

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 211**

21 Número de solicitud: 201130710

51 Int. Cl.:
A61K 31/05 (2006.01) **A61P 39/06** (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/87 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **04.05.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.11.2012

71 Solicitante/s:
SELECT BOTANICAL, S.L. (100.0%)
C/ Bori i Fontestà, 49
08017 BARCELONA, ES

72 Inventor/es:
MARAÑÓN MAROTO, José Ángel

74 Agente/Representante:
SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

54 Título: "**COMBINACION SINERGICA DE POLIFENOLES**"

57 Resumen:

Combinación sinérgica de polifenoles.

La presente invención se refiere a una combinación de los polifenoles resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar de aproximadamente 1:1:2 o bien aproximadamente 1:1:5 que presenta un poder antioxidante sinérgico. Esta combinación de polifenoles es adecuada para ser incorporada en todo tipo de formulaciones farmacéuticas, cosméticas, alimenticias o veterinarias y puede utilizarse en la prevención y tratamiento de patologías o estados fisiológicos susceptibles de ser tratados con sustancias antioxidantes y captadoras de radicales libres.

ES 2 391 211 A1

DESCRIPCION

“COMBINACIÓN SINÉRGICA DE POLIFENOLES”

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a composiciones de polifenoles que presentan un poder antioxidante sinérgico.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los compuestos polifenólicos de origen natural, son reconocidos agentes antioxidantes que se ha demostrado son eficaces como captadores de radicales libres. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que se generan de forma natural en los tejidos, y que pueden también formarse de forma incrementada debido a situaciones de estrés ambiental como, por ejemplo, el humo de los cigarrillos, a la presencia de radiaciones ionizantes, a la radiación ultravioleta, o a la contaminación ambiental, así como a otras causas tales como situaciones de estrés o la práctica de un ejercicio muy intenso. Los radicales libres son capaces de inducir la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos del organismo, lo que puede contribuir a la aceleración del proceso de envejecimiento y a desencadenar enfermedades asociadas al envejecimiento como enfermedades degenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares y patologías de tipo dermatológico.

En el estado de la técnica se describe que las propiedades antioxidantes de los polifenoles de origen natural pueden tener aplicación en diferentes áreas terapéuticas, y pueden también contribuir a retardar los signos del envejecimiento gracias a su capacidad de reducir la oxidación celular y tisular.

El resveratrol es un compuesto polifenólico presente en la semilla y en la piel de la uva (*Vitis vinifera*) y en otros productos vegetales. Su interés terapéutico se ha visto reforzado desde que se postuló su posible implicación en los efectos cardioprotectores del vino tinto, tal como se describe en el artículo Siemann *et al.*, *Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine*, Am. J. Eno. Vitic., Free. Rad. Res., 1992, 43, 49-52, y su posible participación en la denominada *paradoja francesa*: La población francesa, que tiene una dieta rica en grasas saturadas, tiene una menor tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular que el resto de países

desarrollados. Esta reducción, se asoció al mayor consumo de vino tinto y a la presencia del resveratrol en el vino tinto.

Numerosos estudios, realizados en modelos experimentales y publicados a lo largo de los últimos años corroboran que el resveratrol:

- 5 – puede ser eficaz para prevenir o disminuir la progresión de diversas patologías como, por ejemplo, cáncer, diabetes, y enfermedades cardiovasculares,
- posee propiedades antivirales y antiinflamatorias, mostrándose como una buena alternativa para el tratamiento de la inflamación crónica,
- 10 – posee propiedades protectoras en diferentes órganos, especialmente en la cardiopatía isquémica asociada al infarto de miocardio, gracias a su capacidad de prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *low density lipoproteins*), y
- frena los síntomas del envejecimiento en levaduras y algunos vertebrados sencillos.

15 También cabe destacar el estudio de Baur *et al.*, *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*, Nature, 2006, 444, 337-342, en el que se demostró que ratas con dieta rica en grasas presentaban mayores patologías y menor supervivencia que otras sometidas a la misma dieta, pero a las que se les administró además resveratrol.

20 Si bien se han observado efectos farmacológicos para el resveratrol incluso a las concentraciones relativamente bajas presentes en las fuentes habituales de la dieta, dada su baja biodisponibilidad (Walle *et al.*, *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*, Drug Metab. Disp., 2004, 32(12), 1377-1382), resulta deseable administrar dosis superiores para alcanzar concentraciones plasmáticas y tisulares más elevadas y para potenciar sus efectos terapéuticos. Sin embargo, se desconocen los posibles efectos nocivos de la administración continuada de dosis altas de resveratrol y, en cualquier caso, el coste económico resultaría muy elevado.

30 Otros polifenoles de la familia de los flavonoides conocidos por sus propiedades antioxidantes son la quercetina y las catequinas tal como se describe, por ejemplo, en los artículos Zhang *et al.*, *Antioxidant properties of quercetin*, Adv. Exp. Med. Biol., 2011, 915, 283-9, y Plumb *et al.*, *Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation*, 1998, 29 (4), 351-8.

En el estado de la técnica se han descrito combinaciones de resveratrol con otros polifenoles para aumentar su biodisponibilidad.

Por ejemplo, la combinación con quercetina, puede contribuir a aumentar la biodisponibilidad del resveratrol, tal como se describe en el artículo De Santi *et al.*,
5 *Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids*, Xenobiotica, 2000, 30 (9), 857-866.

En el estado de la técnica se han descrito algunas combinaciones de resveratrol con otros polifenoles, en particular con quercetina y catequinas, en diferentes proporciones.

10 La solicitud de patente internacional WO-A-2010/135589 está dirigida específicamente a suplementos dietéticos bebibles preparados en base a una suspensión de resveratrol en agua a la que, opcionalmente, se añaden otros ingredientes, por ejemplo, quercetina y/o catequinas procedentes de un extracto de té verde, y que están principalmente en forma galato de epigallocatequina, así como otros anti-
15 oxidantes en forma de extractos o concentrados de origen vegetal, y también otros agentes denominados "energéticos", también de origen vegetal. No se describe ninguna proporción preferida entre el resveratrol y el resto de los componentes adicionales. En particular, se describe un ejemplo concreto de bebida, en la que la proporción en peso entre resveratrol, quercetina y catequinas resultó ser de
20 17,2:3,4:1, equivalente a una relación molar de 21,8:3,3:1.

En la solicitud de patente internacional WO-A-03/015738 se describe una composición cosmética que puede utilizarse para la lucha contra el envejecimiento de la piel y que incluye una combinación de extractos de semillas de uva, de hojas de uva y de pieles de uva. Dichos extractos de semillas de uva contienen polifenoles, especialmente catequinas en cantidades de hasta el 15% en peso, los extractos de
25 hojas de uva contienen quercetinas en cantidades de hasta el 5% en peso, y los extractos de pieles de uva contienen resveratroles en cantidades de hasta el 5% en peso. También se describe un ejemplo con una mezcla de extractos de piel, de hoja y de semillas de uva, que representa una combinación de resveratrol:quercetina:catequinas en una proporción aproximada de 1:1:3 en peso, equivalente a una relación molar aproximada de 1,3:1:3,1. Se describe que dicha combinación presenta un efecto sinérgico en cuanto a la inhibición de las metaloproteinasas de matriz (MMP).
30

En la solicitud de patente internacional WO-A-02/081651 se describen composiciones con resveratrol, catequina, epicatequina y quercetina, solos o en combinación, para su uso como cardioprotectores, y se analiza su actividad fibrinolítica en un modelo *in vitro* con células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC) y en un modelo *in vivo* en rata. En los ejemplos se describen composiciones en forma de cápsulas o zumo de naranja en las que se combina resveratrol, quercetina y catequinas, en una proporción en peso de 1:2,5:7,5, equivalente a una relación molar de 1:1,9:5,9.

Por otro lado, en la solicitud de patente estadounidense US-A-2010/0247670 se describe un extracto seco obtenido a partir de uva negra de la variedad *Vitis labrusca*, que contiene resveratrol, quercetina, catequina y taninos. También se describe la extracción con agua caliente del extracto seco para la obtención de infusiones, que resultaron eficaces para el tratamiento de diversas afecciones, tales como resfriado común, hipercolesterolemia o hiperglucemia, o para tratamientos dermatológicos de tipo cosmético. Se describe también el análisis de dos de las infusiones preparadas, según el cual la proporción en peso entre resveratrol, quercetina y catequina es de 1:5:15 y 1:4:63, equivalentes respectivamente a unas relaciones molares de 1:3,8:11,8 y 1:3:49,5.

