

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 077**

51 Int. Cl.:

C07D 311/62 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009** **E 09810041 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015** **EP 2330103**

54 Título: **Nuevo tetrámero de galato de epigalocatequina y mejorador de la función del endotelio vascular que comprende el mismo**

30 Prioridad:

29.08.2008 JP 2008222935

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2015

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

FUKUI, YUKO y
IMAMOTO, MAI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 550 077 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

Nuevo tetrámero de galato de epigallocatequina y mejorador de la función del endotelio vascular que comprende el mismo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto de tetrámero de galato de epigallocatequina nuevo y a un método para producir el compuesto. Lo desvelado en el presente documento es adicionalmente un alimento y una bebida y una composición farmacéutica que contiene el compuesto, particularmente un alimento y una bebida y una composición farmacéutica que ejerce una acción de mejora de la función del endotelio vascular.

10

Antecedentes de la técnica

El síndrome metabólico es una afección patológica en la que una cantidad de acumulación de grasa visceral aumenta por los hábitos de vida y por predisposición hereditaria, con el resultado de que se induce la resistencia a insulina y emergen síntomas tales como lipidosis, hipertensión e intolerancia a la glucosa y es probable que ocurra una lesión vascular. Tal afección patológica conduce a arterioesclerosis tal como infarto cardíaco e infarto cerebral y en lo peor puede dar como resultado la muerte.

20

Cuando emerge la resistencia a insulina debido al síndrome metabólico, la función de las células del endotelio vascular se daña. Como una causa de la misma, se sugiere la anormalidad de la producción del monóxido de nitrógeno (en lo sucesivo, simplemente denominado NO) en las células del endotelio vascular (Bibliografía distinta de patente 1).

25

El NO se produce por la L-arginina y una molécula de oxígeno por la NO sintasa endotelial (en lo sucesivo, simplemente denominada eNOS) en las células del endotelio vascular. El papel del NO, que es un factor de relajación vascular derivado del endotelio vascular, es principalmente una acción supresora del cambio proliferativo, del cambio inflamatorio, de la agregación plaquetaria y del estrés de oxidación. Una reducción de la producción de NO y una acción insuficiente del mismo se observaron en presencia de varios factores de riesgo tales como arterioesclerosis e hiperlipemia (bibliografía distinta de patente 2). Particularmente, en el estado de resistencia a insulina asociada al síndrome metabólico, se sabe que la actividad de la GTP ciclohidrasa I (en lo sucesivo, simplemente denominada GTP-CH1), que es una coenzima de la eNOS, es decir, una enzima productora de tetrahidropterina (en lo sucesivo simplemente denominada BH₄), se reduce (Bibliografía distinta de patente 1). El mecanismo de reducción de la producción de NO y de la producción insuficiente del mismo es complicado; sin embargo, se sabe que la actividad de eNOS se inhibe por un metabolito de la L-arginina, arginina de dimetilo asimétrica (en lo sucesivo, simplemente denominada ADMA). Adicionalmente, en el estado en que la actividad de eNOS se reduce, las moléculas de oxígeno se metabolizan preferentemente por la NADPH oxidasa para generar oxígeno activo, que induce adicionalmente la hipoactividad del endotelio vascular (Bibliografía distinta de patente 3).

30

35

40

Por otro lado, cuando las células del endotelio vascular producen enzima degradante de ADMA, es decir, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2 (en lo sucesivo, simplemente denominada DDAH 2), la función del endotelio vascular puede mantenerse satisfactoriamente. Además, la función del endotelio vascular puede mantenerse satisfactoriamente también reduciendo la actividad NADPH oxidasa presente en las células del endotelio vascular.

45

Se conoce un material alimenticio que tiene un efecto de mejora de la función del endotelio vascular, (-)-epigallocatequin-3-O-galato (en lo sucesivo, también denominado "EGCG") contenido en el té verde (Bibliografía distinta de patente 4). Además, se informa que cuando se ingiere té negro, la vasodilatación que depende del flujo sanguíneo del brazo superior humano se mejora (Bibliografía distinta de patente 5) que la activación de eNOS se facilita en el estudio *in vitro* usando un extracto de té negro (Bibliografía distinta de patente 6); sin embargo, los principios activos del mismo no se elucidaron. Además, no se ha hecho ningún estudio en el té de oolong y sus componentes.

50

Los ejemplos del polímero de EGCG producido por un proceso de fermentación intrínseco del té de oolong incluyen un dímero (homobisflavano A de oolong y homobisflavano B de oolong) (Bibliografía distinta de patente 7) y un trímero (Bibliografía de patente 1) que se han aislado e identificado. Se ha informado que estos compuestos tienen una actividad inhibidora de la lipasa pancreática fuerte (Bibliografía distinta de patente 8 y Bibliografía de patente 1).

55

LISTA DE CITAS

60

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES

BPT 1: Publicación Internacional nº WO2005/116005

BIBLIOGRAFÍA DISTINTA DE PATENTES

- BDP 1: Folia Pharmacol. Jpn. Vol. 125: p285-290, 2005
- BDP 2: Journal of clinical Investigation, vol. 95, p1747-1755, 1995
- 5 BDP 3: Endocrinology, vol. 148, p3773-3780, 2007
- BDP 4: Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p6190-6195, 2004
- BDP 5: Circulation. Vol. 104, p151-156, 2001
- BDP 6: Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p46637-46643, 2004
- BDP 7: Chem. Pharm. Bull. 37(12), 3255-3263, 1989
- 10 BDP 8: J. Agric. Food Chem. 53, 4593-4598 (2005)

Sumario de la invención

Problema técnico

15 La Bibliografía distinta de patente 4 describe el efecto de mejora de la función del endotelio vascular del EGCG; sin embargo, en un estudio usando células cultivadas, se requiere una concentración relativamente alta de al menos 30 a 50 μ M para aumentar la actividad de eNOS. Además, la Bibliografía distinta de patente 5 desvela el efecto de mejora de la función del endotelio vascular del té negro y describió que la vasodilatación que depende del flujo

20 sanguíneo del brazo superior se mejora en un grupo donde se deja tomar té negro por un humano en una dosis de 900 ml al día durante 4 semanas, en comparación con un grupo control.

