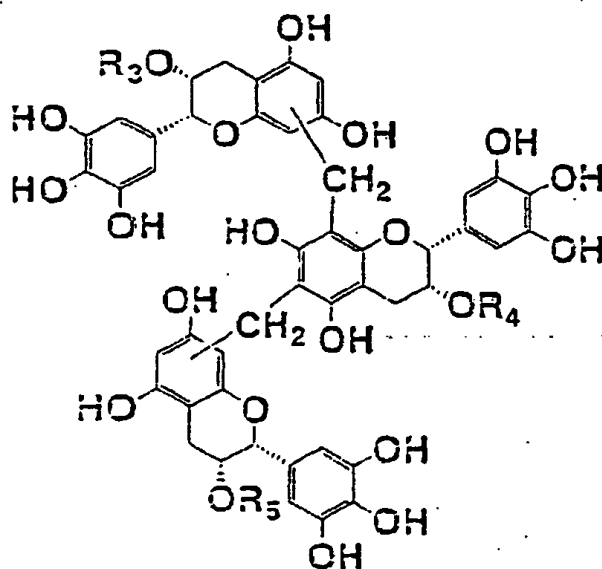
en el que R₃, R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo para uso en la supresión de la obesidad y/o prevención de obesidad.

10

4. Uso de un dímero de epigallocatequina en el que las unidades de epigallocatequina se polimerizan a través de un grupo metileno que forma un puente en sus anillos de cromano en la posición 6 u 8:



15 en el que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o un grupo galoilo y/o un trímero de epigallocatequina en el que las unidades de epigallocatequina se polimerizan a través de grupos metileno que forman un puente en sus anillos de cromano en la posición 6 y/u 8:



en el que R_3 , R_4 y R_5 son cada uno independientemente H o un grupo galoilo para la preparaci3n de una composici3n para uso en la supresi3n de la absorci3n corporal de grasa obtenida de la comida, supresi3n de la elevaci3n de grasa neutra en sangre, supresi3n de la obesidad y/o prevenci3n de la obesidad.

5

5. La composici3n de acuerdo con la reivindicaci3n 3 o el uso de acuerdo con la reivindicaci3n 4, en la que la composici3n es una composici3n farmac3utica, alimento o bebida.

10

6. Un alimento o bebida que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en la reivindicaci3n 1 3 2 incluido en el mismo.

7. Una bebida de t3 que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en la reivindicaci3n 1 3 2 incluido en la misma.

15

8. Una composici3n farmac3utica que comprende el tr3mero de epigalocatequina como se define en la reivindicaci3n 1 3 2.

20

9. Un cosm3tico que tiene el tr3mero de epigalocatequina como se define en la reivindicaci3n 1 3 2 incluido en el mismo.

10. Un proceso para producir el d3mero de galato de epigalocatequina de acuerdo con la F3rmula 3 como se define en la reivindicaci3n 3 que comprende someter a reacci3n flavan-3-ol con formaldehido en presencia de un 3cido o que comprende la etapa de disolver un flavan-3-ol en dimetil sulf3xido y calentar la soluci3n.

25

11. Un proceso para producir tr3mero de galato de epigalocatequina como se define en la reivindicaci3n 1 3 2 que comprende someter a reacci3n un flavan-3-ol con formaldehido en presencia de un 3cido o que comprende la etapa de disolver un flavan-3-ol en dimetil sulf3xido y calentar la soluci3n.

30

12. Uso no terap3utico de una composici3n que comprende el d3mero de epigalocatequina de F3rmula 3 o el tr3mero de epigalocatequina de F3rmula 4 como se define en la reivindicaci3n 3 para la supresi3n de la absorci3n corporal de grasa obtenida de la comida y/o supresi3n de la elevaci3n de grasa neutra en sangre.

