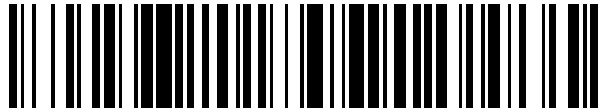


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 831**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/82** (2006.01)  
**A61K 31/353** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A23L 1/308** (2006.01)  
**A23L 1/307** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2009 E 09800146 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2318026**

54 Título: **Composición para controlar el incremento de la glucemia**

30 Prioridad:

**23.07.2008 US 83135 P**  
**20.04.2009 KR 20090034119**

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

**06.07.2015**

73 Titular/es:

**NUC ELECTRONICS CO., LTD. (100.0%)**  
**679, Chimsan 3-dong, Buk-gu**  
**Daegu 702-858, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, DAE-KYU y**  
**LEE, JINHO**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 539 831 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición para controlar el incremento de la glucemia.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 5 1. Campo de la invención:

La presente invención se refiere a composiciones relacionadas con catequinas para rebajar la elevación de la glucemia postprandial. La presente invención también se refiere a alimentos funcionales para el control de la glucemia que contienen extractos de té verde (GTE) con galocatequinas (GC) y macromoléculas que impiden la absorción intestinal de GC. Un propósito de esta invención es tomar composiciones que rebajan la glucemia después de una comida sin efectos secundarios algunos inhibiendo la absorción intestinal de glucosa así como la absorción de lípidos usando un mecanismo diferente de los agentes hipoglucémicos disponibles.

## 2. Antecedentes generales y estado de la técnica:

La diabetes de tipo 2 se caracteriza por dos características principales: resistencia a insulina periférica y disfunción de células beta. Factores tanto hereditarios como ambientales, tales como obesidad e hiperglucemia prolongada, pueden desencadenar o exagerar la diabetes de tipo 2 humana. La hiperglucemia causa tanto daños a las células beta como resistencia a insulina periférica mediante múltiples mecanismos, denominados colectivamente como glucotoxicidad (Borona, 2008). En diabetes MODY-2, los defectos funcionales en los genes de glucoquinasa limitan la captación de glucosa hepática, provocando la prolongación de la hiperglucemia postprandial (Jiang et al, 2008), y eventualmente dan como resultado sobrecarga de células beta. Por lo tanto, los esfuerzos para minimizar la hiperglucemia postprandial, así como el control de la glucemia en ayunas, son de importancia para la prevención y el tratamiento de diabetes de tipo 2. Aunque a día de hoy están disponibles inhibidores de amilasa o inhibidores de glucosidasa para reducir la hiperglucemia postprandial, el uso puede inducir algunos efectos secundarios gastrointestinales, dado que bloquean la conversión en monosacárido. Las hojas de té verde (*Camellia sinensis*) contienen polifenoles, en los que la familia de las catequinas es el polifenol más mayoritario. Las catequinas extraídas con agua de las hojas de té verde contienen galocatequinas (GC), que principalmente incluyen galato, galato de epicatequina (ECG) y galato de epigalocatequina (EGCG). Con respecto a la diabetes de tipo 2, los efectos de los extractos de té verde (GTE) o EGCG en estudios *in vitro* e *in vivo* se investigaron exhaustivamente. Sin embargo, el debate sobre si GTE o EGCG son realmente aplicables para la prevención o el tratamiento de obesidad y diabetes de tipo 2 humanas no se ha planteado (Anderson & Polansky, 2002; Fukino et al, 2005; Naftalin et al, 2003). Recientemente, se mostró que el consumo diario de té verde por seres humanos diabéticos durante un periodo de varios meses era ineficaz para aliviar los niveles de glucemia, los niveles de HbA1C, la resistencia a insulina y marcadores de inflamación (Fukino et al, 2005). Curiosamente, se ha demostrado que los GTE aplicados por vía oral pueden inhibir la absorción de glucosa (Johnston et al, 2005; Kobayashi et al, 2000; Zhu et al, 2001) y colesterol (Raederstorff et al, 2003) desde el tubo digestivo. Se cree que éste es uno de los mecanismos subyacentes mediante los que los GTE influyen en la diabetes de tipo 2 y la obesidad. Las galocatequinas (GC), incluyendo ECG y epicatequina-3-galato (ECG), parecen ser responsables de los efectos inhibidores, principalmente a través de la inhibición de cotransportadores de Na-glucosa (SGLT1) en los epitelios intestinales (Kobayashi et al, 2000) y la formación de micelas mixtas en la luz intestinal (Raederstorff et al, 2003). La cantidad de GC que es necesario ingerir para ejercer el efecto luminal parece ser tolerable en seres humanos (Kobayashi et al, 2000; Van Amelsvoort et al, 2001), probablemente debido a la menor biodisponibilidad oral de estas moléculas. No obstante, cierta proporción de las catequinas ingeridas es absorbida de forma inevitable en la sangre y actúa en otras zonas dentro del cuerpo. Por lo tanto, los efectos de los GTE ingeridos por vía oral sobre el metabolismo de glucosa y de lípidos son la combinación de los efectos en el tubo digestivo y en la circulación. Algunos informes demostraron que la aplicación oral de GTE en ratas (Sabu et al, 2002) y seres humanos (Tsuneki et al, 2004) reducía los niveles de glucemia durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Sin embargo, estos resultados podrían atribuirse al efecto luminal de GC (Naftalin et al, 2003) debido a que la glucosa elevada se aplicó inmediatamente después de la ingestión de catequina. Además, dado que las ratas presentan muy baja biodisponibilidad oral de GTE, durante el experimento, es más difícil detectar el efecto de GTE después de que los GTE son absorbidos en la circulación. Esto motivó a los inventores a evaluar los efectos de GTE y EGCG en la circulación así como en el tubo digestivo.

El inventor descubrió que GC en la circulación incrementaba los niveles de glucemia y, por lo tanto, inducía hipersecreción de insulina. Por lo tanto, una aplicación combinada de GTE con un inhibidor de absorción de GTE intestinal podría obtener eficazmente el efecto positivo de GTE en la luz intestinal para rebajar la elevación de la glucemia postprandial.

## 55 RESUMEN DE LA INVENCION

La hiperglucemia postprandial prolongada es un factor perjudicial para la diabetes de tipo 2 y la obesidad. El beneficio del consumo de extracto de té verde (GTE) aún está por confirmar. Los inventores describen los efectos de

catequinas de té verde circulantes sobre los niveles de glucemia e insulina. La carga de glucosa oral 1 h después de la ingestión de GTE en seres humanos causaba niveles de glucemia e insulina más elevados que en sujetos de control. Se requerían galocatequinas para estos efectos, aunque se ha sabido que, dentro de la luz intestinal, éstas reducen la absorción de glucosa y colesterol. El tratamiento con epigalocatequina-3-galato obstaculizaba la captación de 2-desoxiglucosa en líneas celulares de hígado, grasa, células beta pancreáticas, y de músculo esquelético. La intolerancia a la glucosa mejoró mediante GTE deficiente en galocatequina o GTE mezclado con polietilenglicol, que se usó como inhibidor de la absorción intestinal de galocatequinas. Estos descubrimientos sugieren que la galocatequina cuando está en circulación eleva el nivel de glucemia bloqueando la captación de glucosa normal en los tejidos, dando como resultado hiperinsulinemia secundaria, mientras que reduce la entrada de glucosa en la circulación cuando están dentro de la luz intestinal. Estos descubrimientos fomentan el desarrollo de derivados no absorbibles de galocatequinas para el tratamiento preventivo de diabetes de tipo 2 y obesidad, lo que induciría específicamente solamente un efecto luminal positivo.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición para el control de la glucemia que contiene extractos de té verde (GTE) con galocatequinas (GC) y una macromolécula para prevenir la absorción intestinal de GC. El componente de GC puede comprender al menos uno de EGCG o ECG. La macromolécula es polietilenglicol (PEG). La macromolécula puede tener un peso molecular de 1.000-2.000.000 dalton.

En otro aspecto, la invención se refiere a un alimento funcional que incluye la composición descrita anteriormente. El alimento puede ser, sin limitación, bebida, comprimido o polvo.

En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye una cantidad que controla la glucemia de la composición descrita anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable de la misma. La GC puede incluir EGCG o ECG o ambos. La macromolécula puede ser PEG. La macromolécula puede tener un peso molecular preferible de 1.000-50.000 dalton.

Estos y otros objetos de la invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de la invención, los dibujos mencionados adjuntos a ella y las reivindicaciones adjuntas en el presente documento.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación en el presente documento, y los dibujos adjuntos que se proporcionan a modo de ilustración solamente, y, por lo tanto, no son limitantes de la presente invención, y en los que;

Las figuras 1A-1D muestran efectos ambivalentes de GTE sobre la tolerancia a la glucosa. Cambios de los niveles de glucemia (A) e insulina plasmática (B) durante OGTT en seres humanos, que se realizó inmediatamente después de la ingestión de GTE. El GTE ingerido contenía ~500 mg de EGCG.  $n = 6$  para cada grupo. Cambios de los niveles de glucemia (C) e insulina plasmática (D) durante OGTT en seres humanos, que se realizó 1 h después de la ingestión de GTE. El GTE ingerido contenía ~250 mg de EGCG.  $n = 5$  para cada grupo. Los individuos se mantuvieron en ayunas durante una noche antes de los experimentos. Sujetos de control ingirieron una cantidad equivalente de agua. Prueba de la  $t$  de Student para datos no emparejados bilateral. \*  $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$  en comparación con el valor de control en el mismo punto temporal.