Como se describe anteriormente, el EGCG tiene un efecto de mejora de la función endotelial; sin embargo el efecto no es suficiente. Para obtener el efecto tomando té negro que contiene EGCG debe tomarse una cantidad

25 relativamente grande de té negro, etc. Además, el EGCG es una causa de sabor amargo y astringencia y por lo tanto si se toma EGCG continuamente, el sabor es un problema. Además, una gran cantidad de ingesta de té negro da lugar a la ingesta de una gran cantidad de cafeína. Por esto, tomar té negro se considera inadecuado para la ingesta continua para mantener la función del endotelio vascular.

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto capaz de tomarse continuamente y que tenga un efecto de mejora de la función del endotelio vascular mejorando la función del NO de las células del endotelio vascular. En el presente documento se desvela además un alimento y una bebida que contienen el compuesto.

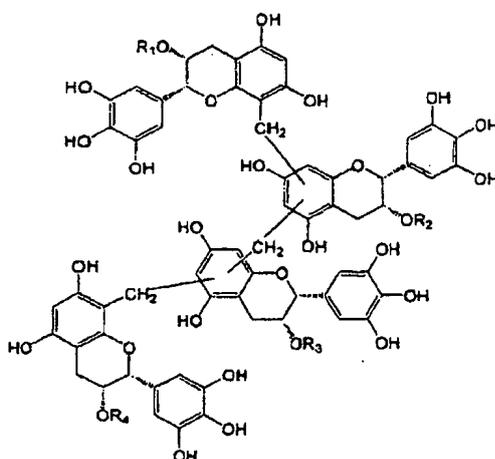
Solución al problema

35 Los presentes inventores estudiaron con vistas de solucionar estos problemas un compuesto derivado de un compuesto que tiene un anillo cromano tal como EGCG. Como resultado, encontraron que un compuesto nuevo que tiene cuatro anillos cromanos tiene una acción de mejora de la función del endotelio vascular más eficaz que el EGCG. Basándose en el descubrimiento, se ha cumplido la presente invención.

40 Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan

- 1. Un compuesto representado por la Fórmula (I):

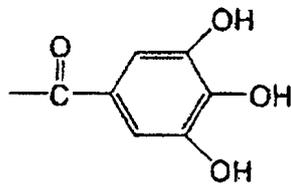
[Quím. 1]



Fórmula (I)

donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno independientemente H o un grupo representado por la Fórmula (A):

[Quím. 2]



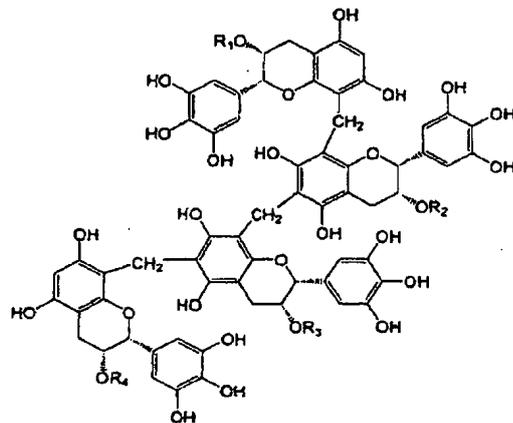
Fórmula (A)

5

o una sal del mismo;

2. El compuesto de acuerdo con el artículo 1 anterior, representado por la Fórmula (II):

[Quím. 3]



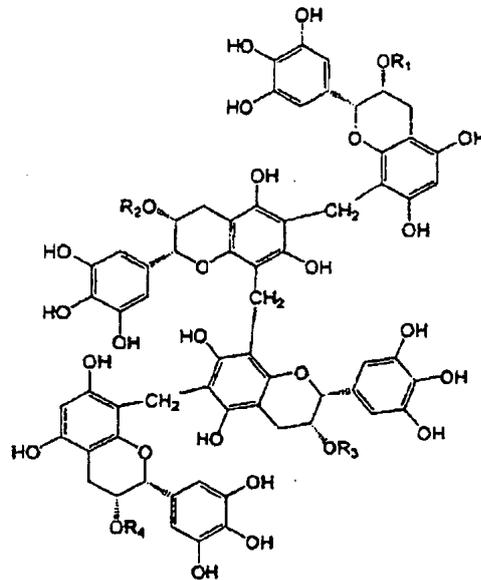
Fórmula (II)

10

donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son lo mismo como se define anteriormente o una sal del mismo;

3. El compuesto de acuerdo con el artículo 1 anterior, representado por la Fórmula (III):

[Quím. 4]

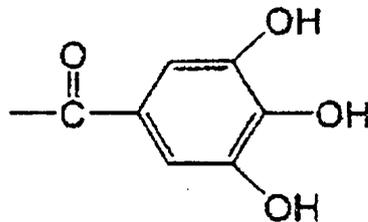


Fórmula (III)

donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son lo mismo como se define anteriormente o una sal del mismo;

- 5 4. El compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 3 anteriores, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son todos un grupo representado por la Fórmula (A):

[Quím. 5]



Fórmula (A)

o una sal del mismo;

- 10 5. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 4 para usar mejorando la función del endotelio vascular.
6. Un método para producir el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 4, incluyendo hacer reaccionar galato de epigalocatequina o epigalocatequina con formaldehído en presencia de un ácido.