Análogamente, en la solicitud de patente española ES-A-2217966 se describen composiciones farmacéuticas, dietéticas y cosméticas con propiedades antioxidantes que comprenden un extracto de piel, semillas y raspa de uva negra de la especie *Vitis vinifera* que contiene polifenoles y antocianos. Entre los polifenoles se encuentran catequina, ácido gálico, quercetina, y resveratrol. Se describe que dicha combinación de polifenoles y antocianos tiene propiedades antioxidantes, en las proporciones en que se obtiene directamente del extracto vegetal. También se describe el resultado del análisis de un extracto de uva negra, en el que resveratrol, quercetina y catequina están en una proporción aproximada de 1:3:21, equivalente a una relación molar aproximada de 1:2,3:16,5.

Subsiste, pues, la necesidad de poder disponer de una composición de resveratrol con propiedades antioxidantes mejoradas, que presente un poder antioxidante elevado incluso a dosis relativamente bajas.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es una combinación sinérgica de polifenoles.

También forma parte del objeto de la invención una composición que comprende dicha combinación.

Forma parte también de la invención la utilización de la combinación para la preparación de una composición con poder antioxidante.

5 También forma parte de la invención la combinación para uso como antioxidante.

Descripción detallada de la invención

10 El objeto de la presente invención es una combinación sinérgica de polifenoles que comprende resveratrol, quercetina y catequina, con una relación molar entre resveratrol, quercetina y catequina de aproximadamente 1:1:2 ó aproximadamente 1:1:5.

15 Los autores de esta invención han desarrollado una combinación de los polifenoles resveratrol, quercetina y catequina en unas proporciones tales que, sorprendentemente, presenta un poder antioxidante sinérgico.

En una realización preferida, la combinación de antioxidantes comprende resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar 1:1:2 ó 1:1:5.

En una realización preferida, la relación molar es 1:1:2.

20 En otra realización preferida, la relación molar es 1:1:5.

En el contexto de la invención, por el término “aproximadamente” se entiende, para el valor “1” de la relación molar, una variación entre 0,9 y 1,1, preferiblemente entre 0,95 y 1,05; para el valor “2” una variación entre 1,8 y 2,2, preferiblemente entre 1,9 y 2,1; y para el valor “5” una variación entre 4,5 y 5,5, preferiblemente entre 4,75 y 5,25, y más preferiblemente entre 4,9 y 5,1.

25 En toda la descripción los porcentajes se refieren a porcentajes en peso y las relaciones son relaciones molares.

En el marco de esta invención, se entiende por “extracto seco” el producto resultante después de someter el extracto vegetal a un proceso de secado por el que se elimina sustancialmente toda el agua que contiene.

30 En el marco de esta invención, se entiende por “extracto purificado” un extracto que tiene un contenido de polifenol igual o superior al 90% en peso sobre el extracto seco. En el caso del resveratrol preferiblemente igual o superior al 95%, más preferiblemente igual o superior al 98%; en el caso de la quercetina preferiblemente igual o superior al 95% expresado como dihidrato de quercetina, más prefe-

riblemente igual o superior al 98%; y en el caso de la catequina un contenido en catequinas expresado como catequina preferiblemente igual o superior al 80%, más preferiblemente igual o superior al 85%.

5 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger las células contra la oxidación y los efectos de los radicales libres, porque eliminan dichos radicales del medio y porque inhiben la oxidación oxidándose ellos mismos.

10 Entre los antioxidantes se encuentran los polifenoles, que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y que poseen una estructura química apropiada para capturar radicales libres.

En su molécula los polifenoles incorporan más de un grupo fenol. Su propiedad como antioxidante proviene de su gran reactividad como donantes de electrones y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado.

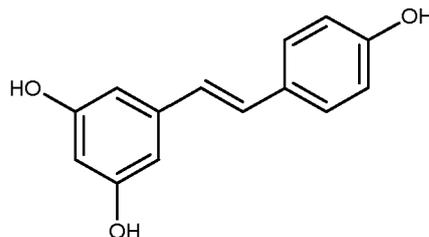
15

Las principales fuentes de polifenoles son los frutos rojos, las hojas de té, cerveza, uva, vino, aceite de oliva, chocolate, cacao, nueces, y granadas, entre otros.

20 Resveratrol

En el contexto de la invención el término resveratrol se refiere a trans-resveratrol y a cis-resveratrol indistintamente, y también incluye al principio activo y a sus posibles hidratos y/o solvatos.

25 El trans-resveratrol es el nombre común que designa al 5-[(1E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]-1,3-bencenodiol, que también puede denominarse 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, y que tiene la siguiente estructura:



El cis-resveratrol es el nombre común que designa al 5-[(1Z)-2-(4-hidroxifenil)etenil]-1,3-bencenodiol, y tiene el doble enlace de la figura anterior en posición cis.

El trans-resveratrol es un compuesto fenólico que se encuentra en la naturaleza, producido por diversas plantas. Así por ejemplo, es uno de los constituyentes de la piel y la semilla de uva y, por consiguiente, uno de los componentes del vino, especialmente del vino tinto.

El trans-resveratrol fue aislado por primera vez en el año 1940 a partir de la raíz del eléboro, tal como se describe en el artículo M. J. Takaoka, *Of the phenolic substances of white hellebore (Veratrum grandiflorum Loes. fil)*, J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University, 1949, 3, 1-16.

El trans-resveratrol puede obtenerse como extracto a partir diversas especies vegetales como, por ejemplo, la piel y la semilla de uva (*Vitis*), los arándanos (*Vaccinium*), la raíz de *Polygonum cuspidatum*, el lúpulo (*Humulus lupulus*), *Cassia garrettiana*, *Cassia Quinquangulata*, *Gnetum klossii*, *Pterolobium hexapetallum*, el cacahuete (*Arachis hypogaea*), el pistacho (*Pistacia vera*), hojas y raíz del ruibarbo (*Rheum rhabarbarum* y *Rheum Rhaponticum*), la corteza de *Bauhinia racemosa*, las hojas de *Veratrum grandiflorum* y la raíz de *Veratrum formosanum*, el eucalipto, el abeto y la píceas, entre otros.

Comercialmente se pueden encontrar extractos vegetales con diversos contenidos de trans-resveratrol, llegando a valores superiores al 95% sobre el extracto seco.

Por ejemplo, el extracto de raíz *Polygonum cuspidatum* de la compañía Select Botanical, es un extracto purificado que tiene un contenido de agua como máximo del 8% en peso, y cuyo extracto seco presenta un contenido de trans-resveratrol superior al 98%, determinado por HPLC.

Así mismo, existen extractos provenientes de semilla de uva y de raíz de *Polygonum cuspidatum* generalmente, con contenidos muy variables de resveratrol que pueden estar comprendidos entre el 0,05% y el 98% determinados por HPLC. La determinación del contenido de resveratrol por HPLC puede hacerse, por ejemplo, según se describe en el artículo Kolouchová-Hanzlíková *et al.*, *Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines*, Food Chem., 2004, 87 (1), 151-158.

Así mismo, el trans-resveratrol puede obtenerse en forma sustancialmente pura a través de suministradores como, por ejemplo, la empresa Sigma-Aldrich.

El trans-resveratrol también puede sintetizarse, por ejemplo según se describe en el artículo Farina *et al.*, *An improved synthesis of resveratrol*, en Nat. Prod. Res., 2006, 20 (3), 247-52.

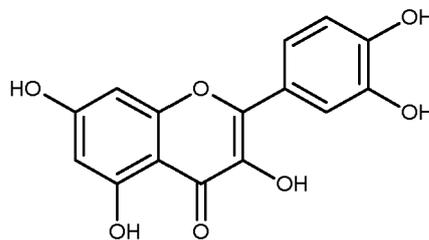
Por su parte, el cis-resveratrol se puede obtener, por ejemplo, a partir de trans-resveratrol por exposición a la radiación ultravioleta.