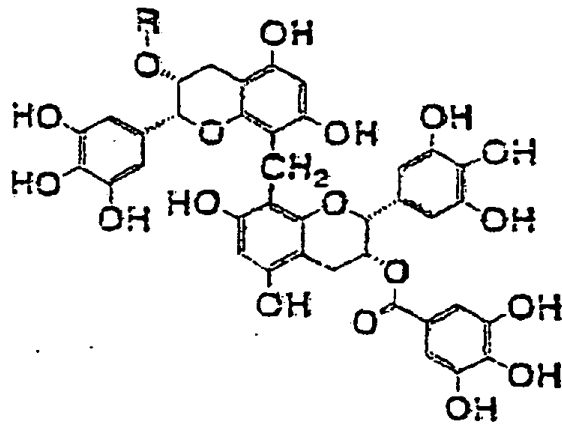
13. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 12, en el que la composici3n es un alimento o bebida.

35

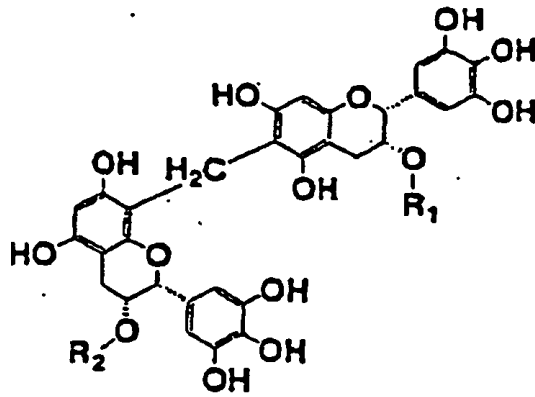
14. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 12, en el que la composici3n es una bebida de t3.

40

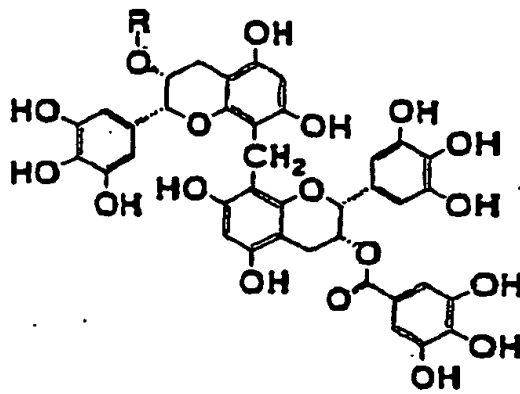
15. La composici3n de acuerdo con la reivindicaci3n 3 3 5, los usos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 12 a 14, el alimento o bebida de acuerdo con la reivindicaci3n 6 o la bebida de t3 de acuerdo con la reivindicaci3n 7, en los que el d3mero de epigalocatequina se selecciona entre homobisflav3n A de oolong.



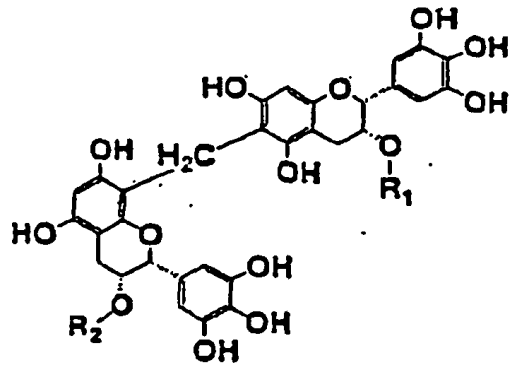
en el que R es un grupo galóilo; homobisflaván B de oolong



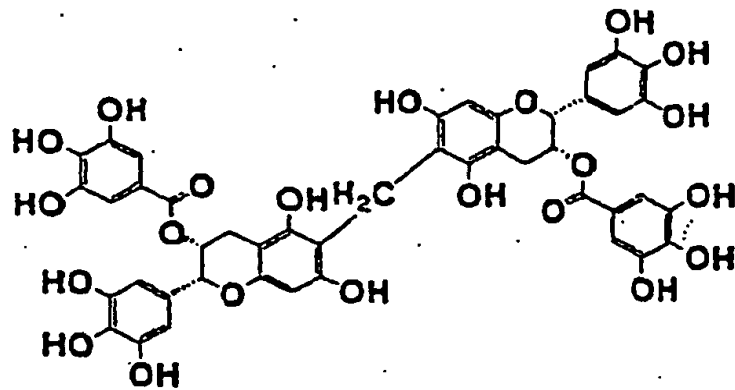
5 en el que R₁ y R₂ son grupos galóilo; homobisflaván A de monodesgaloil oolong