15 Efectos ventajosos de la invención

Las bebidas o los suplementos para mejorar la función del endotelio vascular, por lo tanto para promover la salud pueden proporcionarse por tetrámeros de mezcla de la invención en alimentos y bebidas. Estos compuestos son altamente sabrosos, ya que el sabor no se daña incluso aunque se añadan a un alimento y a una bebida y son excelentes en la seguridad y por lo tanto pueden tomarse continuamente para mantener una función del endotelio vascular.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 muestra un espectro de RMN ¹H del compuesto 1.
La Figura 2 muestra un espectro de RMN ¹³C del compuesto 1.
La Figura 3 muestra un espectro de RMN ¹H del compuesto 2.
La Figura 4 muestra un espectro de RMN ¹³C del compuesto 2.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de eNOS.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de GTP-CH1.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de DDAH2.

5 La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión del gen de la subunidad Nox4 de la NADPH oxidasa.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de eNOS.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de GTP-CH1.

La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión de GTP-CH1.

10 La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de la expresión del gen de la subunidad Nox4 de la NADPH oxidasa.

Descripción de las realizaciones

15 La presente invención se refiere a un nuevo compuesto de tetrámero de EGCG en el que cuatro anillos cromano se unen por un grupo metileno y se representa por la Fórmula (I), un método para producir el compuesto de Fórmula (I) y un agente de mejora de la función del endotelio vascular. En el presente documento se desvela adicionalmente un alimento y una bebida y una composición farmacéutica que contiene el compuesto de Fórmula (I). La presente invención se describirá a continuación.

20 <Compuesto de tetrámero de EGCG>

Un compuesto de tetrámero de EGCG de la presente invención representado por la Fórmula (I) puede producirse como sigue.

25 El compuesto de Fórmula (I) en el que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno un grupo (grupo galato) representado por la Fórmula (A) puede producirse haciendo reaccionar (-)-epigallocatequin-3-O-galato con formaldehído en un disolvente en presencia de un ácido.

30 Los ejemplos del disolvente que puede usarse en la reacción incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol e isopropanol. La cantidad de uso de disolvente no se limita particularmente; sin embargo, por ejemplo, pueden usarse de 20 a 200 partes por masa de disolvente con respecto a 1 parte por masa de EGCG.

35 Los ejemplos del ácido que puede usarse en el presente documento incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico y ácido acético. La cantidad de uso de ácido no se limita particularmente; sin embargo, pueden usarse de 0,01 a 2 moles de ácido con respecto a 1 mol de EGCG.

La cantidad de formaldehído que puede usarse es, por ejemplo, de 1 a 100 moles con respecto a 1 mol de EGCG.

40 La temperatura y el tiempo de reacción pueden variar dependiendo de por ejemplo, la cantidad de disolvente a usarse; sin embargo, por ejemplo, la temperatura de reacción es de -10 a 50 °C y el tiempo de reacción es de 0,2 a 12 horas. Típicamente, la temperatura de reacción es la temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

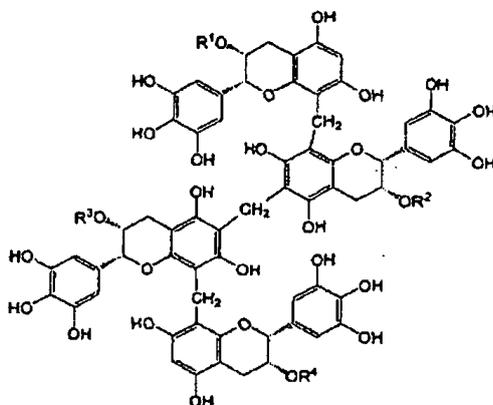
45 El compuesto de Fórmula (I) en el que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno H (átomo de hidrógeno) puede producirse haciendo reaccionar (-)-epigallocatequina en lugar de (-)-epigallocatequin-3-O-galato con formaldehído de la misma manera que anteriormente.

50 Nótese que cuando se usa (-)-epigallocatequin-3-O-galato o (-)-epigallocatequina en la reacción con formaldehído, en el compuesto resultante de Fórmula (I), un sustituyente en la posición 2 de cada anillo cromano y un sustituyente en la posición 3 del mismo forman una configuración relativa cis.

55 Se obtiene un producto tetramérico por la reacción entre (-)-epigallocatequin-3-O-galato o (-)-epigallocatequina y formaldehído generalmente como una mezcla de compuestos tetraméricos que contienen al menos dos de tres componentes representados por la Fórmula (II), la Fórmula (III) y la Fórmula (IV) diferentes en el esquema de acoplamiento de los anillos cromano por un grupo metileno. A partir de una mezcla tal, los compuestos de Fórmula (II), Fórmula (III) y Fórmula (IV) pueden aislarse cada uno usando un método de purificación conocido tal como cromatografía en columna abierta usando una resina de adsorción basada en estireno tal como HP-20 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation) y una resina basada en dextrano tal como Shephadex LH-20 y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

60

[Quím. 6]



Fórmula (IV)

El compuesto de Fórmula (I), donde de 1 a 4 de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son H, también puede producirse retirando por hidrólisis el grupo galato del compuesto de Fórmula (I) donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno un grupo galato. Tal hidrólisis se realiza por el uso de una solución acuosa de un compuesto básico tal como hidróxido sódico e hidróxido potásico o por el uso de una enzima hidrolítica tal como una enzima que tiene actividad tannasa.