En la combinación de la invención preferiblemente se emplea trans-resveratrol.

En la combinación de la invención el resveratrol puede ser de origen sintético o natural. Cuando es de origen natural, preferiblemente la fuente de resveratrol es un extracto vegetal. Más preferiblemente como fuente de resveratrol se emplea un extracto de origen vegetal con un contenido elevado en trans-resveratrol, preferiblemente superior al 95% sobre el extracto seco, determinado por HPLC, más preferiblemente un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, y aún más preferiblemente un extracto purificado de raíz de *Polygonum cuspidatum* con un contenido de trans-resveratrol superior al 98% sobre el extracto seco, determinado por HPLC.

Quercetina

La quercetina o 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona, es un polifenol que estructuralmente pertenece al grupo de los flavonoides y que responde a la siguiente fórmula:



25

La quercetina está ampliamente distribuida en la naturaleza, y está presente en gran variedad de plantas y frutos. Debido a ello, la quercetina puede obtenerse como extracto, a partir de diversos vegetales y frutos tales como, por ejemplo, té verde y té negro (*Camellia sinensis*), alcaparras, apio de monte (*Levisticum officina-*

30

le), manzanas, cebolla, uva negra, cítricos, papaya, tomate, brócoli, coliflor, chile (*Capsicum annum*), arándanos, o *Sophora japonica*, entre otros.

La quercetina se puede encontrar comercialmente como extracto de origen vegetal con diversos contenidos, que pueden llegar a ser superiores al 98% sobre el extracto seco, determinado por HPLC, expresado como dihidrato de quercetina. Por ejemplo, el extracto purificado de flores de acacia del Japón o árbol de las pagodas (*Sophora Japonica*), de la compañía Select Botanical, se presenta en forma de un polvo amarillo que contiene quercetina en forma de dihidrato de quercetina, con un contenido en agua que como máximo es del 12,5%, y que tiene un contenido mínimo de dihidrato de quercetina del 98% sobre el extracto seco, determinado por HPLC, por ejemplo según se describe en el artículo Beecher *et al.*, *Analysis of tea polyphenols*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1999, 220(4), 267-70.

También se encuentra quercetina como extracto de cebolla (*Allium cepa*) con concentraciones variables comprendidas entre el 0,5% y el 40%, y como extractos de manzana, espárrago y uvas.

La quercetina también puede obtenerse comercialmente en forma sustancialmente pura a través de suministradores tales como Sigma-Aldrich.

Por otro lado, la quercetina puede sintetizarse, por ejemplo, según se describe en el artículo Shakhova *et al.*, *Zh. Obshch. Khim.*, 1962, 32, 390.

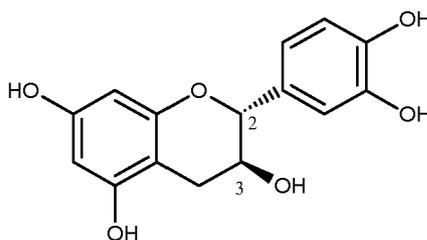
En el contexto de la presente invención, el término quercetina se entiende en forma amplia e incluye al principio activo y a sus posibles hidratos y/o solvatos. En una realización preferida de esta invención, la quercetina está en forma de dihidrato.

En la combinación de la invención la quercetina puede ser de origen sintético o natural. Cuando es de origen natural, preferiblemente la fuente de quercetina es un extracto vegetal. Más preferiblemente se emplea un extracto de origen vegetal con un contenido elevado de quercetina, como por ejemplo superior al 95% sobre el extracto seco expresado como dihidrato de quercetina, y más preferiblemente un extracto de *Sophora japonica*, y aún más preferiblemente un extracto purificado de *Sophora japonica* con un contenido superior al 98% de dihidrato de quercetina sobre el extracto seco.

Catequina

La catequina es el nombre común por el que conoce al producto (2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-cromen-3,5,7-triol, un polifenol también perteneciente al grupo de los flavonoides, y que tiene la siguiente estructura:

5

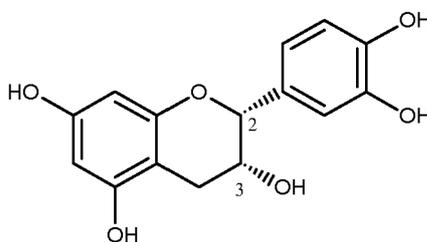


10 La molécula de catequina tiene dos carbonos asimétricos o centros quirales en las posiciones 2 y 3, tal como se indica en la estructura anterior y, por tanto, existen en realidad cuatro estereoisómeros distintos: dos de ellos en la configuración *cis* y dos en la configuración *trans*. Las dos formas *trans* corresponden al enantiómero (2*R*,3*S*), representado en la fórmula anterior, y al enantiómero (2*S*,3*R*), en el que se invierte la configuración de los dos carbonos asimétricos 2 y 3.

15

Los dos enantiómeros que están en configuración *cis* se denominan habitualmente epicatequina. Así pues, la denominación epicatequina corresponde al producto (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-cromen-3,5,7-triol, que presenta la siguiente estructura:

20



Al igual que para el isómero *trans*, se entiende por epicatequina el conjunto formado por los dos isómeros *cis*, tanto el enantiómero (2*R*,3*R*) representado arri-

25

ba, como el correspondiente enantiómero (2S,3S), en el que se invierte la configuración de los dos carbonos asimétricos 2 y 3.

Las catequinas también se encuentran en la naturaleza en forma de dímeros y trímeros, que se conocen por el nombre de proantocianidinas o procianidinas o
5 proantocianidinas oligoméricas.

En el marco de la presente invención se denomina catequina a cualquiera de los 4 estereoisómeros mencionados, es decir, tanto la catequina como la epicatequina y sus respectivos enantiómeros, a cualquiera de sus posibles dímeros o trímeros en la forma de proantocianidinas tipo B (dímeros formados a partir de catequina y/o epicatequina) o proantocianidinas tipo C (trímero formado a partir de epicatequina), a los dímeros en forma de galato, y a cualquier mezcla de los anteriores.
10

Comercialmente la fuente de catequina puede ser un extracto vegetal con diferentes contenidos en catequinas, que pueden llegar a ser iguales o superiores al
15 90% sobre el extracto seco expresado como catequina. Por ejemplo, el extracto purificado de *Vitis vinifera* de la compañía Select Botanical, que se presenta en forma de un polvo anaranjado con un contenido en agua de como máximo el 8% y con un contenido de catequinas de aproximadamente el 90% sobre el extracto seco expresado como catequina, determinado por espectrofotometría, por ejemplo según
20 se describe en el artículo Peri *et al.*, *An Assay of Different Phenolic Fractions in Wines*, Am. J. Enol. Vitic., 1971, 22(2), 55-58. Dicho extracto contiene una mezcla de trans-catequina, epicatequina, dímeros en forma de galato, y proantocianidinas. Otras fuentes de catequinas son los extractos procedentes de té verde, cacao, café verde y arándanos.

Comercialmente también pueden obtenerse las formas enantioméricas puras de la catequina como, por ejemplo, (2S,3R) a través de suministradores tales como Sigma-Aldrich.
25

En una realización preferida de la presente invención se emplea la catequina (2S,3R)-2-(3,4-dihroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromen-3,5,7-triol en forma sustancialmente pura.
30

En una realización más preferida de la presente invención, la catequina es el isómero trans, en cualquiera de sus formas enantioméricas (2S,3R) ó (2R,3S), o bien una mezcla de los dos en cualquier proporción, y opcionalmente conteniendo además epicatequina en cualquiera de sus dos formas enantioméricas y/o proanto-

cianidinas, o cualquier mezcla de los anteriores en cualquier proporción, preferentemente obtenida a partir de extractos vegetales. En una realización aún más preferida, la fuente de catequina es un extracto de uva, es decir, un extracto de *Vitis vinífera* preferiblemente con un contenido de catequinas igual o superior al 80% sobre el extracto seco expresado como catequina, y aún más preferiblemente se emplea un extracto purificado de *Vitis vinífera* con un contenido de catequinas igual o superior al 90% sobre el extracto seco expresado como catequina.