Las figuras 2A-2B muestran efectos de GC circulante sobre la tolerancia a la glucosa. (A) Cambios de los niveles de glucemia durante IPGTT en rata, que se realizó 30 minutos después de cada inyección de catequina. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 12 h y a continuación se les inyectó por vía intravenosa PBS en solitario, o PBS que contenía EC en DMSO, ECG, EGC o EGCG (cada uno a 10 mg/kg). El área bajo la curva (AUC) se representó en (B) como el porcentaje del valor de control sin catequina alguna. ANOVA con corrección de Bonferroni. \*  $P < 0,05$  y \*\*  $P < 0,01$  en comparación con el valor de control (B) o el del mismo punto temporal (A),  $n = 5-7$  para cada grupo.

Las figuras 3A-3D muestran reducciones mediadas por EGCG de la captación de glucosa. Se añadió 2-desoxi- $^3\text{H}$  glucosa después una incubación de 20 minutos con las concentraciones indicadas de EGCG con o sin insulina 100 nM en los medios que contenían mioblastos L6 diferenciados (A), hepatocitos HepG2 (B), adipocitos 3T3-L1 diferenciados (C) y células beta INS-1 (D). Los datos se muestran como el porcentaje de cada valor de control en ausencia o presencia de insulina. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , en comparación con el control correspondiente sin insulina, y #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , en comparación con cada control con insulina, usando ANOVA con corrección de Bonferroni.  $n = 3$  para cada grupo.

Las figuras 4A-4D muestran datos representativos que muestran que ni la fosforilación de PKB basal ni la estimulada con insulina es alterada por el pretratamiento con EGCG en mioblastos L6 diferenciados (A), hepatocitos HepG2 (B), adipocitos 3T3-L1 diferenciados (C) y células beta INS-1 (D).

Las figuras 5A-5D muestran el efecto del EGCG circulante sobre los niveles de glucemia y la resistencia a insulina. Se realizó una inyección de EGCG (10 mg/kg, i.v.) en ratas mantenidas en ayunas durante 4 h (A y C) y ratones Kir6.2 k/o (B y D). Los animales de control recibieron PBS en solitario. Se observó un incremento significativo del nivel de glucemia 30 minutos después de la inyección de EGCG. A continuación se inyectó insulina (1 UI/kg, i.p.) en

el momento indicado por las flechas. El cambio porcentual en los niveles de glucemia se mostró en C y D; los valores de los dos grupos obtenidos inmediatamente antes de la inyección de insulina se normalizaron a 100. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , en comparación con el valor de control en el mismo punto temporal usando la prueba de la t de Student para datos no emparejados bilateral. ##  $P < 0,01$  se refiere a la comparación entre inmediatamente antes y 30 minutos después de la inyección de EGCG, con la prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral. n = 5 para cada grupo.

Las figuras 6A-6D muestran que GTE deficiente en GC disminuye los efectos de GTE natural en la circulación y el tubo digestivo. (A) En ratas en ayunas durante 4 h, se inyectó por vía intravenosa PBS como control, GTE natural (100 mg/kg) o GTE deficiente en GC (100 mg/kg) 30 minutos antes de la inyección de insulina (1 UI/kg, i.p.). (B) Los valores de los tres grupos obtenidos inmediatamente antes de la inyección de insulina se normalizaron a 100. #  $P < 0,05$  se refiere a la comparación entre inmediatamente antes y 30 minutos después de la inyección de EGCG, con la prueba de la t de Student para datos emparejados bilateral. n = 5 para cada grupo. (C) Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 12 h, y a continuación se les inyectó por vía intravenosa PBS en solitario, o PBS que contenía GTE natural o GTE deficiente en GC 30 minutos antes de la carga de glucosa elevada intraperitoneal. n = 5 por grupo. (D) Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 12 h, y a continuación ingirieron por vía oral agua destilada en solitario, o agua destilada que contenía GTE natural (900 mg/kg), GTE deficiente en GC (900 mg/kg) o EGCG (90 mg/kg) inmediatamente antes de la carga de glucosa elevada oral. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , en comparación con el valor de control en el mismo punto temporal, usando ANOVA con corrección de Bonferroni. n = 6 por grupo.

Las figuras 7A-7D muestran que la ingestión de PEG con GTE bloquea el efecto circulante de GTE. (A) Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 12 h, y a continuación ingirieron por vía oral agua destilada en solitario (control), o agua destilada que contenía PEG, GTE natural (900 mg/kg), o GTE más PEG inmediatamente antes de la carga de glucosa elevada oral. n = 4 para cada grupo. (B) Voluntarios humanos se mantuvieron en ayunas durante una noche antes de los experimentos. A la mañana siguiente, ingirieron agua en solitario, o agua que contenía GTE con 125 mg o 500 mg de EGCG, o PEG más GTE con 500 mg de EGCG. La carga de glucosa oral se consiguió poco después de la ingestión. n = 8-10 para cada grupo. (C y D) En voluntarios humanos en ayunas durante una noche, la carga de glucosa oral se consiguió 1 h después de la ingestión de agua que contenía GTE con 500 mg de EGCG, o el GTE más PEG. Sujetos de control ingirieron una cantidad equivalente de agua. n = 5-6 para cada grupo. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$  en comparación con el valor de control en el mismo punto temporal, usando ANOVA con corrección de Bonferroni.

La figura 8 muestra una ilustración que muestra los efectos ambivalentes de GC en el intestino y en la circulación. Las líneas de puntos representan el movimiento de las moléculas; la flecha con línea continua representa la facilitación mediante insulina; las líneas de bloqueo continuas representan la inhibición por GC.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En la presente solicitud, “un” y “uno” se usan para referirse tanto a un único como a una pluralidad de objetos.

Tal como se usa en el presente documento, “vehículos” incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que está siendo expuesto a él, a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa tamponada en pH. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen sin limitación tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>®</sup>, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS<sup>®</sup>.

Tal como se usa en el presente documento, “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos o bioquímicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse una o más veces. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar o retardar la evolución de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, “mamífero” para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, y demás. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento “vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos de recubrimiento, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes como sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención viene dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de mezclar dicho material activo para el tratamiento de una enfermedad en sujetos vivos que tienen una enfermedad en la que la salud corporal está alterada.

El principal ingrediente activo se mezcla para administración cómoda y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de dosificación unitaria. Una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, contiene el compuesto activo principal en cantidades que varían de 0,5 µg a aproximadamente 2000 mg. Expresado en proporciones, el compuesto activo está generalmente presente en de aproximadamente 0,5 µg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan mediante referencia a la dosis habitual y la vía de administración de dichos ingredientes.

Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" es un mamífero, más preferentemente un ser humano.

El método para fabricar las composiciones con efecto rebajante de la glucemia con respecto a esta invención contiene la etapa de extraer GC, que posee al menos uno de EGCG o ECG, a partir de té verde; la etapa de mezclar la solución o polvo de extracto que contiene GC con un poliglicol (PG), que es polietilenglicol (PEG).

Las composiciones anteriores también pueden fabricarse mezclando PG con GC que está concentrado y disponible en el mercado. Las composiciones anteriores contienen GC a concentraciones entre 10-2000 mg y PG (0,01-50 g/g de GC). El peso molecular del anterior PG es 100-2.000.000 dalton, más apropiadamente 500-100.000 dalton, de la forma más apropiada, de 1.000 a 80.000, 1.000-50.000 dalton, o de 1.000 a 8.000 dalton, dado que es mejor para ingerirla sin incomodidad y controlar la glucemia.

El método para fabricar el GC anterior incluye

1. etapa para filtrar la solución de extracto obtenida mediante extracción en agua hirviendo de hojas secas;
2. etapa para obtener polvo liofilizando la solución de extracto anterior; y
3. etapa para purificación de GC o su fracción mediante cromatografía en columna, después de disolver el polvo con agua destilada.

Para describir los detalles de las etapas anteriores, en la etapa 1, se añadieron hojas de té verde a agua caliente (80-95°C, 10-50 veces del peso de hojas), se agitaron suavemente durante 5 minutos-1 hora para extracción y se filtraron. En la etapa 2, el polvo que contenía polifenoles de té verde se obtuvo liofilizando la solución de extracto anterior. En la etapa 3, para purificar y obtener productos químicos de polifenol en el polvo, se realizó cromatografía en columna. Esta invención empleaba cromatografía en columna de gel de poliestireno de alta porosidad (tamaño de partícula, 75-150 µm, Diaion HP-20, Mitsubishi Kagaku Co., Japón; Columna, 25 φ x 1.000 mm). En este momento, el disolvente de extracción era 100 ml de metanol:H<sub>2</sub>O (1:5), y el extracto se extrajo una vez más con 100 ml de metanol:H<sub>2</sub>O (2:5). El caudal era de 5 ml/minuto.

Cuando se analizaron los componentes de compuestos polifenólicos de té verde obtenidos mediante el método anterior, se recogieron galocatequina y epigalocatequina en la fracción 1. En la fracción 2, se detectaron catequina, epicatequina, galato de galocatequina y EGCG. En la fracción 3, se recogió ECG.

De acuerdo con esta invención, la GC contenida en las composiciones fabricadas inhibe la actividad del SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio) en la luz intestinal y, por lo tanto, suprime la absorción intestinal de glucosa. Esto tenía menos efectos secundarios que el fármaco hipoglucémico disponible actualmente para inhibir la actividad amilasa. Además, la absorción intestinal de la propia GC, que incrementa la glucemia en la circulación, puede suprimirse mediante poliglicol coadministrado (PG). Por lo tanto, esta invención, reduciendo los niveles de glucemia postprandial, puede ofrecer prevención de la diabetes de individuos normales, la inhibición de la evolución de la diabetes de individuos predispuestos a diabetes, y el alivio de complicaciones diabéticas de pacientes diabéticos.