En tal hidrólisis, 1, 2, 3 o 4 grupos galato se retiran del compuesto de Fórmula (I) donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son cada uno un grupo galato para proporcionar una mezcla de una pluralidad de compuestos. En este caso, los componentes individuales pueden aislarse de la mezcla por el uso de un método de purificación conocido tal como cromatografía en columna abierta usando una resina de adsorción basada en estireno tal como HP-20 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation) y una resina basada en dextrano tal como Shephadex LH-20 y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

La presente invención también se refiere a una sal del compuesto de Fórmula (I).

Una sal tal no se limita particularmente mientras que sea una sal que pueda formarse a partir de un compuesto de Fórmula (I); sin embargo, se prefiere una sal farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de la misma incluyen una sal metálica con un elemento metálico que pertenece a la primera o a la segunda familia de la tabla periódica, tal como una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de calcio y una sal de magnesio de un compuesto de Fórmula (I). Una sal metálica tal puede formarse con, por ejemplo, un grupo hidróxido de un compuesto de Fórmula 1 (un grupo hidróxido fenólico, un grupo hidróxido en el caso donde uno o todos de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son H).

Por ejemplo, en un disolvente no prótico, el compuesto de Fórmula (I) y el sodio metálico o el hidruro sódico se hacen reaccionar para convertir un grupo hidróxido (-OH) en un grupo alcóxido sódico (-ONa) para producir una sal sódica de un compuesto de Fórmula (I). Adicionalmente, todos los grupos hidróxido contenidos en el compuesto de Fórmula (I) pueden convertirse en grupos alcóxido sódico o solamente parte de los grupos hidróxido pueden convertirse en grupos alcóxido sódico controlando la cantidad de uso del sodio metálico o del hidruro sódico.

El compuesto de Fórmula (I) de la presente invención es un compuesto nuevo. Cuando los estudios se llevaron a cabo usando los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) producidos por los presentes inventores, como patrones, se encontró que los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) también están presentes en el té de oolong, como se describe después en los Ejemplos. Por lo tanto, los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) pueden aislarse del té usando *Camelia sinensis* como materia prima, preferentemente de té fermentado tal como té de oolong, té negro y té tostado por extracción y purificación.

El aislamiento de los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) a partir de estos té puede realizarse por, por ejemplo, cromatografía en columna de adsorción y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Agente de mejora de la función del endotelio vascular

Un compuesto de la presente invención ejerce una acción de mejora de la función del endotelio vascular.

Más específicamente, un compuesto de la presente invención ejerce una acción de mejora de la función del endotelio vascular potenciando la expresión del gen eNOS, potenciando la expresión del gen de CGP-CH1,

potenciando la expresión del gen de DDAH2 y/o reduciendo el gen de la NADPH oxidasa. La expresión del gen de eNOS, del gen de CGP-CH1, del gen de DDAH2 y del gen de la NADPH oxidasa puede evaluarse por un método conocido descrito en las referencias bibliográficas o por el método descrito en los Ejemplos a continuación.

5 Como se describe anteriormente, ya que un compuesto de la presente invención ejerce una acción de mejora del endotelio vascular, puede usarse como un agente de mejora de la función del endotelio vascular. Además, ya que un compuesto de la presente invención ejerce una acción de mejora de la función del endotelio vascular, si un compuesto de la presente invención se forma en una forma de dosificación adecuada para la ingesta por mamíferos tal como un humano mezclándolo en un alimento y en una bebida o preparándolo en una composición farmacéutica, la acción de mejora de la función endotelial puede ejercerse usando el alimento y la bebida o el producto farmacéutico en mamíferos.

15 Un compuesto de la presente invención puede añadirse a diversos tipos de alimentos y bebidas. Un alimento y una bebida al que ha de añadirse un compuesto de la presente invención no se limita particularmente. Un compuesto de la presente invención puede añadirse a diversos tipos de alimentos y bebidas disponibles convencionalmente. Los ejemplos de los alimentos y las bebidas incluyen bebidas tales como bebidas refrescantes, bebidas de té, medicinas tónicas líquidas, bebidas saludables, bebidas de nutrición, bebidas de deportes y bebidas carbonatadas (incluyendo soluciones madre concentradas y polvos preparativos de estas bebidas) y alimentos tales como gomas, caramelos, gelatinas, comprimidos, alimentos saludables, alimentos de nutrición y suplementos. Un compuesto de la presente invención puede añadirse de tal manera que la relación del compuesto de la presente invención en estos alimentos y bebidas se vuelva, por ejemplo, de 0,01 a 10000 ppm ($\mu\text{g/ml}$), preferentemente de 0,06 a 2000 ppm y más preferentemente de 0,1 a 1000 ppm.