10 en el que R es H;
homobisflaván B de oolong didesgalóilo



en el que R₁ y R₂ son H; u homobisflaván C de oolong



5 y/o en el que el trímico de epigallocatequina es

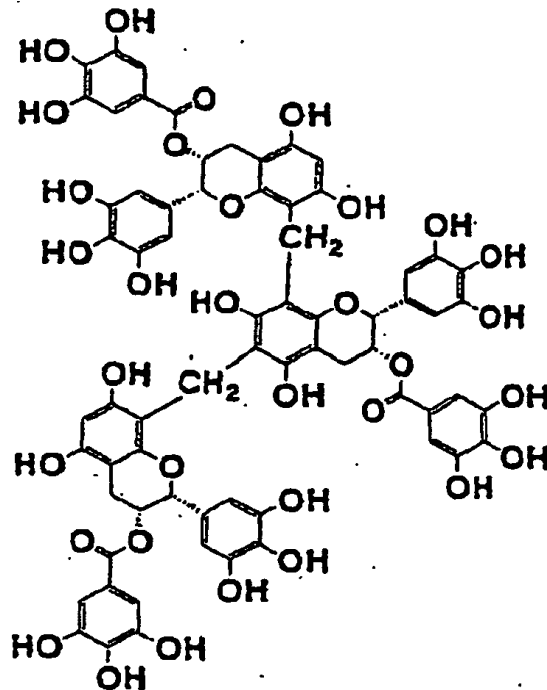