En la presente invención se pueden emplear extractos vegetales como fuentes de los antioxidantes que contengan diferentes contenidos de resveratrol, de quercetina, de catequina, o extractos que contengan mezclas de dos o más de estos polifenoles.

Preferiblemente se emplea un extracto vegetal que contiene resveratrol sustancialmente puro, es decir, con un contenido en resveratrol superior al 90% sobre el extracto seco, preferiblemente superior al 92%, más preferiblemente superior al 95%, y aún más preferiblemente superior al 98%.

Preferiblemente se emplea un extracto vegetal que contiene quercetina sustancialmente pura, es decir, con un contenido superior al 90% sobre el extracto seco, preferiblemente superior al 92%, más preferiblemente superior al 95%, y aún más preferiblemente superior al 98% expresado como dihidrato de quercetina.

Preferiblemente se emplea un extracto vegetal que contiene catequina sustancialmente pura, es decir, con un contenido en catequinas superior al 80% sobre el extracto seco, preferiblemente superior al 85%, y más preferiblemente superior al 90% expresado como catequina.

En una realización especialmente preferida, la combinación de antioxidantes comprende resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar resveratrol:quercetina:catequina de aproximadamente 1:1:2, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, preferiblemente con un contenido de trans-resveratrol superior al 95% sobre el extracto seco, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, preferiblemente con un contenido de dihidrato de quercetina superior al 98% sobre el extracto seco, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*, preferiblemente con un contenido de catequinas igual o superior al 90% sobre el extracto seco expresado como catequina.

En una realización especialmente preferida, la combinación de antioxidantes comprende resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar resvera-

5 trol:quercetina:catequina de aproximadamente 1:1:5, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, preferiblemente con un contenido de trans-resveratrol superior al 95% sobre el extracto seco, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, preferiblemente con un contenido de dihidrato de quercetina superior al 98% sobre el extracto seco, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*, preferiblemente con un contenido de catequinas igual o superior al 90% sobre el extracto seco expresado como catequina.

10 En otra realización especialmente preferida, la combinación de antioxidantes consiste esencialmente en resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar resveratrol:quercetina:catequina de aproximadamente 1:1:2, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, preferiblemente con un contenido de trans-resveratrol superior al 95% sobre el extracto seco, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, preferiblemente con un contenido de dihidrato de quercetina superior al 98% sobre el extracto seco, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*, preferiblemente con un contenido de catequinas igual o superior al 90% sobre el extracto seco, expresado como catequina.

20 En otra realización especialmente preferida, la combinación de antioxidantes consiste esencialmente en resveratrol, quercetina y catequina en una relación molar resveratrol:quercetina:catequina de aproximadamente 1:1:5, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, preferiblemente con un contenido de trans-resveratrol superior al 95% sobre el extracto seco, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, preferiblemente con un contenido de dihidrato de quercetina superior al 98% sobre el extracto seco, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*, preferiblemente con un contenido de catequinas igual o superior al 90% sobre el extracto seco expresado como catequina.

25 En una realización preferida, la combinación de antioxidantes no contiene rutina.

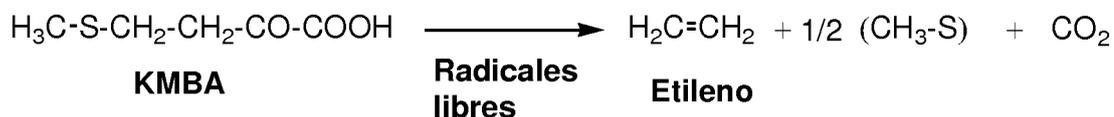
30 La combinación de polifenoles que consiste en trans-resveratrol, catequina ((2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-cromen-3,5,7-triol, su enantiómero o mezclas de ambos), epicatequina ((2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-cromen-3,5,7-triol, su enantiómero, o mezclas de ambos), quercetina y rutina en una proporción molar 1:1:1:1, en donde cada uno de los polifenoles tienen una pureza cromatográfica igual o superior al 90%, como los suministrados por la compañía Sigma-Aldrich, no forma parte de la invención.

Ensayos de poder antioxidante

El poder antioxidante de las composiciones de la presente invención se puede determinar empleando un método *in vitro* diseñado para valorar la capacidad captadora de radicales libres de las sustancias ensayadas. Por ejemplo, el método denominado TOSC (del inglés *Total Oxidant Scavenging Capacity*), que permite la

determinación del poder antioxidante de los compuestos a concentraciones bajas. Con el método TOSC se puede determinar el poder antioxidante de un compuesto a una concentración específica, y puede aplicarse tanto a soluciones con antioxidantes puros como en mezclas complejas.

En el método TOSC se determina la capacidad de la sustancia a ensayar para inhibir la oxidación del ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico (KMBA, del inglés *alpha-keto-gamma-methylthiobutiric acid*) a etileno por la acción de radicales libres como, por ejemplo, hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) o peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). Según se describe en Winston *et al.*, *A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids*, Free Rad. Biol. Med., 1998, 24(3), 480-493, la reacción que tiene lugar es la siguiente:



20

Preferiblemente, se realizó el ensayo TOSC frente a radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) puesto que son más estables y con una vida media más larga que los radicales hidroxilo o los radicales peroxinitrito. Los radicales peroxilo pueden obtenerse por descomposición térmica e hidrólisis simétrica del compuesto 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (ABAP). De este modo, el poder antioxidante de las sustancias ensayadas se puede medir por la capacidad de inhibir la formación de etileno en presencia de radicales peroxilo comparado con una reacción control, en la que no se emplea una sustancia antioxidante como inhibidor.

Los valores TOSC se determinan según la metodología descrita en los artículos Regoli *et al.*, *Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals*, Toxicol. Appl. Pharm., 1999, 156, 96-105 y Regoli *et al.*, *Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of mi-*

crossomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants, Aquat. Toxicol., 2000, 49(1-2), 13-25.

5 Esencialmente, los valores TOSC se cuantifican midiendo la formación de etileno, por comparación de las áreas integradas para cada sustancia ensayada y la sustancia control, según la siguiente ecuación:

$$TOSC = 100 - \left(\frac{\int \text{Sustancia ensayada}}{\int \text{Sustancia control}} \times 100 \right)$$

10 Las sustancias control, sin capacidad de eliminación de radicales libres, tienen un valor TOSC del 0%, puesto que tienen la misma área bajo la curva que el control. Los compuestos que impiden completamente la formación de etileno tienen un área bajo la curva igual a 0 y, por tanto, un valor TOSC del 100%.

15 Sorprendentemente, los autores de la presente invención observaron que la combinación de los polifenoles resveratrol, quercetina y catequina en las proporciones molares aproximadamente 1:1:2 y aproximadamente 1:1:5 muestran una actividad antirradicalaria sinérgica, ya que se obtienen unos valores de TOSC para las combinaciones notablemente superiores a la suma de los valores TOSC de sus componentes, tal como se describe en el Ejemplo 3.

20 Como resultado de este efecto sinérgico, es posible obtener un potente efecto antioxidante sin necesidad de ingerir grandes cantidades de resveratrol, o de los demás antioxidantes individuales, lo cual es ventajoso de cara a minimizar posibles riesgos de efectos secundarios.

25 Composiciones

También forma parte del objeto de la invención una composición que comprende la combinación de polifenoles de la invención y un vehículo aceptable.

30 La composición se selecciona entre una composición farmacéutica, una composición cosmética, una composición alimenticia, un suplemento dietético, y una composición veterinaria, y el vehículo es respectivamente farmacéutica, cosmética, alimentaria, dietética, o veterinariamente aceptable.

Las formas farmacéuticas aptas para incorporar la combinación de polifenoles de la presente invención pueden formularse para su administración oral, nasal, rectal, parenteral o tópica. Son adecuadas tanto las formas farmacéuticas sólidas y

semi-sólidas tales como comprimidos, cremas, cápsulas duras, cápsulas blandas, grageas, presentaciones en polvo; como las líquidas o semi-líquidas, tales como jarabes o cualquier tipo de solución, suspensión o emulsión acuosa, o no acuosa.