25 Cuando un compuesto de la presente invención se usa como un fármaco medicinal, el fármaco medicinal puede proporcionarse en una forma de dosificación de polvo, grano, comprimido, cápsula, líquido e inyección. Un compuesto de la presente invención o una sal del mismo puede administrarse de forma oral directamente o diluyéndolo con agua o similares. De manera alternativa, se forma en una preparación con un vehículo conocido para un fármaco medicinal. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención o una sal del mismo pueden administrarse como una preparación líquida por vía oral tal como un agente de jarabe. De manera alternativa, si el compuesto de la presente invención o una sal del mismo se procesa en un extracto o un polvo y se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, puede proporcionarse como una preparación sólida por vía oral tal como un comprimido, una cápsula, un grano y un polvo. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen varios tipos de sustancias vehículo orgánicas o inorgánicas convencionalmente usados como material de preparación. El vehículo se mezcla como un excipiente, un lubricante, un agente de unión y un desintegrador en una preparación sólida y como por ejemplo, un disolvente, un excipiente, un agente de suspensión y un agente de unión en una preparación líquida. Además, si es necesario, también pueden usarse aditivos para una preparación tales como un agente antiséptico, un agente antioxidante, un agente colorante y un agente edulcorante.

40 Adicionalmente, una dosis eficaz del mismo puede determinarse apropiadamente dependiendo de la edad y del peso corporal de un paciente, el tipo y el significado de una enfermedad y la vía de administración.

Ejemplos

45 La presente invención se describirá más específicamente a modo de Ejemplos; sin embargo, la presente invención no se limita por estos.

[Ejemplo 1] Síntesis y aislamiento de los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III)

A. Síntesis y fraccionamiento por columna abierta:

50 Seis gramos (13 milimoles) de (-)-epigallocatequin-3-O-galato (EGCG) (Teavigo™ fabricado por Roche) se disolvió en 120 ml de solución de etanol (0,02 N, 2,4 milimoles en términos de HCl) y una solución de etanol formaldehído (180 ml) (4 % en masa, 240 milimoles en términos de formaldehído) se añadieron y se agitaron después a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de que se completara la reacción, la solución de reacción resultante se diluyó 10 veces con agua pura y se cargó en una columna CHP-20P de resina de adsorción (600 ml, 37-75 μm , fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation). Después de lavarse con agua (1200 ml), se realizó la elución secuencialmente con 900 ml de una solución de acetonitrilo acuosa al 25 % V/V y 1200 ml de una solución de acetonitrilo al 30 % V/V. La fracción eluida con la solución de acetonitrilo acuosa al 25 % V/V se separó en tres fracciones (fr. 1 a fr. 3) de 300 ml para cada una, mientras que la fracción eluida con la solución de acetonitrilo al 30 % V/V se separó en cuatro fracciones (fr. 4 a fr. 7) de 300 ml para cada una.

B. Condiciones de la HPLC preparativa:

65 Los productos fraccionados obtenidos por la purificación en columna CHP-20P se purificaron adicionalmente por HPLC preparativa en fase reversa.

<Condiciones>

Columna: Develosil ODS-HG-5 (5 cm ϕ x 50 cm, fabricada por Nomura Chemical Co., Ltd.)

Fase móvil A: TFA/H₂O al 0,05 % V/V (TFA: ácido trifluoroacético),

5 Fase móvil B: CH₃CN al 90 % V/V, TFA/H₂O al 0,05 % V/V,

Velocidad de caudal: 32 ml/min

Programa gradiente: A/B = 80/20 (30 minutos), A/B = 80/20→60/40 (100 minutos), A/B = 60/40 (30 minutos)

Detector: detector de adsorción de rayos UV/luz visible, SPD-6AV (fabricado por Shimadzu Corporation)

Longitud de onda de detección: A280 nm

10 Muestra: de fr. 2 a fr. 7 obtenidas por purificación en columna CHP-20P se disolvieron cada una en una solución de acetonitrilo acuosa al 20 % V/V y la cantidad total se cargó varias veces.

<Fracción>

15 En las condiciones de análisis anteriores, se recogieron los picos individuales que corresponden al tiempo de retención de 109 minutos (compuesto 1), 113 minutos (compuesto 2), 85 minutos (compuesto 3), 106 minutos (compuesto 4) y tiempo de retención de 104 minutos (compuesto 5) y tiempo de retención de 135 minutos (compuesto 6).

20 C. Análisis estructural del compuesto:

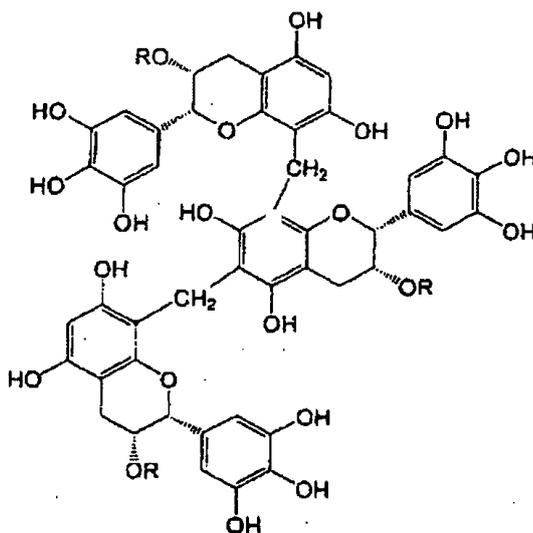
Los compuestos aislados por HPLC preparativa se sometieron a mediciones de EM y RMN.