Las composiciones que contienen GC de esta invención se aplican por vía oral con tipos disponibles en el mercado. También pueden aplicarse antes o durante una comida, pero preferentemente para ser aplicadas justo antes de una comida.

Dado que las composiciones que contienen GC de esta invención son materiales bioactivos naturales extraídos de té verde natural y no absorbidos en la circulación, cuando se aplican por vía oral en animales y seres humanos, estos son seguros sin efectos secundarios y toxicidad aguda. Por lo tanto, esta invención ofrece alimentos o

alimentos saludables y funcionales, que contienen GC y PG, para controlar glucemia postprandial.

De acuerdo con esta invención, en el caso de fabricación como un agente farmacéutico, GC y PG pueden mezclarse y formarse con material disponible en el mercado y farmacéuticamente para preparar comprimidos, cápsulas rígidas o blandas, comprimidos masticables, polvo, líquido o inmersión con el fin de ingestión oral.

5 En la formación de comprimidos, cápsulas rígidas o blandas, comprimidos masticables, polvo, líquido o inmersión como un material aplicable por vía oral usando las composiciones, éste puede contener goma arábiga, almidón de maíz, material aglutinante como celulosa o gelatina de grano fino, un vehículo como fosfato cálcico o lactosa, disgregante como ácido algínico, almidón de maíz o almidón de patata, lubricante como ácido esteárico con magnesio, edulcorante como sacarosa o sacarina, y aroma como salicilato de metilo o aroma de frutas. En el caso  
10 de una cápsula, ésta puede contener materiales líquidos como aceite graso además de los materiales anteriores.

Potencialmente todos los materiales suplementarios pueden mezclarse y usarse para la formación de materiales aplicables por vía oral con GC y PG, si estos son farmacéuticamente puros, sustancialmente no tóxicos y no afectan a la acción de los materiales bioactivos.

15 En esta invención, la dosis para conseguir el efecto como un controlador de la glucemia puede ser determinada por doctores con la consideración del tipo de enfermedades, la gravedad de la enfermedad, el género, la edad, el peso corporal, el estado de salud, el tipo de aplicación, la frecuencia y el momento de aplicación, la presencia de fármacos combinados, y otro entorno relacionado.

20 Este fármaco farmacológico en esta invención, que contiene GC y PG (0,01-50 gramos de GC), en el caso de ingestión oral, 0,5-100 mg de EGCG, ECG o sus compuestos mixtos por kg de peso corporal, más apropiadamente 1-50 mg, puede aplicarse una o varias veces al día, más apropiadamente 1-3 veces al día, justo antes, durante o justo después de una comida.

GC y PG en esta invención pueden fabricarse para un material suplementario de bebidas comerciales, agua mineral, bebidas alcohólicas, chicle, caramelo, golosinas, helado y galletas. Además, puede aplicarse en alimentos o suplementos alimenticios saludables con vitaminas y minerales para rebajar la glucemia postprandial.

## 25 **Exposición de los datos**

El presente estudio ha revelado que la GC de té verde, tal como EGCG y ECG, reduce fuertemente los niveles de glucemia principalmente a través de sus actividades en el tubo digestivo mientras incrementa el nivel de glucosa cuando GC está en la circulación (figura 8 para el resumen). Aunque se ha descrito que los polifenoles de té verde inhiben la actividad de sacarosa y  $\alpha$ -amilasa intestinal también, la GC puede no ser el inhibidor principal, dado que el efecto inhibidor del té verde era más débil que el del té negro que tiene una cantidad más pequeña de GC (19). La captación de glucosa intestinal está mediada por SGLT1, y se ha descubierto que GTE o GC es un inhibidor competitivo de SGLT1 de células epiteliales intestinales humanas (9, 20). En el presente estudio, la captación de glucemia en células metabólicamente importantes también se inhibía en presencia de EGCG. El efecto inhibidor de GC sobre transportadores de glucosa celular se ha observado previamente en adipocitos de ratón (21), adipocitos de rata (22) y eritrocitos humanos (7). Por lo tanto, se puede especular que la GC podría obstaculizar la acción de diversos transportadores de glucosa en el cuerpo, incluyendo los cotransportadores de Na-glucosa así como los transportadores de glucosa independientes de Na. Por lo tanto, la GC en el tubo digestivo puede ser útil para controlar la diabetes y la obesidad reduciendo la entrada de glucosa en la circulación (23), pero puede ser perjudicial en la circulación. Estos efectos ambivalentes de GC en los dos compartimentos pueden frustrar intentos de evaluar su papel preciso en el control de la glucemia. Los inventores observaron, además, una aguda resistencia a insulina haciendo circular EGCG en solitario o de forma más prominente haciendo circular GTE. La última amplificación puede deberse a los otros constituyentes, tales como ECG y ácido gálico, que puede ejercer efectos adicionales, o puede deberse al catabolismo retardado de EGCG en presencia de otros componentes del té verde (16). Por lo tanto, se espera que la acumulación de glucosa en la circulación causada por catequinas de té verde puede inducir hipersecreción de insulina. No es sorprendente que la sobrecarga de células beta a largo plazo represente una consecuencia perjudicial que causa eventual alteración de células beta.

En el presente estudio, GTE era eficaz a concentraciones de EGCG en sangre de 1-2  $\mu$ M, lo cual es fácilmente alcanzable mediante administración oral diaria de té verde (24). Es más probable que experimentos que usan ratas pasen por alto este efecto en circulación, dado que las ratas tienen una biodisponibilidad oral de EGCG mucho más baja (15, 16). Para aclarar el efecto de GTE circulante, los inventores emplearon OGTT a largo plazo en seres humanos, que tienen la biodisponibilidad oral de EGCG relativamente más alta que las ratas, y descubrieron que GTE obstaculizaba el retorno del nivel de glucosa al valor de control. Un informe *in vivo* que examinaba el efecto de EGCG circulante dentro de un intervalo de concentración aplicable al ser humano mostraba que la aplicación de EGCG intraperitoneal a relativamente largo plazo causaba pérdida de peso en ratas (17). Sin embargo, se descubrió un deterioro significativo en los órganos sexuales. Esto pudo deberse probablemente a la inhibición por EGCG de la captación de glucosa en las células de Leidig productoras de andrógenos (7). Una reciente investigación (7) reveló que ECG 100 nM competía con la glucosa para unirse al transportador de glucosa de tipo 1 en eritrocitos, de modo que la velocidad de reacción era la mitad de su valor máximo. El mismo efecto se conseguía con EGCG 1  $\mu$ M. A

este respecto, puede suponerse que los efectos reductores sobre la gluconeogénesis hepática inducidos por EGCG podrían deberse parcialmente a la inhibición mediada por EGCG de la captación de glucosa hepática (7, 25). Además, los efectos beneficiosos de EGCG en el tratamiento de algunos cánceres pueden deberse, al menos parcialmente, al efecto de privación de glucosa que el EGCG puede infligir a células cancerosas que son más metabólicamente activas y glucolíticamente dependientes que las células normales (26). Otros polifenoles, tales como quercetina y miricetina, parecen tener márgenes de seguridad relativamente más amplios dado que inhiben la captación de glucosa celular aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  (27).

Los esfuerzos por gestionar diabetes de tipo 2 y obesidad mediante tratamiento con té verde natural parecen ser cautos dado que la GC absorbida por vía sistémica bloquea realmente la captación de glucosa celular y, de este modo, incrementa los niveles de glucemia e insulina. La ingesta moderada de té verde (1-2 tazas al día) durante una comida puede ser beneficiosa, dado que el GC que entra en la circulación será mínimo, pero su efecto a largo plazo puede estar limitado probablemente a cierta categoría de la población (28). Muchos ensayos han medido la capacidad de los productos naturales para inhibir la absorción intestinal de glucosa. Sin embargo, ninguno de estos ensayos ha explorado el uso de inhibidores de la absorción de glucosa y lípidos derivados de GC no absorbibles. Maximizar el efecto positivo de GC en la luz intestinal, mientras se minimiza el efecto negativo en la circulación, estaría recomendado para controlar esas enfermedades metabólicas.

La presente invención no debe estar limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención, y no a modo de limitación.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Materiales y métodos

#### Ejemplo 1.1 - *Materiales*

Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solución salina tamponada con fosfato (PBS), suero fetal bovino (FBS) y suero fetal de ternero (FCS) se adquirieron de Gibco (Carlsbad, CA). El medio RPMI-1640 se adquirió de Welgene (Daegu, Corea). Polietilenglicol (PEG; resina hidroxilada Novasyn TG) fue suministrado a partir de: Novabiochem (Darmstadt, Alemania) para estudio en animales. PEG para estudio en seres humanos fue cedido amablemente de Taejoon (Seúl, Corea). Hojas de té verde (BOSUNG SEIJAK) se adquirieron de Bosung green tea Co. (Jeonnam, Corea). Epigallocatequina-3-galato (EGCG), epicatequina-3-galato (ECG), epigallocatequina (EGC) y epicatequina (EC) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

#### Ejemplo 1.2 - *Cultivo celular*

Mioblastos L6 de rata se cultivaron en DMEM bajo en glucosa con FBS al 10% (v/v) hasta que alcanzaban el 80% de confluencia. Para inducir la diferenciación, las células se cultivaron además en DMEM (glucosa 24,9 mM) que contenía FBS al 2% durante 7 días. La viabilidad de las células se evaluó mediante la prueba de viabilidad del azul de tripano. La diferenciación miogénica al estado de miotubo se evaluó tanto morfológica como bioquímicamente. Preadipocitos 3T3-L1 de ratón se cultivaron a confluencia a 37°C en placas de cultivo de 35 mm en DMEM que contenía FCS al 10% sin biotina o pantotenato añadido en incubadoras equilibradas con CO<sub>2</sub> al 5%. A los dos días después de la confluencia (día 0), la diferenciación se indujo con metilisobutilxantina (0,5 mM), dexametasona (0,5  $\mu\text{M}$ ) e insulina (5  $\mu\text{g/ml}$ ) en DMEM que contenía FBS al 10%. El día 2, metilisobutilxantina y dexametasona se retiraron y el tratamiento con insulina continuó durante 2 días adicionales. El día 4 y en lo sucesivo, DMEM (sin suplementación con insulina) más FBS al 10% fue sustituido cada 2 días. Se usaron células ( $2 \times 10^6$  células/placa) para experimentos el día 8. La diferenciación celular se evaluó mediante la tinción con rojo al aceite O (*Oil red-O*). La línea celular HepG2 de carcinoma hepatocelular humano se mantuvo en DMEM que contenía FBS al 10% a 37°C. Las células INS-1 de rata secretoras de insulina se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10%, ácido *N*-(2-Hidroxietil)piperazin-*N'*-(2-etanosulfónico) (HEPES) 10 mM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, 100 UI/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomina.