Las composiciones farmacéuticas se formulan de acuerdo con los procedimientos que son conocidos por el experto en tecnología farmacéutica, como se describe, por ejemplo, en el libro M. E. Aulton, *Farmacía. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*, segunda edición, Elsevier, Madrid, 2004. Por ejemplo, mediante la mezcla de la combinación antioxidante de la invención con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, con uno o más productos con funcionalidades terapéuticas o dietéticas, como por ejemplo vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes.

Los excipientes aptos para ser usados en las composiciones farmacéuticas objeto de la presente invención son bien conocidos por el experto en tecnología farmacéutica y se describen, por ejemplo, en el libro R. C. Rowe, P. J. Sheskey y P.J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, cuarta edición, Pharmaceutical Press, 2003.

Así por ejemplo, entre los tipos de excipientes y vehículos adecuados para ser usados en las formulaciones líquidas, en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones, están, por ejemplo, disolventes, tampones, modificadores de la viscosidad, modificadores de la densidad, agentes tensioactivos y emulsionantes, agentes floculantes, humectantes, conservantes, edulcorantes y aromatizantes, y mezclas de los anteriores. Análogamente, entre los tipos de excipientes y/o vehículos adecuados para ser usados en las composiciones farmacéuticas sólidas están, por ejemplo, las sustancias de relleno, agentes aglutinantes, antiadherentes, lubricantes, agentes antiapelmazantes, materiales para el recubrimiento de comprimidos, gelatina para cápsulas duras y blandas, plastificantes, estabilizantes, agentes conservantes, colorantes, esencias, y sus mezclas.

La combinación de polifenoles de la invención también puede incorporarse en composiciones cosméticas para su aplicación externa, típicamente para el cuidado del cabello o de la piel. Las formas cosméticas adecuadas para incorporar las combinaciones antioxidantes de la presente invención son, por ejemplo, cremas, geles, leches, lociones, emulsiones pulverizables, y barras sólidas, entre otras.

Las composiciones cosméticas se formulan de acuerdo con los procedimientos que son conocidos por el experto en la materia, mediante la mezcla de la com-

binación de polifenoles de la invención con al menos un vehículo cosméticamente aceptable en el cual se disuelve, se emulsiona, se dispersa, o se suspende la misma. El vehículo se selecciona entre agua, un vehículo no acuoso miscible en agua, como por ejemplo etanol o isopropanol, y un vehículo no acuoso no miscible en agua, como por ejemplo aceite de parafina. Opcionalmente, las composiciones cosméticas pueden contener al menos un ingrediente cosmético adicional, que puede elegirse, por ejemplo, entre el grupo formado por agentes tensioactivos y emulsionantes, compuestos lipídicos y emolientes, factores de consistencia y agentes espesantes, estabilizantes, hidrótrofos, agentes conservantes, esencias, colorantes, compuestos de silicona, grasas, ceras, lecitinas, fosfolípidos, factores de protección solar UV, filmógenos, autobronceadores, o inhibidores de tirosina (agentes de despigmentación), o mezclas de los anteriores.

Así mismo, la combinación de polifenoles de la presente invención puede ser incorporada en productos alimenticios y suplementos dietéticos, por ejemplo en forma de productos nutracéuticos o alimentos funcionales o complementos alimenticios para nutrición deportiva.

La elaboración de este tipo de productos, incorporando la combinación antioxidante de la invención, se realiza mediante procedimientos conocidos por el experto en tecnología alimentaria.

Cualquier tipo de composición alimenticia o suplemento dietético es adecuado para incorporar la combinación de polifenoles objeto de la invención, por ejemplo, infusiones, cafés, bebidas en general tales como zumos u otras bebidas alcohólicas o no alcohólicas, productos de bollería o panadería, mermeladas, barritas energéticas, cereales, harinas, productos lácteos tales como queso, leche, mantequilla, yogures o crema, productos a base de chocolate y dulces como caramelos, gomas de mascar o helados, aceites, margarina, conservas.

Opcionalmente, el producto alimenticio que incorpora la combinación de polifenoles de la invención puede contener adicionalmente otros productos con funcionalidades terapéuticas o dietéticas, preferiblemente, vitaminas, minerales, oligoelementos u otros micronutrientes, u otros extractos vegetales fuente de polifenoles.

Así mismo, el producto alimenticio que contiene la combinación de polifenoles de la invención, puede contener adicionalmente uno o más ingredientes, que se eligen entre los habituales aditivos alimenticios autorizados, bien conocidos por el

experto en la materia, por ejemplo del tipo colorantes, conservantes, condimentos y especias, potenciadores del sabor, espesantes y gelificantes.

La combinación de polifenoles de la invención también puede incorporarse en composiciones veterinarias destinadas a la alimentación animal, en particular a la alimentación de animales domésticos. Dichas combinaciones se pueden incorporar a composiciones de comida para animales domésticos como, por ejemplo, las descritas en las solicitudes de patente EP-A-1514480 y WO-A-2005/110037, mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

10 Usos

Forma parte también de la invención la utilización de la combinación para la preparación de una composición con poder antioxidante.

La composición se selecciona entre el grupo formado por una composición farmacéutica, una composición cosmética, una composición alimenticia, un suplemento dietético, y una composición veterinaria.

También forma parte de la invención la combinación de la invención para uso como antioxidante.

La combinación de polifenoles objeto de la presente invención puede ser utilizada terapéuticamente para prevenir o disminuir la progresión de todos aquellos estados patológicos susceptibles de ser tratados con sustancias antioxidantes y/o captadoras de radicales libres, como por ejemplo, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, enfermedades coronarias, diabetes, Alzheimer, esclerosis múltiple o afecciones dermatológicas tales como psoriasis o la aparición de eczemas, entre otras.

La combinación de la invención es particularmente útil para retardar los síntomas del envejecimiento, por su capacidad de proteger los órganos, tejidos y células frente a los efectos dañinos de la oxidación. También resulta apropiada, por ejemplo, para tratar el envejecimiento prematuro de la piel impidiendo la ruptura de las fibras de colágeno y, en general, de todos los tejidos.

La combinación de la invención también es particularmente adecuada para aquellos sujetos más susceptibles de generar radicales libres de forma incrementada en su organismo, por ejemplo, fumadores, personas especialmente expuestas a condiciones adversas de contaminación ambiental, radiaciones ionizantes, exceso

de exposición solar, personas sujetas a situaciones de estrés, o personas que practican un ejercicio físico intenso.

Los ejemplos que siguen a continuación sirven para ilustrar la invención pero no deben considerarse limitantes de la misma

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una composición antioxidante de resveratrol, quercetina y catequina en relación molar 1:1:2 en base a resveratrol, quercetina y catequina procedentes de extractos vegetales

10

En un recipiente equipado con un mezclador para productos sólidos se pesaron 253,16 g de extracto purificado de raíz de *Polygonum cuspidatum* con un contenido de agua del 8% y un contenido del 98% de resveratrol sobre el extracto seco, equivalente a 1 mol de resveratrol; 386,59 g de extracto purificado de *Sophora japonica* con un contenido de agua del 12,5% y un contenido del 100% de dihidrato de quercetina sobre el extracto seco, equivalente a 1 mol de quercetina; y 701,11 g de extracto purificado de *Vitis vinífera* con un contenido de agua del 8% y un contenido de catequinas del 90% sobre el extracto seco expresado como catequina, incluyendo un 12,5% de catequinas monoméricas, siendo el resto procianidinas diméricas de tipo B y triméricas de tipo C, equivalente a 2 moles de catequina, y se mezcló el conjunto hasta obtener una homogeneización completa.

15

20

Ejemplo 2: Preparación de una composición antioxidante de resveratrol, quercetina y catequina en relación molar 1:1:2 en base a resveratrol y quercetina procedentes de extractos vegetales y catequina (2S,3R)

25

En un recipiente equipado con un mezclador para productos sólidos se pesaron 253,16 g de extracto purificado de raíz de *Polygonum cuspidatum* con un contenido de agua del 8% y un contenido del 98% de resveratrol sobre el extracto seco, equivalente a 1 mol de resveratrol; 386,59 g de extracto purificado de *Sophora japonica* con un contenido de agua del 12,5% y un contenido del 100% de dihidrato de quercetina sobre el extracto seco, equivalente a 1 mol de quercetina; y 580,52 g de catequina (2S,3R) sustancialmente pura (Sigma), equivalente a 2 mo-

30

les de catequina, y se mezcló el conjunto hasta conseguir una homogeneización completa.