25 Los EM de los compuestos 3 a 6 se midieron por Q-TOF Premier (fabricado por Micromass, RU) en un modo negativo, V. Como resultado, se observaron picos iónicos respectivamente en m/z 927,160, 927,163, 1397,248 y 927,161 [M-H]⁻. Además, los datos del espectro de RMN del compuesto 3 coincidieron con los datos del espectro de masas del homobisflavano-A de oolong descrito en la bibliografía (Chem. Pharm. Bull 37(12), 3255-3563 (1989)). Los datos del espectro de RMN del compuesto 4 coincidieron con los datos del espectro de RMN del homobisflavano-B de oolong descrito en la bibliografía (Chem. Pharm. Bull 37(12), 3255-3563 (1989)). Además, el

30 espectro de RMN del compuesto 5 coincidió con el espectro de RMN descrito en la Figura 4 y en la Figura 5 de la Publicación Internacional n° WO 2005/116005. El espectro de RMN del compuesto 6 coincidió con el espectro de RMN descrito en la Figura 2 y en la Figura 3 de la Publicación Internacional n° WO 2005/116005. A partir de estos resultados, el compuesto 3 se identificó como homobisflavano A de oolong, el compuesto 4 como homobisflavano-B de oolong, el compuesto 5 como el compuesto representado por la siguiente Fórmula (V) (donde R representa un grupo galato) y el compuesto 6 como homobisflavano-C de oolong.

35

[Quím. 7]



Fórmula V

40 El compuesto 1 y el compuesto 2 se sometieron a análisis estructural por los siguientes EM y RMN.

La medición de EM se realizó por Q-TOF Premier (fabricado por Micromass, RU) usando ESI equipado con una fuente de ion pulverizador Z como una fuente de iones, en un modo negativo, V. La corrección de masas se realizó por pulverización de bloqueo a un voltaje de cono: 45 V, voltaje de capilar: 3 kV y Temperatura de fuente: 80 °C, Temperatura de desolvatación 180 °C. Como referencia, se usó leucina encefalina (m/z 554,2615 [M-H]).

5 Como resultado, el compuesto 1 dio iones moleculares de m/z 1867,3112 [M-H]⁻ y divalente 933,1517 [M-2H]²⁻ y se calculó una fórmula molecular del mismo como C₉₁H₇₂O₄₄ (err.: -11,0 ppm); el compuesto 2 dio iones moleculares de m/z 1867,3100 [M-H]⁻ y divalente 933,1151 [M-2H]²⁻ y se calculó una fórmula molecular del mismo como C₉₁H₇₂O₄₄ (err.: -11,7 ppm). Uno de los compuestos se estima como un compuesto que tiene cuatro moléculas de EGCG
10 entrecruzadas con tres grupos metileno.

La RMN se midió en las siguientes condiciones. El compuesto 1 y el compuesto 2 se disolvieron cada uno en DMSO-d6 ((CD₃)₂SO) y se realizó la medición de RMN usando picos residuales de ¹H y ¹³C, es decir, δ2,50 y δ39,43, como el patrón interno. Los artículos de medición, que fueron RMN ¹H, RMN ¹³C, ¹H{¹³C}-HSQC, ¹H{¹³C} -
15 HMBC, TOCSY y DQF-COSY se midieron por un espectrómetro DMX-750 (BRUKER BIOSPIN, Alemania). Como resultado de la RMN, se elucidó que el compuesto 1 es un compuesto (Fórmula (II)) que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:8EGCG6:8EGCG6:8EGCG y el compuesto 2 es un compuesto (Fórmula (III)) que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:6EGCG8:8EGCG6:8EGCG. Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C del compuesto 1 se muestran en las Figuras 1 y 2 y los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C del compuesto 2 se muestran
20 en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

Compuesto 1:

25 Las señales de RMN ¹H (en DMSO-d6) observadas fueron δ 10,34, 9,37, 9,17, 9,09, 9,01, 8,88, 8,75, 8,71, 8,68, 8,08, 8,04, 7,62, 6,81, 6,77, 6,72, 6,55, 6,49, 6,39, 6,04, 5,86, 5,55, 5,47, 5,34, 5,23, 4,96, 4,79, 4,64, 4,04, 4,02, 3,92, 3,90, 3,85, 3,83, 3,73, 3,71, 3,64, 3,62, 3,54, 3,52, 3,07, 3,05, 2,96, 2,93, 2,74, 2,72, 2,70.

30 Las señales de RMN ¹³C observadas fueron δ 165,29, 165,13, 165,02, 165,01, 154,45, 154,44, 154,25, 152,33, 152,20, 151,97, 151,66, 151,62, 150,82, 150,66, 150,52, 149,66, 145,63, 145,56, 145,54, 145,50, 145,50, 145,27, 145,23, 145,18, 138,46, 138,38, 132,77, 132,26, 132,12, 128,50, 127,61, 119,20, 119,17, 118,96, 118,90, 108,73, 108,55, 107,05, 106,19, 105,19, 105,05, 104,31, 103,77, 99,01, 98,52, 77,44, 76,65, 76,51, 76,10, 67,53, 67,50, 66,95, 66,63, 25,94, 25,63, 25,49, 25,30, 17,14, 16,74, 15,81.

Compuesto 2:

35 Las señales de RMN ¹H (en DMSO-d6) observadas fueron δ 9,91, 9,25, 9,16, 8,09, 7,22, 6,81, 6,76, 6,74, 6,52, 5,94, 5,50, 5,38, 4,77, 4,52, 3,95, 3,95, 3,80, 3,54, 2,80, 2,74, 2,73, 2,67.

40 Las señales de RMN ¹³C observadas fueron δ 165,08, 165,01, 154,06, 152,83, 152,35, 151,45, 150,78, 150,26, 145,52, 145,52, 145,24, 145,18, 138,49, 138,44, 132,21, 132,10, 128,42, 127,63, 119,05, 118,95, 108,58, 108,46, 108,46, 106,95, 105,74, 104,92, 104,06, 98,32, 97,81, 76,59, 75,94, 66,69, 66,35, 26,33, 25,26, 16,72, 15,99.