#### Ejemplo 1.3 - *Preparación de GTE*

Para estudios en animales, se añadieron 20 g de hojas de té verde a 1.000 ml de agua nanopura. Después de agitarlas durante 5 minutos a 80°C, las hojas de té se retiraron por filtración usando papel de filtro (papel de filtro Advantec 2, Hyundai micro Co., Seúl, Corea) a presión reducida. El extracto se secó por liofilización. (Se recogió un total de 3 g de GTE, en el que EGCG, ECG, EGC y EC eran ~100, 53, 56 y 31 mg/g de GTE, respectivamente). Una cantidad igual de la solución de GTE se mezcló con 2 g de perlas de PEG durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la filtración, el sobrenadante se liofilizó (EGCG, ECG, EGC y EC eran ~26, 14, 42 y 25 mg/g de GTE, respectivamente) para obtener GTE deficiente en GC (GTE-GC). Los resultados indicaban que el pretratamiento con resina preferentemente reducía GC de la solución de GTE. Para el estudio en seres humanos, se añadieron 30 g de hojas de té verde a 500 ml de agua nanopura. Después de agitarlas durante 3 minutos a 80°C, las hojas de té se retiraron por filtración, quedando una solución de 350 ml, que contenía ~500 mg de EGCG.

**Ejemplo 1.4 - OGTT en seres humanos**

Voluntarios masculinos sanos de 20-29 años sin antecedentes familiares de diabetes y sin resistencia a insulina evaluada por el índice de Homa se seleccionaron aleatoriamente y ayunaron durante una noche antes de que comenzaran los experimentos. En primer lugar, individuos que mostraban un nivel de glucemia en ayunas mayor de 100 mg/dl se excluyeron. A las 9:00 AM, cada individuo consumió por vía oral 350 ml de agua solamente (control), o 350 ml de solución de GTE que contenía 125 mg, 250 mg o 500 mg de EGCG, inmediatamente antes de o 1 h antes de la ingestión de 150 ml de agua que contenía 75 g de glucosa. Otro grupo de sujetos ingirió PEG (110 mg/100 mg de EGCG) con la solución de GTE. Después de que se había recogido sangre a través de un angiocatéter insertado en una vena del antebrazo, los niveles de glucemia e insulina plasmática se midieron en los momentos indicados. Los niveles de glucemia se midieron usando la tira reactiva Glucocard II (Arkray Inc., Kioto, Japón). Los niveles de insulina plasmática se midieron usando un kit inmunoradiométrico (INSULIN MYRIA, Techno genetics, Sesto, Italia). Antes de que comenzara el estudio, su propósito y sus riesgos se explicaron cuidadosamente, y se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los participantes. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad IRB Keimyung, Daegu, Corea, que regula la investigación en seres humanos.

**Ejemplo 1.5 - Prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) y OGTT en animales**

Ratas Sprague-Dawley fueron proporcionadas por Hyochang Science Co. (Seúl, Corea). Después de un ayuno de 12-h, las ratas fueron anestesiadas usando pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.; Nembutal, 50 mg/ml, Hanlim Pharmaceutical Co., Seúl, Corea) y a continuación se les inyectó una de las epicatequinas: EGCG, EGC, ECG y EC (cada una a 10 mg/kg en 300 µl de PBS, i.v.). Se disolvió EC en una cantidad mínima de DMSO por adelantado antes de la adición de PBS. En otro experimento, las ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos: control, GTE y GTE-GC. A las ratas en el grupo de GTE se les inyectó GTE natural (100 mg/kg en 300 µl de PBS, i.v.; 10 mg/kg como EGCG) a través de la vena caudal, mientras que a las ratas de control se les inyectaron solamente 300 µl de PBS y a las ratas en el grupo de GTE-GC se les proporcionó una cantidad igual de GTE deficiente en GC (100 mg/kg en 300 µl de PBS, i.v.; 2,6 mg/kg como EGCG). Treinta minutos después de la inyección, se inyectó glucosa (2,0 g/kg en 600 µl de agua destilada, i.p.). Para OGTT, a las ratas se les hizo ingerir 1 ml de agua destilada solamente (control), o 1 ml de agua destilada que contenía uno de GTE natural (900 mg/kg), GTE deficiente en GC (900 mg/kg), EGCG (90 mg/kg), GTE natural más PEG (110 mg/100 mg de EGCG) o PEG en solitario. Inmediatamente después de la ingestión, a cada rata se le administró por vía oral 1 ml de agua destilada que contenía glucosa (2 g/kg). Para el ensayo de los niveles de glucemia, se extrajo sangre de la vena caudal en los momentos indicados. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético institucional de la Universidad Keimyung, Daegu, Corea para supervisar investigación en animales.

**Ejemplo 1.6 - Prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en animales**

Ratones Kir6.2 knock-out (k/o) fueron proporcionados amablemente por el Prof. Susumu Seino en la Universidad de Kobe en Japón. Después de un ayuno de 4 h, a ratones Kir6.2 k/o o a ratas normales se les inyectó por vía intravenosa PBS (100 µl para el ratón, 300 µl para la rata) solamente, o PBS que contenía EGCG (10 mg/kg), GTE natural (100 mg/kg) o GTE deficiente en GC (100 mg/kg). Treinta minutos después de la inyección, a los ratones y las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal solución salina normal (300 µl para el ratón, 600 µl para la rata) que contenía insulina (1 UI/kg; INSULIN LISPRO, Eli Lilly, IN). Las tomas de muestras de sangre se realizaron a través de la vena caudal en los momentos indicados.

**Ejemplo 1.7 - Ensayo de captación de 2-desoxiglucosa**

En resumen, después de la privación de suero durante 30 minutos, las células se lavaron con tampón Krebs-Ringer fosfato-HEPES [tampón KRPH: tampón fosfato 10 mM, pH 7,4; MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM y HEPES 10 mM, pH 7,6] y a continuación se incubaron con o sin insulina 100 nM durante 20 minutos en tampón KRPH que contenía EGCG (0, 0,1, 1,0 ó 10 µM). El transporte de glucosa se determinó mediante la adición de 2-desoxi-[<sup>3</sup>H] glucosa (0,1 mM, 0,5 µCi/ml; PerkinElmer Life and Analytical Science, Waltham, MA). Después de 10 minutos de incubación, la reacción se interrumpió mediante tres lavados rápidos con PBS enfriado con hielo. Las células se lisaron a continuación en PBS que contenía NaOH 0,2 M, y la captación de glucosa se evaluó mediante recuento por centelleo.

**Ejemplo 1.8 - Análisis por transferencia de Western**

Para determinar el efecto de EGCG sobre la actividad de proteína quinasa B (PKB), el estado de fosforilación de PKB se examinó después de la exposición de células L6, INS-1, HEPG2 y 3T3L-1 a medios que contenían diferentes concentraciones de EGCG e insulina. Como en el ensayo de captación de 2-desoxiglucosa, las células experimentales fueron expuestas a medios sin glucosa durante 30 minutos y a continuación se incubaron con o sin insulina 100 nM durante 20 minutos en KRPH que contenía EGCG (0, 0,1, 1,0 ó 10 µM). Después de 10 minutos de incubación adicionales con glucosa 5 mM, la reacción se interrumpió mediante tres lavados rápidos con PBS enfriado con hielo. Las proteínas celulares totales se extrajeron en tampón de lisis (Tris-Cl 10 mM (pH 7,4), NaCl 130 mM, Triton X-100 al 5% (v/v), EDTA 5 mM, aprotinina 200 nM, leupeptina 20 mM, fenantrolina 50 mM, benzamidina-



HCl 280 mM) durante 20 minutos a 4°C. Los lisados se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransferieron a una membrana Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA). Después de sondear con anticuerpos específicos [Anticuerpo anti-fosfo-PKB (Ser473) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), y anticuerpo anti-β-actina (Sigma)], las bandas inmunorreactivas se visualizaron con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano rusticano (1:5.000; Santa Cruz, CA) usando quimioluminiscencia intensificada (Amersham Biosciences, Little Chalfont, RU).