Ejemplo 3: Ensayo del poder antioxidante

5

El poder antioxidante de las composiciones de la presente invención se midió por el método TOSC, según se ha descrito anteriormente. Se utilizaron disoluciones de concentración 1 μM de las sustancias o mezclas a ensayar, y agua destilada como control, cuyo valor TOSC es del 0%.

10

Se prepararon las siguientes disoluciones, utilizando agua destilada como disolvente:

15

1) Resveratrol (R): Se pesaron 253,16 mg de extracto purificado de raíz de *Polygonum cuspidatum*, como el empleado en el Ejemplo 1, y se disolvieron en 1 l de agua destilada. Se tomó 1 ml de la disolución resultante y se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 1 l. La concentración de resveratrol era 1 μM .

20

2) Quercetina (Q): Se pesaron 386,57 mg de extracto purificado de *Sophora japonica*, como el empleado en el Ejemplo 1, y se disolvieron en 1 l de agua destilada. Se tomó 1 ml de la disolución resultante y se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 1 l. La concentración de quercetina era 1 μM .

25

3) Catequina (2S,3R) (C): Se pesaron 290,26 mg de catequina (2S,3R) sustancialmente pura (Sigma) y se disolvieron en 1 l de agua destilada. Se tomó 1 ml de la disolución resultante y se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 1 l. La concentración de catequina era 1 μM .

30

4) Catequina (C_{extr}): Se pesaron 350,56 mg de extracto purificado de semilla de uva *Vitis vinifera*, como el empleado en el Ejemplo 1, y se disolvieron en 1 l de agua destilada. Se tomó 1 ml de la disolución resultante y se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 1 l. La concentración de catequina era 1 μM .

5) Resveratrol-quercetina-catequina R+Q+C_{extr} (1:1:2): Se tomaron 0,5 ml de la disolución R, 0,5 ml de la disolución Q y 1 ml de la disolución C_{extr}, y se mezclaron. Esta disolución contenía una concentración 0,25 µM de resveratrol, 0,25 µM de quercetina y 0,5 µM de catequina. La concentración total de polifenoles era 1 µM.

6) Resveratrol-quercetina-catequina R+Q+C_{extr} (1:1:5): Se tomaron 0,5 ml de la disolución R, 0,5 ml de la disolución Q y 2,5 ml de la disolución C_{extr}, y se mezclaron. Esta disolución contenía una concentración 0,143 µM de resveratrol, 0,143 µM de quercetina y 0,714 µM de catequina. La concentración total de polifenoles era 1 µM.

7) Resveratrol-quercetina-catequina (2S,3R) R+Q+C (1:1:2): Se tomaron 0,5 ml de la disolución R, 0,5 ml de la disolución Q y 1 ml de la disolución C, y se mezclaron. Esta disolución contenía una concentración 0,25 µM de resveratrol, 0,25 µM de quercetina y 0,5 µM de catequina. La concentración total de polifenoles era 1 µM.

8) Resveratrol-quercetina-catequina (2S,3R) R+Q+C (1:1:5): Se tomaron 0,5 ml de la disolución R, 0,5 ml de la disolución Q y 2,5 ml de la disolución C, y se mezclaron. Esta disolución contenía una concentración 0,143 µM de resveratrol, 0,143 µM de quercetina y 0,714 µM de catequina. La concentración total de polifenoles era 1 µM.

La formación de etileno durante el ensayo TOSC se monitorizó mediante cromatografía de gases, con un equipo HP 5890-series II, Software HP Chemstation 5890, y se calculó mediante la determinación del área bajo la curva, mediante el programa SRI PeakSimple®. La regresión lineal se calculó usando el programa GraphPad Prism®. La pendiente de la regresión se calculó en el margen lineal de la curva control TOSC frente a la concentración de los activos ensayados.

30

Se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla I.

TABLA I

Muestra	Polifenoles	TOSC experimental (%)	TOSC calculado (%)	Incremento	Potencia
1	R	22,00	-	-	
2	Q	11,00	-	-	
3	C	8,00	-	-	
4	C _{extr}	5,05	-	-	
5	R+Q+C (1:1:2)	64,40	12,25	52,15	x5,3
6	R+Q+C (1:1:5)	61,20	10,43	50,77	x5,9
7	R+Q+C _{extr} (1:1:2)	60,00	10,78	49,23	x5,6
8	R+Q+C _{extr} (1:1:5)	58,00	8,32	49,68	x7,0

5 La columna "TOSC calculado" representa el valor TOSC que corresponde teóricamente a las muestras de las diferentes combinaciones de antioxidantes teniendo en cuenta solamente un efecto aditivo de cada uno de ellos. Así pues, el valor calculado se obtiene multiplicando la concentración de cada uno de los antioxidantes en la muestra por el TOSC experimental de cada uno de los antioxidantes individuales y dividiendo por la concentración del antioxidante en la muestra individual.

Por ejemplo en el caso de la muestra 5:

$$\text{TOSC calculado} = (0,25 \mu\text{M R} \times 22,00/1 \mu\text{M}) + (0,25 \mu\text{M Q} \times 11,00/1 \mu\text{M}) + (0,5 \mu\text{M C} \times 8,00/1 \mu\text{M}) = 12,25 \%$$

15 La columna "Incremento" corresponde a la diferencia entre el valor TOSC calculado y el experimental, y permite cuantificar el efecto sinérgico observado en el poder antioxidante de las combinaciones. Puede observarse que la combinación de resveratrol, quercetina y catequina de la invención, tanto en la relación molar 1:1:2, como en la relación molar 1:1:5, muestra un notable efecto sinérgico. Así mismo,

puede observarse que, aunque el efecto sinérgico con catequina (2S,3R) pura es ligeramente superior al de la catequina procedente de extracto de uva, se aprecia en ambos casos un efecto sinérgico comparable, independiente, pues, de la fuente de catequinas empleada.

- 5 La columna "Potencia" refleja el número de veces que aumenta el poder antioxidante con las combinaciones objeto de la invención en comparación con el poder antioxidante que se obtiene a partir de la adición por separado de los poderes antioxidantes de resveratrol, quercetina y catequina.

10 Ejemplo 4: Preparación de un complemento alimenticio para la prevención del envejecimiento cutáneo

Se prepararon cápsulas de gelatina blanda (8/10 oval) de color rojo con el siguiente relleno por cápsula:

15

Componente	Cantidad (mg)
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> del Ejemplo 1	33,53
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	52,18
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	94,65
Acetato de D,L- α -tocoferol	10,00
Aceite de borraja (> 20% ácido γ -linoleico)	150,00
Grasa de soja hidrogenada	10,00
Cera de abejas	5,00

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es 1:1:2,04.

5 Ejemplo 5: Preparación de un complemento alimenticio para la mejora de la prevención de la degeneración macular asociada a la edad

Se prepararon cápsulas de gelatina blanda (14/16 oblongo) de color negro con el siguiente relleno por cápsula:

Componente	Cantidad (mg)
Extracto de <i>Vitis vinifera</i> (8% de agua y 20% de trans-resveratrol sobre el residuo seco)	168,48
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	52,18
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	94,65
Luteína 20% en peso	25,00
Extracto seco de arándano azul (>25% en peso de antocianidinas)	325,00
Aceite de pescado (50% en peso de ácido docosahexanoico)	325,00
Grasa de soja hidrogenada	20,00
Cera de abejas	10,00

10

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es de 1:0,97:1,98.

Ejemplo 6: Preparación de un complemento alimenticio para reparación de las arrugas de expresión

Se prepararon sobres con el siguiente relleno por sobre:

5

Componente	Cantidad
Colágeno bovino hidrolizado	50,00 g
Maltodextrina	80,00 mg
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> (8% de agua y 50% de trans-resveratrol sobre el residuo seco)	67,06 mg
Extracto de <i>Allium cepa</i> (40% de quercetina)	102,00 mg
Extracto de té verde (60% de catequinas expresado como catequina)	130,62 mg
Extracto de semilla de granada (40% de ácido elágico)	87,08 mg
Aroma de frutos rojos	400,00 mg
Colorante rojo remolacha	150,00 mg
Sucralosa	15,00 mg
Ácido cítrico	200,00 mg
Hialuronato sódico	10,00 mg

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es 1:1:2.