45 Los rendimientos de los compuestos individuales obtenidos por la síntesis y la purificación anteriormente mencionadas son como sigue: compuesto 3 (homobisflavano A de oolong, 984 mg), compuesto 4 (homobisflavano-B de oolong, 374 mg), compuesto 5 (468 mg), compuesto 6 (homobisflavano-C de oolong, 33 mg), compuesto 1 (15 mg) y compuesto 2 (44 mg).

[Ejemplo 2] Estudio del efecto de mejora de la función del endotelio vascular usando células del endotelio vascular cultivadas

50 (A) Efecto de mejora de la función del endotelio vascular de la Fórmula (II) y de la Fórmula (III)

Con respecto a los compuestos de Fórmula (II) y de Fórmula (III) sintetizados y purificados en el Ejemplo 1, se estudió el efecto de ellos en la expresión de un gen involucrado en la función del endotelio vascular. Además, como
55 compuestos de comparación, un monómero de EGCG (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Ltd.), teaflavina, 3-O-galato de teaflavina, 3'-O-galato de teaflavina y 3,3'-O-digalato de teaflavina (fabricado por Nagara Science Co., Ltd), que se sabe que tienen una acción de mejora de la función del endotelio vascular.

60 Estos compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido esterilizado (DMSO, fabricado por Nacalai Tesque Inc.) para preparar una solución que tiene una concentración de 10 mM.

Estas soluciones se diluyeron 1000 veces usando un medio HuMedia-EG2 (fabricado por Kurabo Industries Ltd) para preparar una solución que tiene una concentración final de 10 μM (la concentración final del DMSO era 0,1 %
65 V/V). Estas soluciones de muestra se añadieron cada una a células del endotelio vascular umbilical humano (fabricadas por Kurabo Industries Ltd.) cultivadas en una placa de 6 pocillos en una proporción de 3 ml/pocillo e

incubadas a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5 % durante 8 horas.

Las células se recuperaron por ISOGEN (fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) y se extrajo el ARN de las células. Además, se purificó el ARN por RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Se sintetizó ADNc mediante un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (fabricado por Applied Biosystem) usando el ARN total (200 ng) purificado como un templado y se realizó una PCR cuantitativa. El análisis se realizó por el método comparativo Ct con un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa usado como un patrón interno. Se calculó la relación de cambio de expresión génica (relación con respecto al control) de una muestra de ensayo usando células sin tratar como un control.

Las tasas de cambio de expresión de genes individuales, es decir, EGCG, Fórmula (II)(OHBF-Tet1), Fórmula (III)(OHBF-Tet2), teaflavina (THF), 3-O-galato de teaflavina (THF3G), 3'-O-galato de teaflavina (THF3'G) y 3,3'-O-digalato de teaflavina (THFDiG) se muestran en las Figuras 5 a 8.

Los compuestos de Fórmula (II) y de Fórmula (III) potenciaron la expresión del gen de eNOS aproximadamente tres veces (Figura 5), la expresión del gen de GTP-CH1 aproximadamente 7 veces (Figura 6) y la expresión del gen de DDAH2 aproximadamente tres veces (Figura 7). Además, se muestra que la expresión del gen de la subunidad Nox4 de la NADPH oxidasa que produce oxígeno activo en las células del endotelio vascular y que reducen la función del endotelio vascular se reduce dramáticamente en presencia de los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) (Figura 8).

Por otro lado, se elucidó que el monómero de EGCG y las teaflavinas en las concentraciones investigadas en el presente documento no cambiaban sustancialmente la expresión de todos los genes y que el tetrámero de EGCG de la presente invención es eficaz a una concentración inferior que el monómero de EGCG y las teaflavinas.

(B) Efecto de mejora de la función del endotelio vascular de los polímeros de EGCG

Se investigó el efecto de un dímero y un trímero de EGCG en la expresión de genes relacionados con la función del endotelio vascular. De los polímeros de EGCG usados en la evaluación, la teasinesina (TSN)-A es la sintetizada de acuerdo con el artículo (Hashimoto, F. Nonaka, G. Nishioka, I. Chem. Pharm. Bull. 36 (5), 1676-1684 (1988)). El homobisflavano-A de oolong, el homobisflavano-B de oolong, el homobisflavano-C de oolong y el compuesto 5 usados en el presente documento se sintetizaron todos y se purificaron en el Ejemplo 1. La evaluación se realizó en el mismo método que en el anterior (A).

Las relaciones de cambio de expresión de los genes individuales de homobisflavano-A de oolong (OHBF-A), el homobisflavano-B de oolong (OHBF-B), el homobisflavano-C de oolong (OHBF-C), el compuesto 5 (OHBFTri-1) y la teasinesina-A (TSN-A) se muestran en las Figuras 9 a 12.

Como se muestra en las Figuras 9 a 12, los dímeros de EGCG, es decir, el homobisflavano-A de oolong, el homobisflavano-B de oolong, el homobisflavano-C de oolong, la teasinesina A y el trímero de EGCG, es decir, el compuesto 5, no cambiaron sustancialmente la expresión de ninguno de los genes en la misma concentración que en los compuestos de Fórmula (II) y Fórmula (III) investigados en el anterior (A).