#### **Ejemplo 1.9 - Análisis de catequinas de GTE con HPLC**

El análisis por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2695 equipado con un detector de absorbancia doble modelo 2487 (Waters Co., Milford, MA). Una columna de relleno de fase inversa Symmetry C18 de Waters (4,5 mm x 250 mm, 5 μm) se usó a 25°C para separación durante todo este estudio. Las catequinas se determinaron simultáneamente a 235 nm. Se realizó una elución con gradiente modificando la proporción de disolvente A (agua-ácido trifluoroacético, 99,9:0,1 v/v) con respecto a disolvente B (acetonitrilo-ácido trifluoroacético, 99,9:0,1 v/v), con un caudal de 1 ml/minuto. La composición de la fase móvil cambiaba linealmente del 9,5% al 14% de disolvente B en 10 minutos y a continuación se mantenía la misma composición durante 10 minutos, seguidos por un incremento lineal de disolvente B hasta el 27,5% en el plazo de 15 minutos. La composición de la fase móvil se llevó de vuelta a continuación a las condiciones iniciales durante un periodo de 5 minutos para el próximo ciclo. Todas las soluciones preparadas se filtraron a través de membranas de 0,45 μm (Sartorius, Maisemore, RU), y la fase móvil se desgasificó antes de inyección en la HPLC.

#### **Ejemplo 1.10 - Análisis estadísticos**

Los resultados se expresan como la media ± SEM. El paquete de software SPSS (versión 14.0) (SPSS Inc., Chicago, IL) se usó para los análisis estadísticos. El área bajo la curva se calculó usando el software Microcal Origin (versión 7.0; Northampton, MA). Se realizaron comparaciones entre dos grupos con la prueba de la t de Student bilateral para datos emparejados o sin emparejar. Para comparaciones de más de dos grupos, la significación se puso a prueba usando un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni para tratar con cantidades relativamente pequeñas de muestras. Las diferencias entre grupos se consideraban significativas cuando  $P < 0,05$ .

#### **EJEMPLO 2 - Resultados**

##### **Ejemplo 2.1 - Efecto de la ingesta de GTE sobre los niveles de glucemia e insulina plasmática durante OGTT en seres humanos**

Los resultados de OGTT que se había realizado con voluntarios masculinos sanos mostraba que los efectos de la ingesta de GTE sobre la tolerancia a la glucosa cambiaban dependiendo del lapso de tiempo entre la administración de GTE y glucosa. GTE administrado por vía oral mantenía niveles de glucemia menores que el control durante OGTT cuando la glucosa se tomó inmediatamente después de la administración de GTE (figura 1A). Este efecto es el mismo con los resultados notificados previamente (14). El efecto rebajante de GTE sobre los niveles de glucemia durante OGTT se invirtió cuando éste se administró 1 h antes que la administración de glucosa (figura 1C). El nivel de glucemia era significativamente más alto en el grupo de GTE que en el control 60 minutos después de la carga de glucosa ( $P < 0,01$ ). El intervalo de 1 h entre la ingesta de GTE y de glucosa se seleccionó, dado que se sabía que las concentraciones sanguíneas de ingredientes del té, especialmente catequinas, alcanzaban un máximo entre 1-2 h después de la ingestión de GTE (4, 15). Curiosamente, los niveles de insulina plasmática también eran significativamente ( $P < 0,05$ ) más elevados en el grupo de GTE a los 60 minutos (figura 1D), lo que implica que los niveles de glucemia más elevados pueden inducir una mayor velocidad de secreción de insulina.

##### **Ejemplo 2.2 EGCG y ECG de catequinas del té son críticos para intolerancia a la glucosa**

Para aclarar que componentes de GTE eran responsables de la OGTT anormal en seres humanos, se realizó IPGTT con rata (figura 2). Dado que las epicatequinas fueron estudiadas exhaustivamente por su papel en la tolerancia a la glucosa, se usaron EGCG, ECG, EGC y EC para IPGTT. Cada catequina se inyectó en ratas 30 minutos antes de la administración de glucosa. La cantidad de EGCG inyectada (10 mg/kg, i.v.) se seleccionó para alcanzar sus concentraciones en sangre a aproximadamente 1 μM a los 30 minutos después de la inyección (16, 17). Se usó la misma cantidad de otras catequinas incluso aunque éstas tenían diferentes perfiles farmacocinéticos (10). EGCG y ECG causaban niveles de glucemia más elevados 30 minutos después de la carga de glucosa en comparación con el control ( $P < 0,01$ ) mientras que EC y EGC no tenían ningún efecto. Este resultado sugería que el efecto de GTE sobre la intolerancia a la glucosa se debía principalmente a las dos GC, EGCG y ECG. Dado que la cantidad de EGCG en GTE soluble en agua era aproximadamente 2-3 veces mayor que ECG (18), se realizaron estudios adicionales con EGCG como representante de GC.

##### **Ejemplo 2.3 - La captación de 2-desoxi-<sup>3</sup>H]-glucosa en las células es obstaculizada por EGCG**

Las dependencias de la dosis de EGCG de la captación de glucosa basal y estimulada por insulina, se evaluaron con células metabólicamente importantes incluyendo células beta (figura 3). La captación de glucosa tanto basal como estimulada por insulina se redujo mediante dependencia a la dosis de EGCG para todas las células pretratadas con EGCG. Además, en las líneas celulares puestas a prueba hasta EGCG 10 μM, el EGCG no alteraba

la expresión basal y regulada por insulina de fosfo-PKB (figura 4).

**Ejemplo 2.4 - El EGCG circulante incrementa fuertemente los niveles de glucemia y la resistencia a insulina**

Se examinó la posibilidad de asociación entre la intolerancia a la glucosa mediada por EGCG y los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), que modulan la resistencia a insulina periférica así como la secreción de insulina por células beta. Se hizo ayunar a ratas normales y ratones Kir6.2 k/o durante 4 h antes de la inyección de EGCG. La significativa elevación de los niveles de glucemia tanto en ratas normales como en ratones Kir6.2 k/o se descubrió 30 minutos después de la inyección de EGCG ( $P < 0,01$ ; figura 5A, B). Este resultado sugiere que el cambio inducido por EGCG del nivel de glucemia no estaba mediado a través de un mecanismo que implicaba canales  $K_{ATP}$ . Cuando se trataba con insulina, la velocidad de desaparición de glucemia se retrasó leve pero significativamente en ratas pretratadas con EGCG y ratones Kir6.2 k/o ( $P < 0,01$ ; figura 5C, D).

**Ejemplo 2.5 - Efecto de GTE deficiente en GC**

La inyección de GTE con ratas que ayunaron durante 4 h causaba una significativa elevación de los niveles de glucemia ( $P < 0,05$ ; figura 6A), que era un descubrimiento similar a la inyección con EGCG en solitario en la figura 5A, mientras que la inyección de GTE deficiente en GC no lo causaba ( $P = 0,114$ ). La ITT revelaba una notable resistencia a insulina en el grupo de GTE ( $P < 0,01$  a los 20 minutos), mientras que la mejora significativa de la resistencia a insulina se observó en el grupo de GTE-GC (figura 6B). Las ratas en otro experimento se mantuvieron en ayunas durante 12 h, no 4 h, para minimizar la elevación del nivel de glucemia por el propio GTE. A continuación se les inyectó por vía intravenosa PBS en solitario, o PBS que contenía GTE natural o GTE deficiente en GC 30 minutos antes de la carga de glucosa. Tal como se muestra en la figura 6C, los niveles de glucemia en el grupo tratado con GTE durante la IPGTT eran notablemente más elevados que aquellos en el control con PBS ( $P < 0,01$  a los 10 y 20 minutos), mientras que el grupo de GTE-GC mostraba niveles de glucosa similares al control. Los efectos sobre la absorción de glucosa en la circulación de GC dentro del tracto gastrointestinal se evaluaron mediante OGTT en rata. Ésta se realizó mediante ingesta oral de GTE inmediatamente seguida por ingestión de glucosa (figura 6D). De forma esperada, los niveles de glucemia se mantuvieron durante la OGTT a un nivel más bajo en el grupo al que se le administró GTE que en el grupo de control que ingirió solamente PBS. El grupo al que se le administró GTE deficiente en GC o EGCG parecía inhibir la absorción de glucosa de forma menos eficiente que en el grupo tratado con GTE, lo que indicaba que GC también es crítica para el efecto de GTE sobre el bloqueo de la absorción de glucosa en la luz intestinal.

**Ejemplo 2.6 - Efecto de la administración de PEG con GTE**

En el supuesto de que la resina PEG inhibe selectivamente la absorción intestinal de GC o GTE, se ingirió GTE natural junto con PEG. Durante OGTT en ratas inmediatamente después de la ingestión, los niveles de glucemia eran significativamente más bajos en el grupo de GTE+PEG que en el control ( $P < 0,05$ ), comparables al grupo con GTE en solitario (figura 7A). No había ninguna diferencia entre el grupo de control y el grupo tratado con PEG en solitario en niveles de glucemia, lo que indicaba que el propio PEG no afectaba a la absorción de glucosa o la motilidad intestinal en el intervalo de concentraciones usado. El tiempo para OGTT en seres humanos se prolongó a 3 h observando el efecto de GC circulante sobre niveles de glucemia basales (figura 7B). Aunque los niveles de glucemia en el grupo de GTE durante el periodo más temprano de la OGTT parecían ser inferiores que en el control, estos, durante el periodo tardío de la OGTT, eran significativamente más elevados que en el control, lo que no se observó en el grupo de GTE+PEG. Cuando se llevó a cabo OGTT en seres humanos 1 h después de la ingestión de GTE+PEG, los niveles de glucemia e insulina plasmática también se normalizaron en contraste con el grupo de GTE, que mostraba una elevación significativa de los niveles de glucosa e insulina (figuras 7C, D).