Ejemplo 7: Preparación de un alimento funcional a base de café para la prevención de la enfermedad cardiovascular

Se prepararon sobres monodosis con el siguiente relleno por sobre:

5

Componente	Cantidad
Café descafeinado	30,00 g
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> del Ejemplo 1	37,61 mg
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	58,62 mg
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	261,16 mg
Aroma de moka	50,00 mg
Ácido cítrico	100,00 mg

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es
10 1:1:5.

Ejemplo 8: Preparación de un complemento alimenticio a base de sustancias naturales como antioxidante en nutrición deportiva

15 Se prepararon cápsulas blandas de gelatina blanda (20 oblongo) de color morado con el siguiente relleno por cápsula:

Componente	Cantidad (mg)
Coenzima Q10	100,00
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> del Ejemplo 1	37,61
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	58,62
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	261,16
RRR-alfa-tocoferol (67%)	15,00
Vitamina C	60,00
Beta-caroteno dunaliella (95% retinol)	30,00
Aceite de germen de trigo	500,00
Grasa de soja hidrogenada	20,00
Cera de abejas	10,00

5 La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es 1:1:5.

Ejemplo 9: Preparación de un suplemento alimenticio para la mejora del aspecto de la piel y brillo del pelaje en mascotas (mamíferos)

10 Se prepararon cápsulas de gelatina blanda (18/20 oblongo) de color rojo con el siguiente relleno por cápsula:

Componente	Cantidad (mg)
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> del Ejemplo 1	50,13
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	78,15
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	353,61
Aceite de oliva (30% ácido oleico)	400,00
Aceite de borraja (> 20% ácido γ -linoleico)	150,00
Grasa de soja hidrogenada	20,00
Cera de abejas	10,00

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es 1:1:5,09.

5

Ejemplo 10: Preparación de un suplemento alimenticio para la mejora de la fertilidad de sementales (mamíferos)

10 Se prepararon cápsulas de gelatina blanda (22 oblongo) de color rojo con el siguiente relleno por cápsula:

Componente	Cantidad (mg)
L-carnitina tartrato	350,00
Extracto purificado de raíz de <i>Polygonum cuspidatum</i> del Ejemplo 1	18,80
Extracto purificado de <i>Sophora japonica</i> del Ejemplo 1	29,28
Extracto purificado de semilla de uva del Ejemplo 1	131,11
Aceite de pescado (35% de ácido eicosapentaenóico y 25% de ácido docosahexaenoico)	550,00
Grasa de soja hidrogenada	20,00
Cera de abejas	10,00

La relación molar resveratrol:quercetina:catequina en este preparado es
5 1:1:5.

REIVINDICACIONES

- 1.- Combinación sinérgica de polifenoles que comprende resveratrol, quercetina y catequina, caracterizada porque la relación molar entre resveratrol, quercetina y catequina es 0,9-1,1:0,9-1,1:1,8-2,2 ó 0,9-1,1:0,9-1,1:4,5-5,5, con la condición de que la combinación de polifenoles que consiste en trans-resveratrol, catequina, epicatequina, quercetina y rutina en una proporción molar 1:1:1:1:1, en donde cada uno de los polifenoles tienen una pureza cromatográfica igual o superior al 90% se excluye expresamente.
- 2.- Combinación según la reivindicación 1, caracterizada porque la relación molar es 1:1:2 ó 1:1:5.
- 3.- Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque la relación molar es 1:1:2.
- 4.- Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque la relación molar es 1:1:5.
- 5.- Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el resveratrol es trans-resveratrol.
- 6.- Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el resveratrol es de origen natural.
- 7.- Combinación según la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de resveratrol es un extracto vegetal.
- 8.- Combinación según la reivindicación 7, caracterizada porque el extracto vegetal es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*.
- 9.- Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la quercetina es de origen natural.

10.- Combinación según la reivindicación 9, caracterizada porque la fuente de quercetina es un extracto vegetal.

5 11.- Combinación según la reivindicación 10, caracterizada porque el extracto vegetal es un extracto de *Sophora japonica*.

12.- Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque la fuente de catequina es un extracto vegetal.

10 13.- Combinación según la reivindicación 12, caracterizada porque el extracto vegetal es un extracto de *Vitis vinífera*.

15 14.- Combinación según la reivindicación 1, caracterizada porque la relación molar resveratrol:quercetina:catequina es 0,9-1,1:0,9-1,1:1,8-2,2, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*.

20 15.- Combinación según la reivindicación 1, caracterizada porque la relación molar resveratrol:quercetina:catequina es 0,9-1,1:0,9-1,1:4,5-5,5, la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica*, y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinífera*.

25 16.- Composición que comprende la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo aceptable.

30 17.- Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es farmacéutica y el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

18.- Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es cosmética y el vehículo es cosméticamente aceptable.

19.- Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es un suplemento dietético y el vehículo es dietéticamente aceptable.

5 20.- Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es alimentaria y el vehículo es alimentariamente aceptable.

21.- Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es veterinaria y el vehículo es veterinariamente aceptable.

10 22.- Utilización de la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la preparación de una composición con poder antioxidante.

23.- Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso como antioxidante.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130710

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2274842 T3 (COGNIS IP MANAGEMENT GmbH) 01.06.2007, página 2, línea 60-página 3, línea 5; página 14, Tabla 1; reivindicaciones 1-4	1 - 4
X Y	ES 2217966 A1 (JORDA QUILES, L.) 01.11.2004, página 3, líneas 11-40; página 4, líneas 25-33, 39-40; página 4, línea 63-página 5, línea 56; reivindicaciones 5, 6	1 - 4 6, 7, 9 - 11, 16 - 23
Y	WO 02081651 A2 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 17.10.2002, páginas 3, 4, 10; página 12, líneas 26-34; página 13; reivindicaciones 1-11	1 - 5, 19 - 23
Y	US 2010247670 A1 (SHOUTOV, D.) 30.09.2010, página 1, [0010]; página 2, [0016]-[0019]; página 4, [0029]; reivindicaciones 1-7	1 - 4, 16 - 18
Y	US 2008254135 A1 (HEUER, M. et al.) 16.10.2008, página 2, [0011]-[0014], [0017], [0018], [0020]; página 3, [0023]-[0027]; reivindicaciones 1, 2, 8	5 - 8, 12 - 15
Y	US 2008199546 A1 (KREMPIN, D. W. et al.) 21.08.2008, página 3, [0029], [0032], [0033]; página 4, [0042], [0044]; página 5, [0058]; página 8, [0085]; página 13, Tabla 5	8 - 15
A	WO 2010135589 A2 (SAKURA PROPERTIES, LLC) 25.11.2010, página 1; página 2, línea 12-17; reivindicaciones 1-5	1 - 8, 12, 13, 19-23
A	SCHLACHTERMAN, A. et al. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model ¹ . Translational Oncology, 2008. Vol. 1, nº 1, páginas 19-27. ISSN 1944 7124 Doi: 10.1593/tloO.07100	1 - 5, 12, 13, 16, 17, 22, 23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.11.2012

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/05 (2006.01)
A61K31/352 (2006.01)
A61K31/353 (2006.01)
A61K31/70 (2006.01)
A61K36/48 (2006.01)
A61K36/87 (2006.01)
A61K8/97 (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)
A61P39/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23L, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1 - 23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto una combinación sinérgica de polifenoles que comprende resveratrol, quercetina y catequina en la relación 0,9-1:0,9-1:1,8-2 ó 0,9-1:0,9-1:4,5-5,5, con exclusión de la combinación trans-resveratrol, catequina, epicatequina, quercetina y rutina en proporción molar 1:1:1:1:1, en donde cada uno de los polifenoles tienen una pureza cromatográfica igual o superior al 90% se excluye expresamente (reivindicación 1).

La combinación es tal que la relación molar es 1:1:2 ó 1:1:5 (reivs. 2-4).