Fig. 1

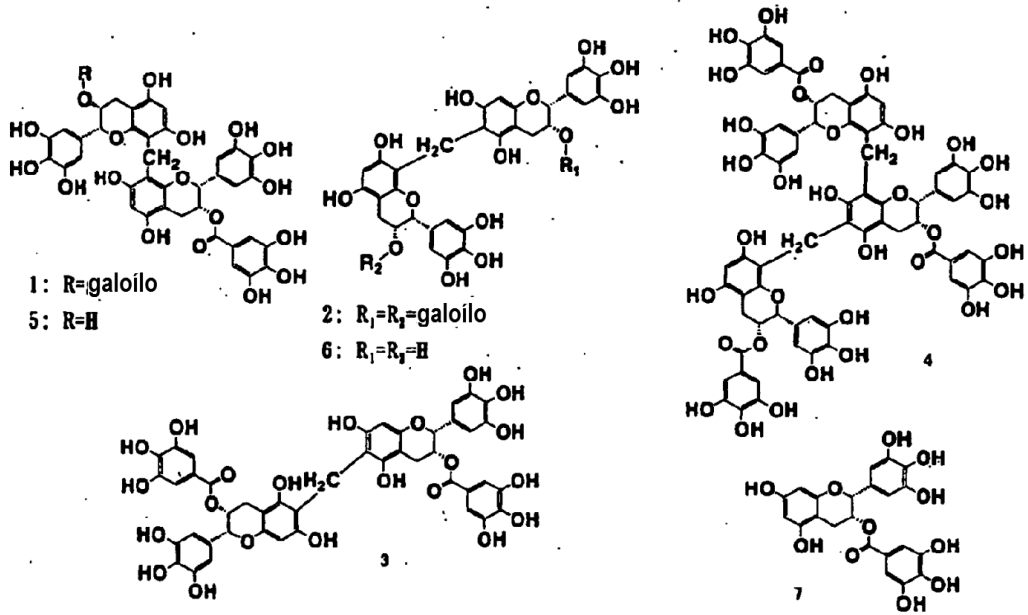


Fig.2

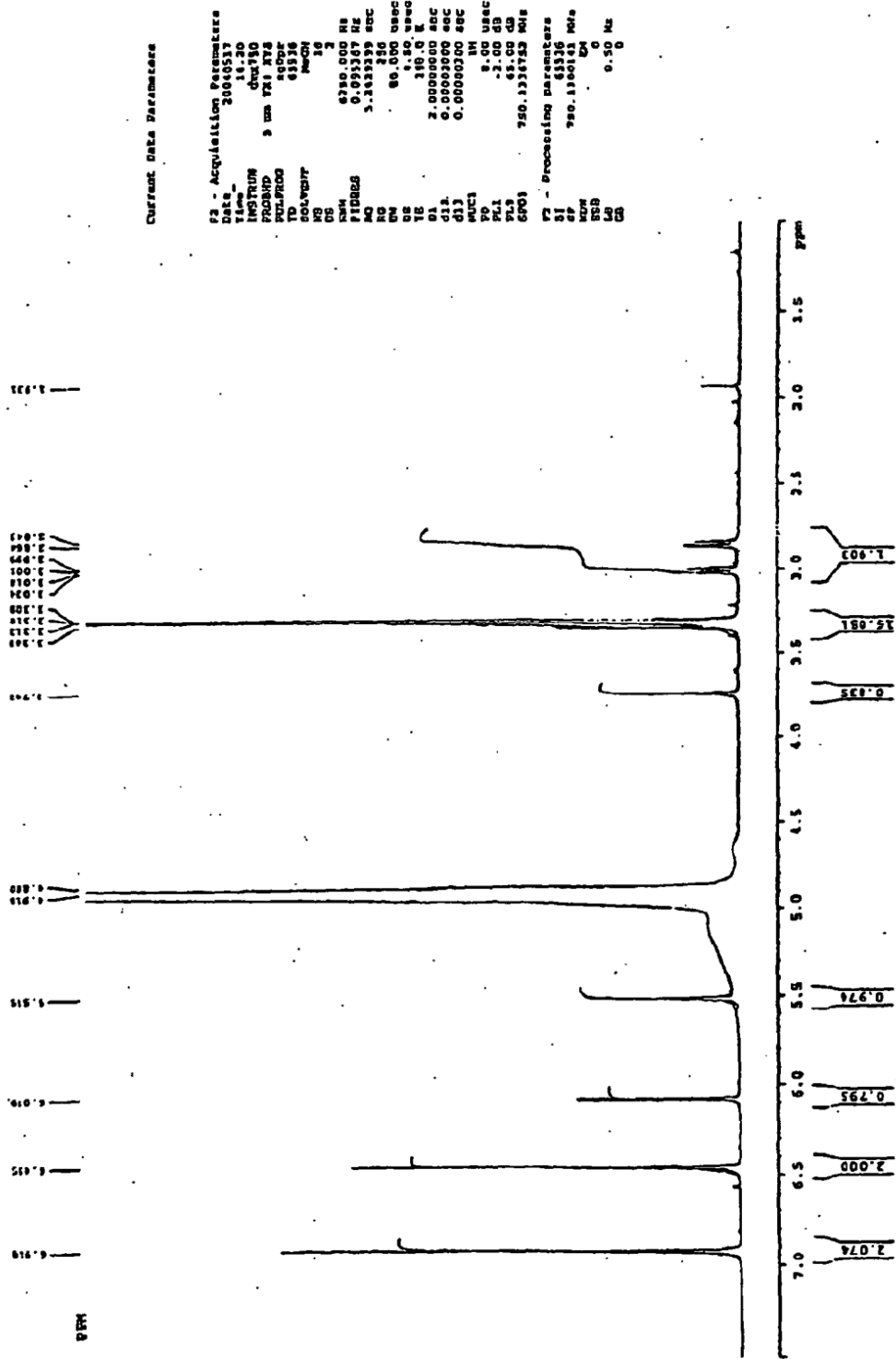