**Ejemplo 3 - Fabricación de extractos y polvo de té verde**

Para estudios en animales, se añadieron 20 g de hojas de té verde a 1.000 ml de agua nanopura. Después de agitarlas durante 5 minutos a 80°C, las hojas de té se retiraron por filtración usando papel de filtro (papel de filtro Advantec 2, Hyundai micro Co., Seúl, Corea) a presión reducida. El extracto se secó por liofilización. (Se recogió un total de 3 g de GTE, en los que EGCG, ECG, EGC y EC eran ~100, 53, 56 y 31 mg/g GTE, respectivamente)

**Ejemplo 4 - Fabricación de polvo de GTE deficiente en GC**

Después del ejemplo 3, una cantidad igual de la solución de GTE se mezcló con 2 g de perlas de PEG (3.000-4.000) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la filtración, el sobrenadante se liofilizó (EGCG, ECG, EGC y EC eran ~26, 14, 42 y 25 mg/g GTE, respectivamente) para obtener GTE deficiente en GC (GTE-GC). Los resultados indicaban que el pretratamiento con resina reducía preferentemente GC de la solución de GTE.

**Ejemplo 5 - Fabricación de extractos y polvo de té verde**

Para el estudio en seres humanos, se añadieron 30 g de hojas de té verde a 500 ml de agua nanopura. Después de agitarlas durante 3 minutos a 80°C, las hojas de té se retiraron por filtración, quedando una solución de 350 ml, que contenía -500 mg de EGCG y -260 mg de ECG.

**Ejemplo 6 - Fabricación de composiciones farmacéuticas****Ejemplo 6-1: Comprimidos**

5 Un comprimido que contenía 50 mg de EGCG, ECG o su forma mixta; 50 mg de PEG (4.000); 20 mg de almidón; una cantidad adecuada de ácido esteárico con magnesio puede prepararse como controlador de la glucemia, de acuerdo con las instrucciones generales para la producción de comprimidos.

**Ejemplo 6-2: Cápsulas**

Una cápsula llena con 50 mg de EGCG, ECG o su forma mixta; 50 mg de PEG (4.000); 19 mg de almidón; 1 mg de talco; una cantidad adecuada de ácido esteárico con magnesio puede prepararse como controlador de la glucemia, de acuerdo con las instrucciones generales para la producción de cápsulas.

**Ejemplo 6-3: Gránulos**

También puede prepararse un gránulo como controlador de la glucemia, de acuerdo con las instrucciones generales para la producción de gránulos.

Todas las referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad.

15 Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando solamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas específicamente en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden estar abarcados en el alcance de las reivindicaciones.

**REFERENCIAS**

1. Bonora E. Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 74-83.
- 20 2. Jiang MH, Fei J, Lan MS, et al. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 2008; 51: 1525-1533.
3. Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 2003; 133 (Supl): S3262-S3267.
- 25 4. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 351-354.
5. Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7182-7186.
6. Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, Okubo T, Iso H. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005; 51: 335-342.
- 30 7. Naftalin RJ, Afzal I, Cunningham P, et al. Interactions of androgens, green tea catechins and the antiandrogen flutamide with the external glucose-binding site of the human erythrocyte glucose transporter GLUT 1. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 487-499.
8. Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 1653-1657.
- 35 9. Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5618-5623.
10. Zhu M, Chen Y, Li RC. Pharmacokinetics and system linearity of tea catechins in rat. *Xenobiotica* 2001; 31: 51-60.
11. Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 326-332.
- 40 12. Van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A, Tijburg LB. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica* 2001; 31: 891-901.
13. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 2002; 83: 109-116.
- 45 14. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu JB, Sasaoka T, Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 18-27.

15. Lee MJ, Maliakal P, Chen L et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1025-1032.
- 5 16. Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 1045-1050.
17. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000; 141: 980-987.
18. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 1864-1873.
- 10 19. Hara Y, Honda M. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. *Agric Biol Chem* 1990; 54: 1939-1945.
20. Shimizu M, Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Miyamoto Y. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *BioFactors* 2000; 13: 61-65.
21. Nomura M, Takahashi T, Nagata N, et al. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1403-1409.
- 15 22. Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 2005; 386: 471-478.
23. Arakawa K, Ishihara T, Oku A, et al. Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter inhibitor T-1095. *Brit J Pharm* 2001; 132: 578-586.
- 20 24. Chow HH, Cai Y, Alberts DS, et al. Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 53-58.
25. Collins QF, Liu HY, Pi J, Liu Z, Quon MJ, Cao W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007; 282: 30143-30149.
26. Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66: 8927-8930.
- 25 27. Park JB. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 568-574.
28. Polychronopoulos E, Zeimbekis A, Kastorini CM, et al. Effects of black and green tea consumption on blood glucose levels in non-obese elderly men and women from Mediterranean Islands (estudio epidemiológico MEDIS). *Eur J Nutr* 2008; 47: 10-16.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que consta de extractos de té verde (GTE) con galocatequinas (GC) y una macromolécula para prevenir la absorción intestinal de GC, para uso en un método para controlar la glucemia,  
en la que dicha macromolécula es polietilenglicol.
- 5 2. La composición para un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la GC comprende al menos uno de EGCG o ECG.
3. La composición para un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la macromolécula tiene un peso molecular de 1.000-2.000.000 dalton.
- 10 4. Un alimento funcional que comprende la composición definida en la reivindicación 1, para uso en un método para controlar la glucemia.
5. El alimento funcional para un uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el alimento es una bebida, comprimido o polvo.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad que controla la glucemia de la composición definida en la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable de ésta para uso en un método para controlar la glucemia.
7. La composición farmacéutica para un uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la GC comprende EGCG o ECG.
8. La composición farmacéutica para un uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la macromolécula tiene un peso molecular de 1.000-50.000 dalton.