El resveratrol es trans-resveratrol (reiv. 5), de origen natural (reiv. 6), siendo la fuente un extracto vegetal (reiv. 7) como el extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum* (reiv. 8).

La quercetina es de origen natural (reiv. 9), siendo la fuente un extracto vegetal (reiv. 10) como el extracto de *Sophora japonica* (reiv. 11).

La fuente de catequina es un extracto vegetal (reiv. 12), de *Vitis vinifera* (reiv. 13).

La combinación caracterizada porque la relación molar resveratrol: quercetina: catequina es 0,9-1:0,9-1:1,8-2, en donde la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica* y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinifera* (reiv. 14).

La combinación caracterizada porque la relación molar resveratrol: quercetina: catequina es 0,9-1:0,9-1:4,5-5,5, en donde la fuente de resveratrol es un extracto de raíz de *Polygonum cuspidatum*, la fuente de quercetina es un extracto de *Sophora japonica* y la fuente de catequina es un extracto de *Vitis vinifera* (reiv. 15).

También es objeto de protección la utilización de la combinación reivindicada para la preparación de una composición con poder antioxidante (reiv. 22) y la combinación reivindicada para uso como antioxidante (reiv. 23).

Además, se protege la composición que comprende la combinación reivindicada y un vehículo aceptable, farmacéutica y cosméticamente (reivs. 16-18) o la composición es un suplemento alimenticio o es alimentaria y el vehículo es dietéticamente aceptable (reivs. 19 y 20) o la composición es veterinaria y el vehículo es veterinariamente aceptable (reiv. 21).

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2274842 T3 (COGNIS IP MANAGEMENT GMBH)	01.06.2007
D02	ES 2217966 A1 (JORDA QUILES, L.)	01.11.2004
D03	WO 02081651 A2 (UAB RESEARCH FOUNDATION)	17.10.2002
D04	US 2010247670 A1 (SHOUTOV, D.)	30.09.2010
D05	US 2008254135 A1 (HEUER, M. et al.)	16.10.2008
D06	2008199546 A1 (KREMPIN, D. W. et al.)	21.08.2008
D07	WO 2010135589 A2 (SAKURA PROPERTIES, LLC)	25.11.2010
D08	SCHLACHTERMAN, A. et al. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model ¹ . Translational Oncology, 2008. Vol. 1, nº 1, páginas 19-27.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Los documentos citados **D01** a **D04** se refieren a productos, mezclas o composiciones que comprenden resveratrol, quercetina y catequinas, si bien, no divulgan la relación molar de estos tres componentes tal como lo hace la solicitud en estudio. El resto de los documentos citados no divulgan combinaciones o mezclas de los tres componentes a la vez, por lo que la combinación sinérgica de polifenoles que comprende resveratrol, quercetina y catequina con la relación molar 0,9-1:0,9-1:1,8-2 ó 0,9-1:0,9-1: 4,5-5,5 se considera que no está anticipada por los documentos citados.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D08, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 23** son nuevas de acuerdo con el Artículo 6 LP11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de obtener una combinación de polifenoles que comprende resveratrol, quercetina y catequina en la relación 0,9-1:0,9-1:1,8-2 ó 0,9-1:0,9-1: 4,5-5,5, resulta obvia para el experto en la técnica a la vista de los documentos **D01** a **D06**, siendo los más relevantes el **D01** y el **D02**. En efecto:

- **D01** divulga mezclas de principios activos como catequinas, quercetina y resveratrol que muestran una acción antioxidante sinérgica (página 2, línea 60-página 3, línea 5), en intervalos de cantidades (página 14, Tabla1; reivindicaciones 1-4) que para un experto en la técnica resulta obvio que afectan a las relaciones molares reivindicadas, por lo que combinación sinérgica de los tres componentes comprendidos en las reivindicaciones 1-4 carece de actividad inventiva.

- **D02** se refiere a productos alimenticios que comprenden un extracto de hollejo, semillas y raspas de uva y divulga componentes que comprenden catequina (0,10 a 2% en peso), quercetina y resveratrol en la cantidad de 0,01-1,00 en peso (página 3, líneas 11-40; reivindicaciones 5, 6). Para el experto en la técnica, la utilización de resveratrol de origen natural sería el trans-resveratrol. Además, los intervalos propuestos distintas relaciones molares como las reivindicadas, afectando a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-5.

Pero, además, en el documento se divulga que vehículos farmacéuticos o cosméticos se incorporan a los componentes y dependiendo del vehículo, la composición puede ser dietética, farmacéutica o cosmética (página 4, líneas 25-33, 39-40), destinada para uso humano o animal (página 4, línea 63-página 5, línea 56) por lo que afecta también a la actividad inventiva de las reivindicaciones 6, 7, 9-11,16-23.

- **D03** se refiere a polifenoles que protegen de enfermedades coronarias y vasculares y que se encuentran en el vino como la quercetina, el resveratrol, la catequina (páginas 3, 4, 10) en cantidades que están en los intervalos reivindicados (página 12, líneas 26-34; página 13; reivindicaciones 1-4) para ser administrados con vehículos farmacéutico o dietético (reivindicaciones 5-11) por lo que afecta a las reivindicaciones 1-5, 19-23.

- **D04** divulga un producto natural basado en semillas y piel de uvas como fuente de antioxidantes CQR (catequinas, quercetina, resveratrol) (página 1, [0010]; página 2, [0016]-[0019]; página 4, [0029]; reivindicaciones 1-7), afectando a las reivindicaciones 1-4, 16-18.

- **D05** divulga composiciones dietéticas para aumentar la toma de antioxidantes y polifenoles que actúan sinérgicamente por humanos y mamíferos, en cantidades terapéuticamente efectivas que comprenden de resveratrol (página 2, [0011]-[0014], [0017]) siendo la fuente más abundante las raíces de *Polygonum cuspidatum* (página 2, [0018]-[0020]). Por otra parte, las protocianidinas como las catequinas se incorporan de la uva (*Vitis vinifera*), de modo que la invención divulga resveratrol procedente de *Polygonum* y catequinas de *Vitis* (página 3, [0023]-[0027]; reivindicaciones 1, 2, 8), afectando a las reivindicaciones 5-8, 12-15.

- **D06** se refiere a suplementos dietéticos que comprenden quercetina (página 3, [0029], [0032], [0033]) y extracto de plantas como la *Sophora japonica*, en concreto divulga que la quercetina se puede extraer de *Sophora japonica* (página 4, [0042], [0044]), además de extractos de semillas de uvas (*Vitis vinifera*) por sus proantocianidinas, como catequinas (página 5, [0058]; página 8, [0085]; página 13, Tabla 5), afectando junto a la actividad inventiva de las reivindicaciones 8-15.

Por otra parte, en **D07** se divulga el resveratrol con quercetina o con catequina (página 1; página 2, línea 12-17; reivindicaciones 1-5) y en **D08** la combinación de tratamiento resveratrol, quercetina y catequina reduce el crecimiento de cáncer de mama en ratones, reforzando estos documentos la falta de actividad inventivas de las reivindicaciones.

En efecto, teniendo en cuenta que en el estado de la técnica está ampliamente divulgado la combinación de estos tres componentes resveratrol, quercetina y catequinas por su acción sinérgica (**D01- D04, D08**) en intervalos de cantidades que comprenden distintas relaciones molares, proveniente el resveratrol natural (que es trans-resveratrol), de *Polygonum* (**D05**), la quercetina de *Sophora* (**D06**) en ambos casos combinados con catequinas de *Vitis* para incorporarse con vehículos en composiciones dietéticas, farmacéuticas o cosméticas, para el experto en la técnica, resultaría evidente esta combinación de polifenoles con distinta pureza cromatográfica para uso farmacéutico, cosmético o dietético.

En cuanto, a las relaciones molares puesto que en el estado de la técnica ya está divulgada la mayor presencia de catequina, frente a quercetina y resveratrol (**D01, D02**), resultaría obvio para un experto variar cantidades y llegar a las relaciones reivindicadas. El solicitante debe tener en cuenta, que no explica porque son objeto de protección estas dos relaciones 1:1:2 y 1:1:5 y no la 1:1:3 o la 1:1:4. Si funcionan las extremas por qué razón no van a funcionar las intermedias.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D06, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 23** carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP11/86.