Fig.3

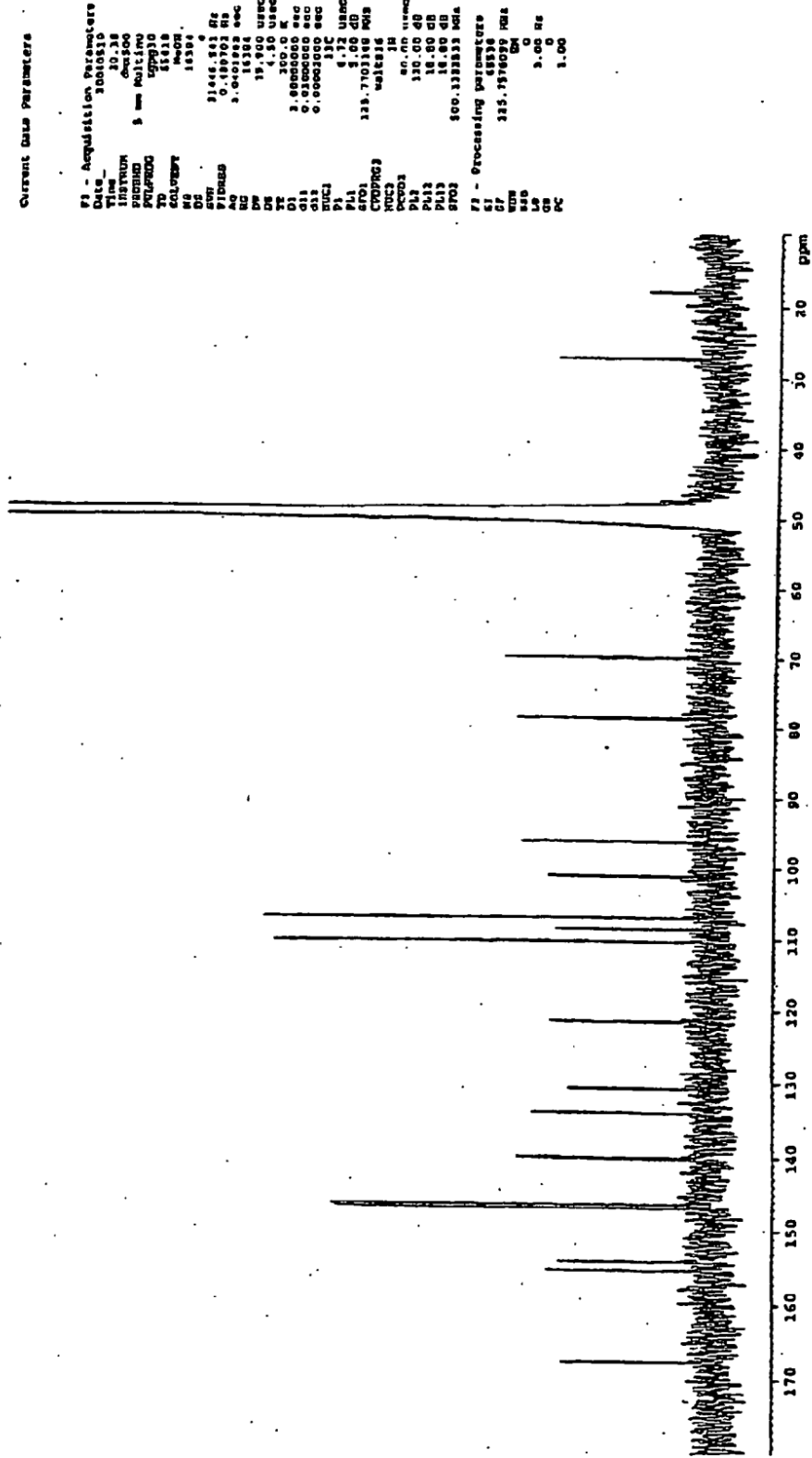


Fig.4

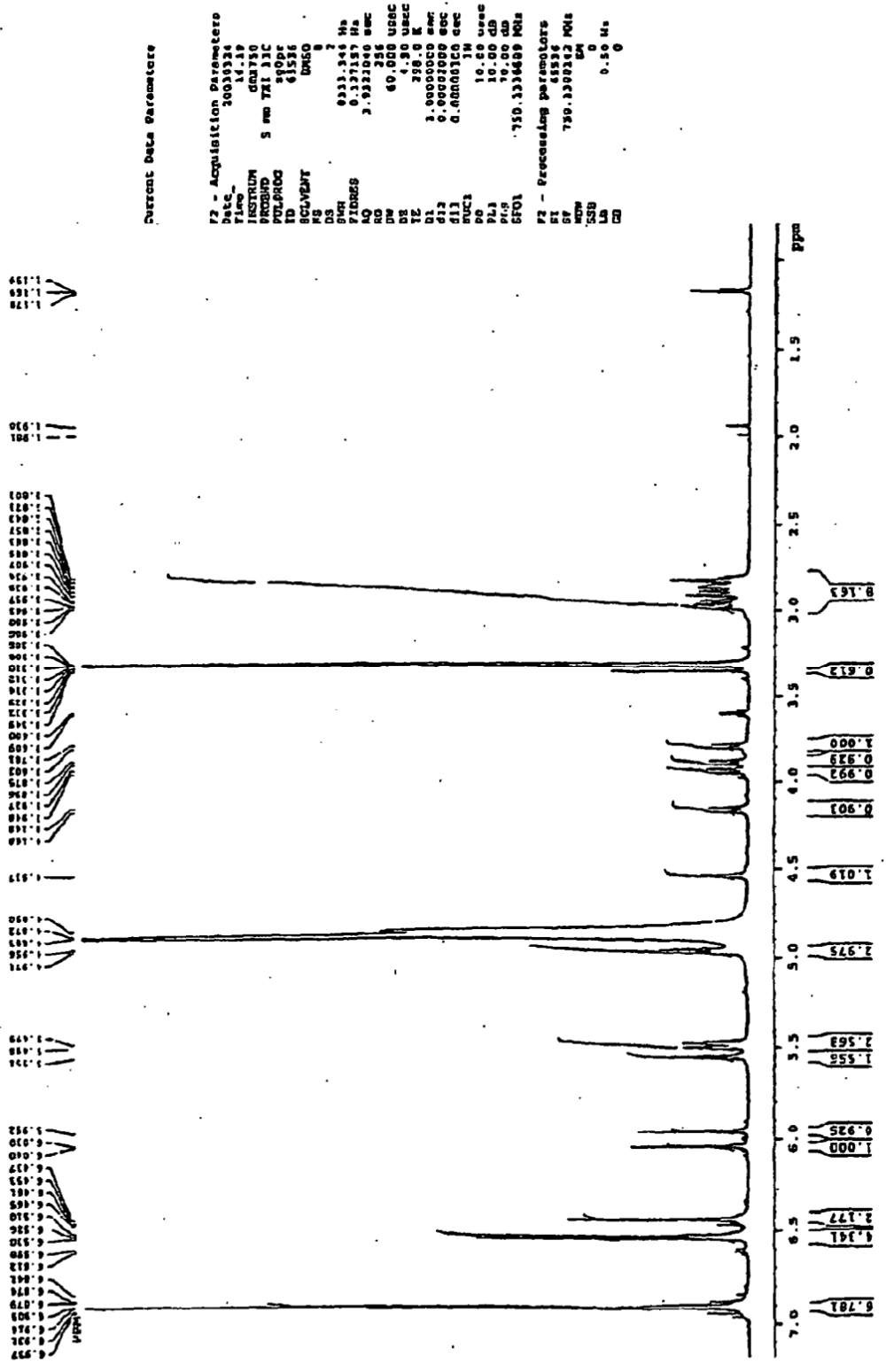


Fig.5