FIGURA 1

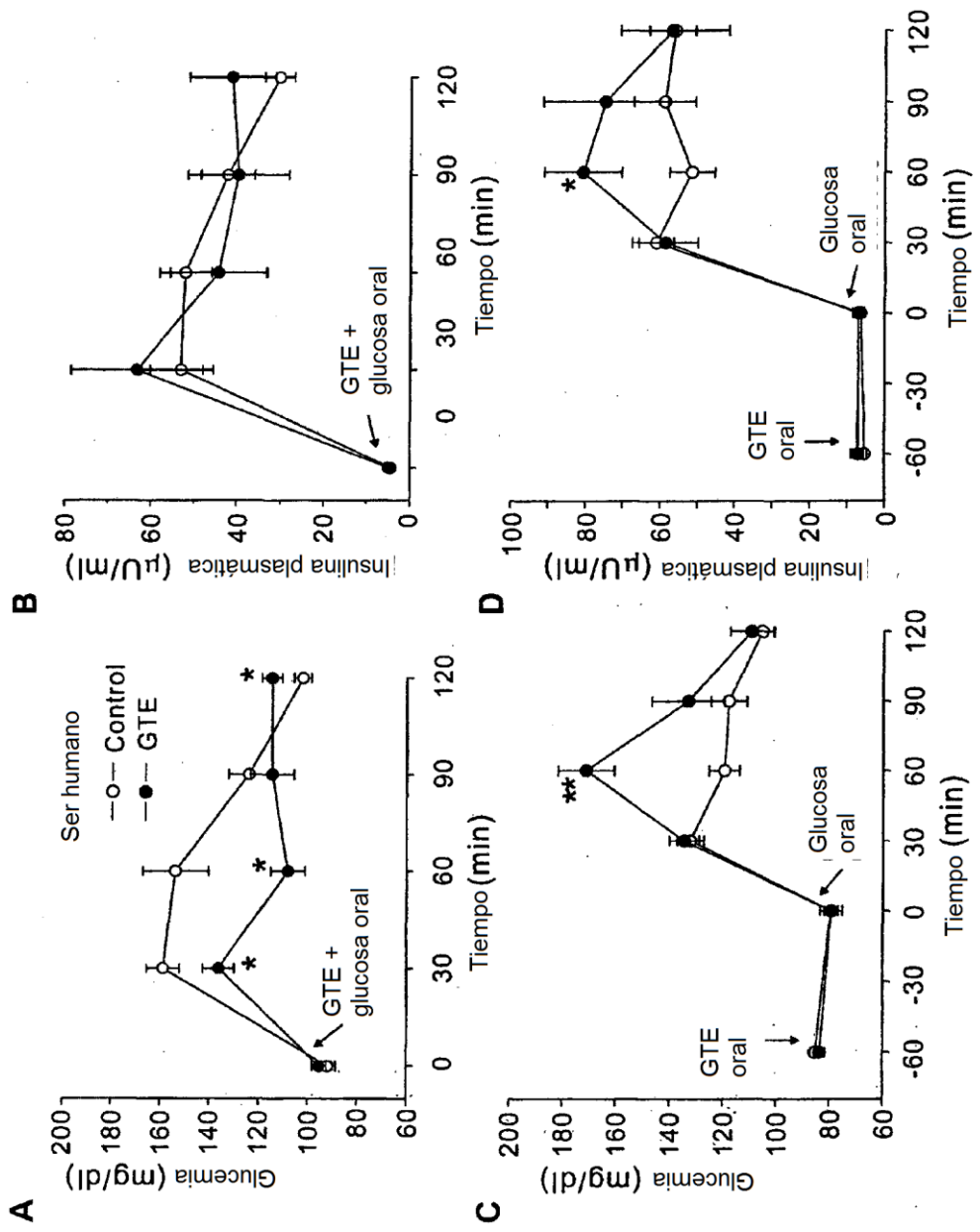


FIGURA 2

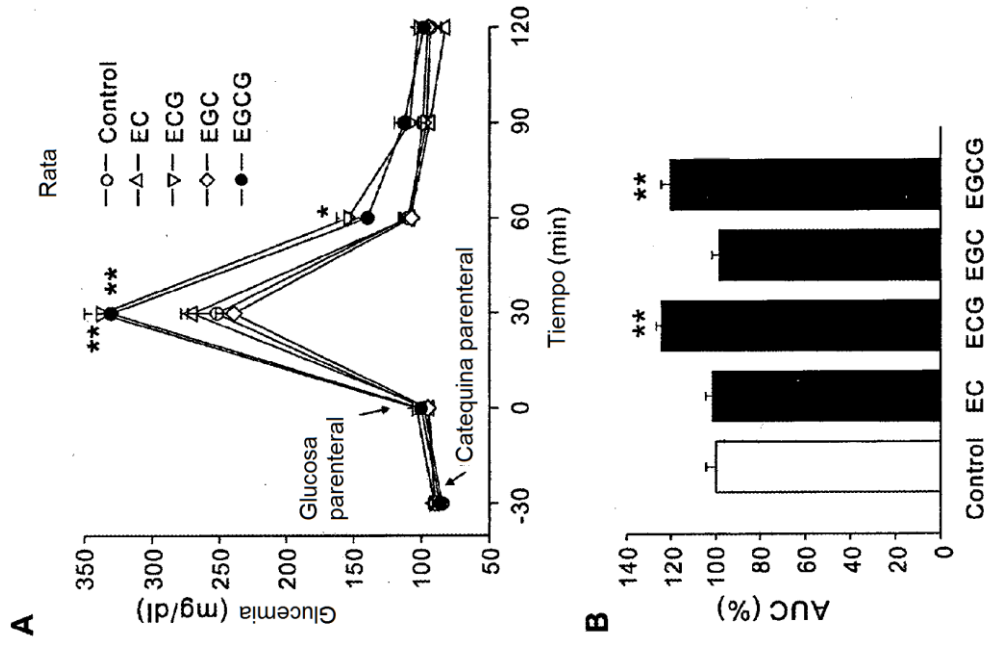


FIGURA 3

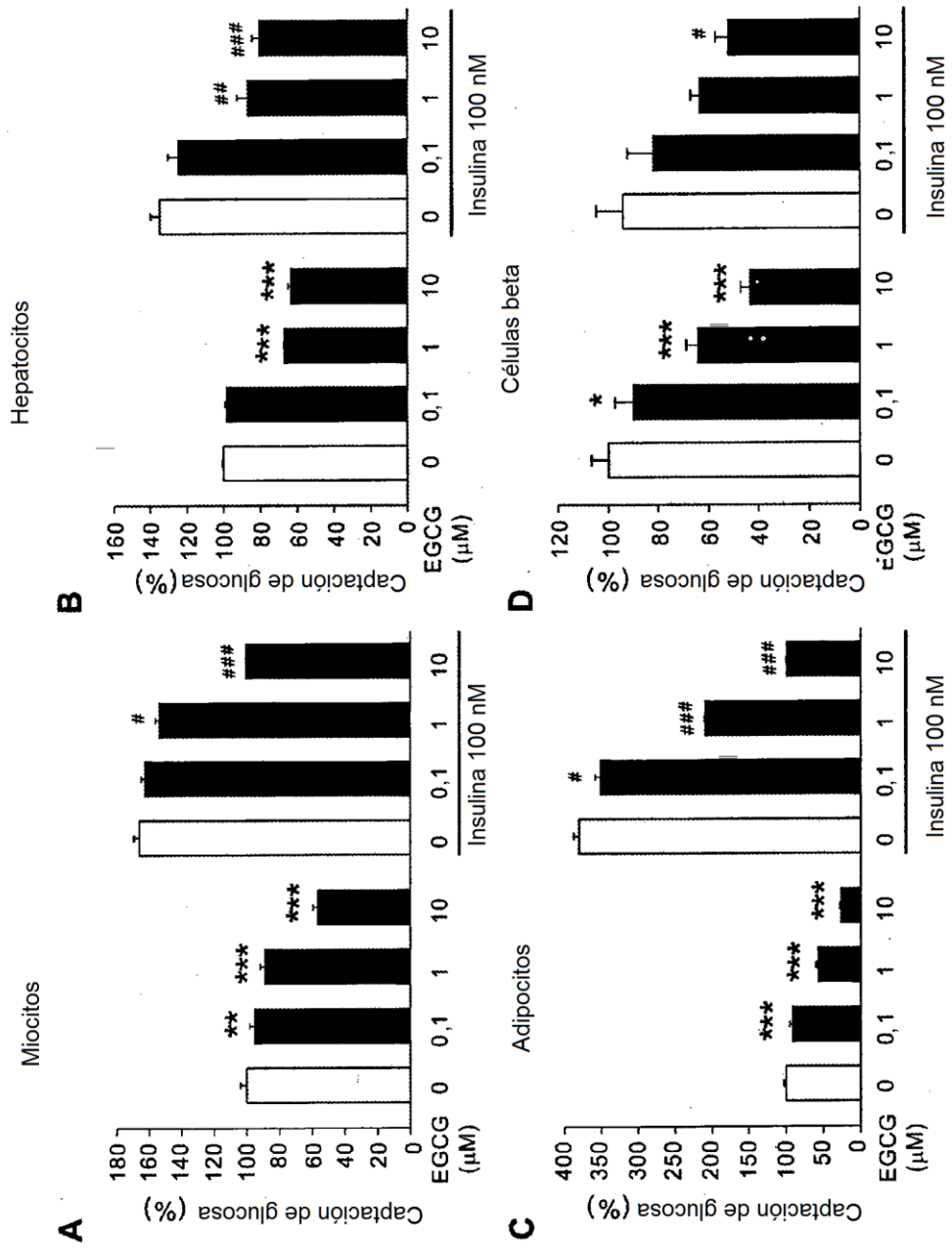




FIGURA 4

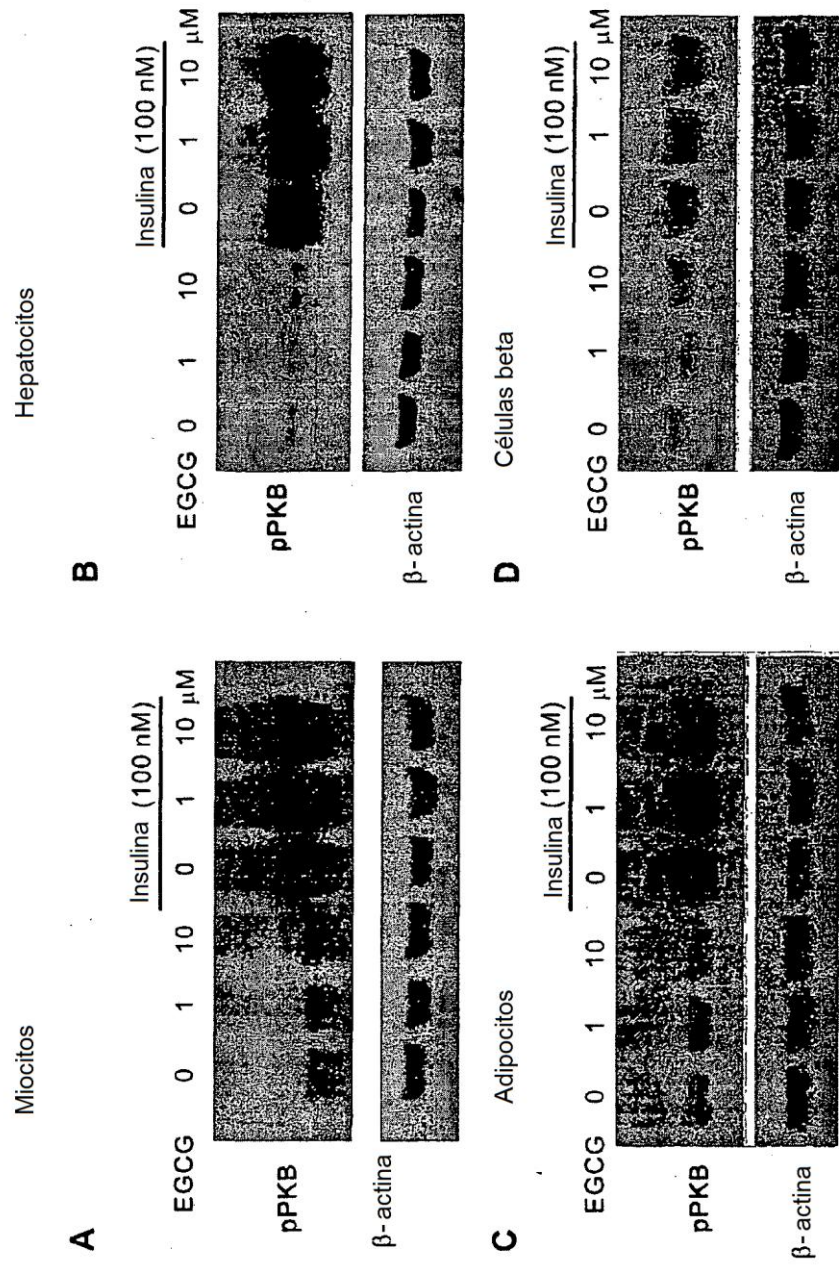


FIGURA 5

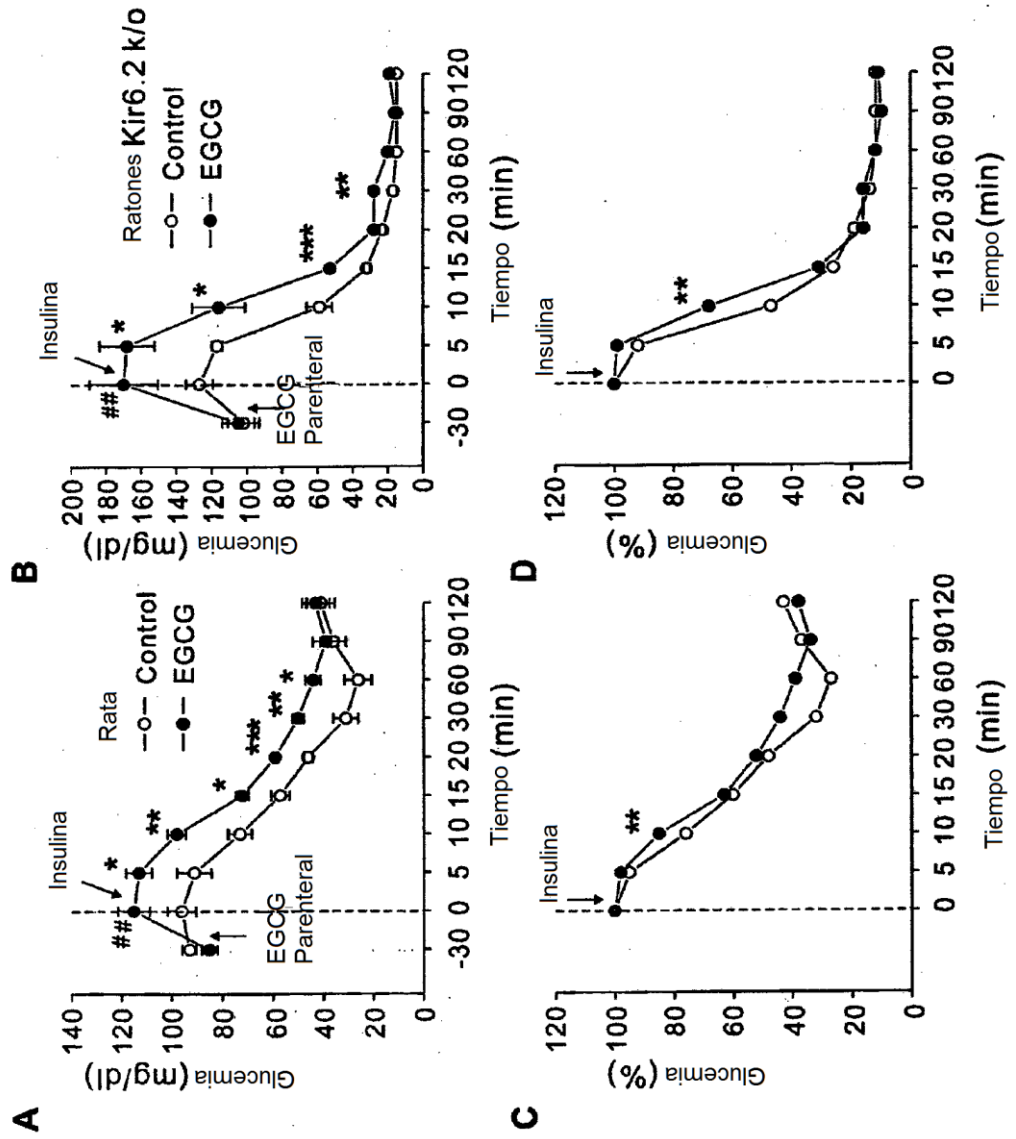


FIGURA 6

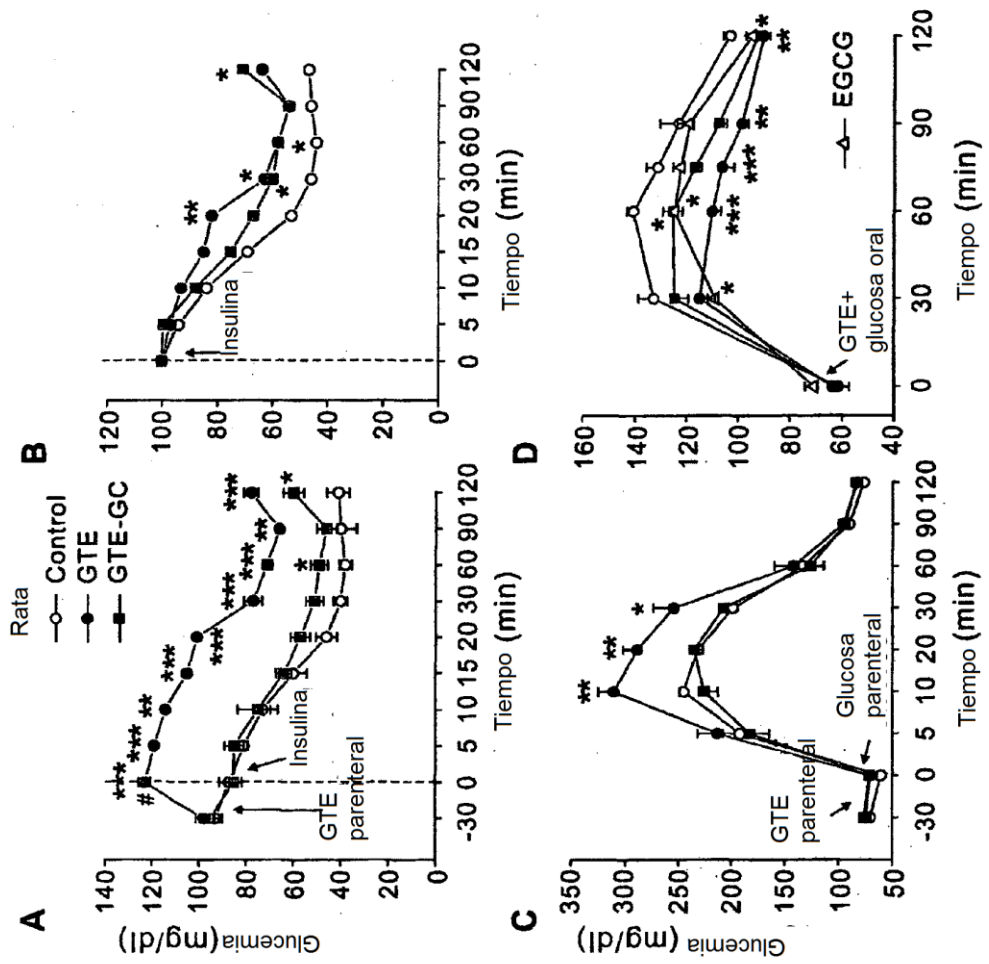


FIGURA 7

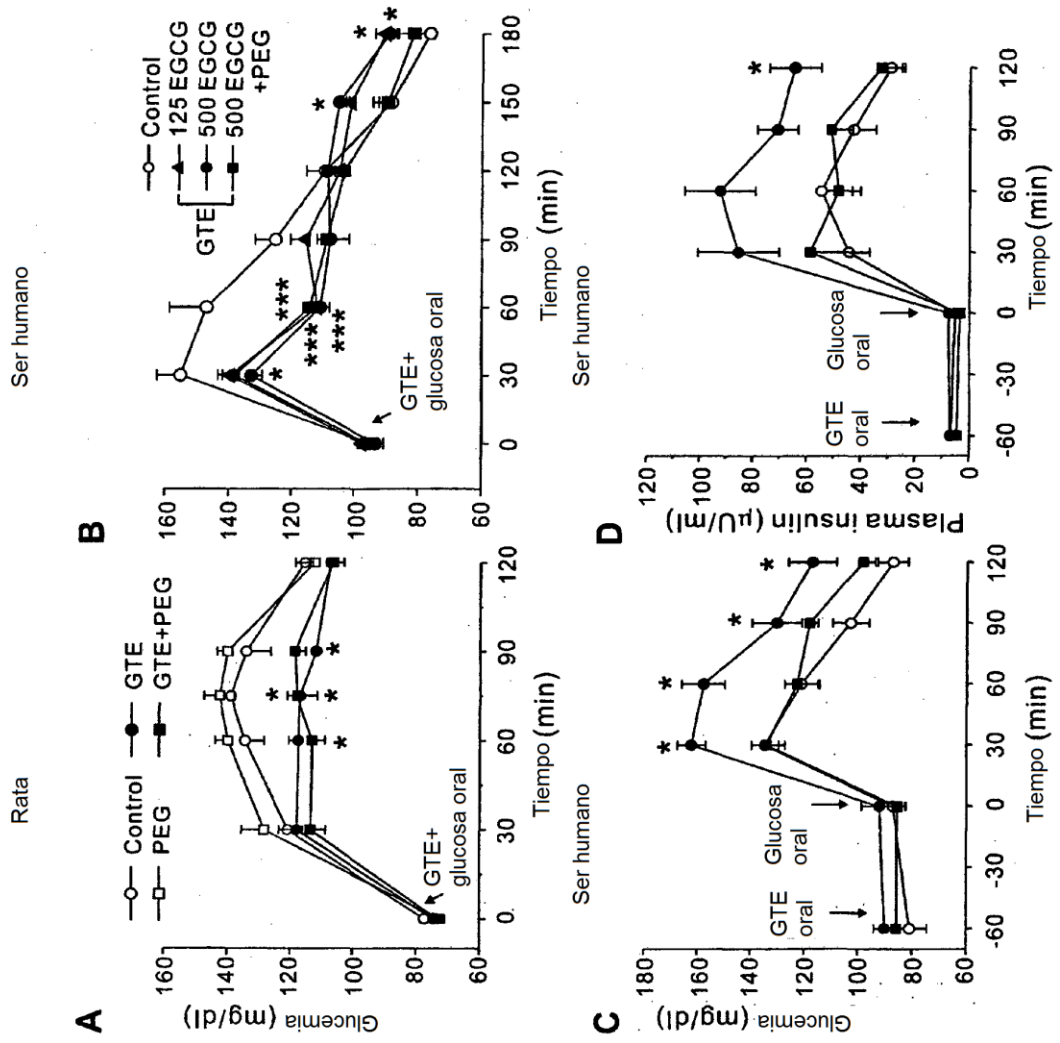


FIGURA 8