A partir de los resultados anteriores, se encontró que el efecto de mejora de la función del endotelio vascular del tetrámero de EGCG de la presente invención es una función característica de un compuesto de la presente invención entre los polímeros de EGCG.

[Ejemplo 3] Condiciones de medida de LC-MS/MS y medida de té negro de oolong de Suntory

LC-MS/MS se midió por 4000 Q TRAP (fabricado por Applied) usando un pulverizador de iones turbo en un modo negativo en las siguientes condiciones: Energía de colisión: 46 eV (nega.), Voltaje del pulverizador de iones: 4500 V, Temperatura: 450 °C.

Como un canal de medida en MRM (Monitorización de reacción múltiple), se usó 933,16/168,90 (nega. divalente) para un compuesto de tetrámero de EGCG. La medida se realizó en las siguientes condiciones. El compuesto de Fórmula (III) se usó como una sustancia patrón.

Columna: Develosil C30-UG-3 (fabricada por Nomura Chemical Co., Ltd., 3 mm φ x 150 mm)

Velocidad de caudal: 0,3 ml/min

Temperatura de la columna: 40 °C

Fase móvil A: HCOOH/H₂O al 0,1 % V/V

Fase móvil B: HCOOH/CH₃CN al 0,1 % V/V

Programa gradiente: A/B = 91/9 (0 minutos) → A/B = 40/60

(17 minutos) → A/B = 15/85 (17,1 minutos) → A/B = 15/85 (de 17,1 minutos a 19 minutos)

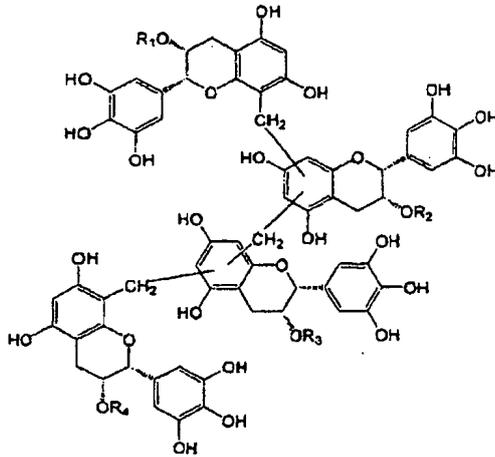
Usando las condiciones anteriores, se midió el té negro de oolong de Suntory.

5 La mezcla de té negro de oolong de Suntory (solución antes de esterilizar) se fraccionó paso a paso por una columna CHP-20P (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation) y se cuantificaron las fracciones. Las concentraciones de las fracciones individuales detectadas se añadieron y se definieron como la concentración en la mezcla. La concentración en la mezcla se obtuvo añadiendo las concentraciones de 4 componentes detectados como un tetramero de EGCG. Fueron 55 ng/ml en términos del compuesto de Fórmula (III).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula (I):

[Quím. 1]

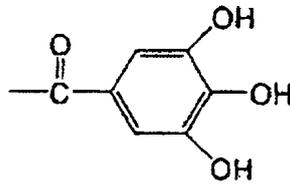


Fórmula (I)

5

donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno independientemente H o un grupo representado por la Fórmula (A):

[Quím. 2]



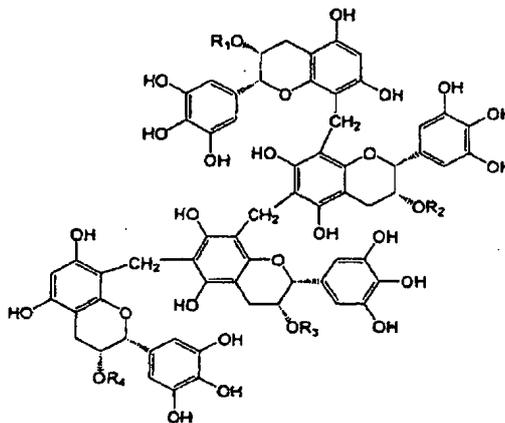
Fórmula (A)

10

o una sal del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, representado por la Fórmula (II):

[Quím. 3]



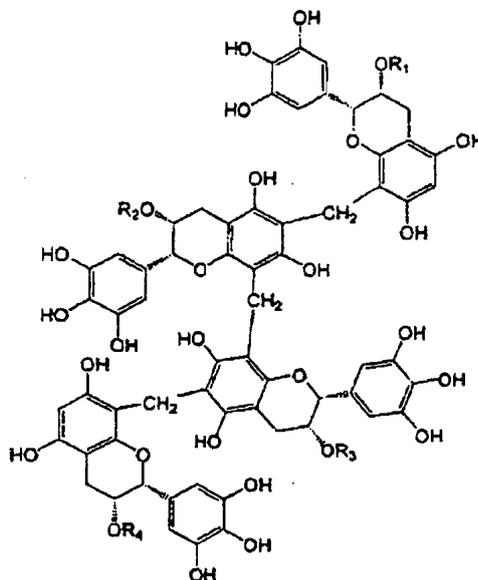
Fórmula (II)

15

donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son lo mismo como se define anteriormente o una sal del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, representado por la Fórmula (III):

[Quím. 4]

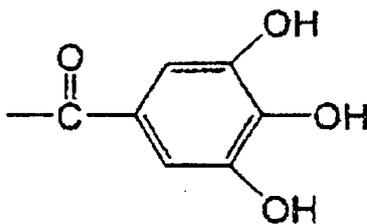


Fórmula (III)

donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son lo mismo como se define anteriormente o una sal del mismo.

4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son todos un grupo representado por la Fórmula (A):

[Quím. 5]



Fórmula (A)

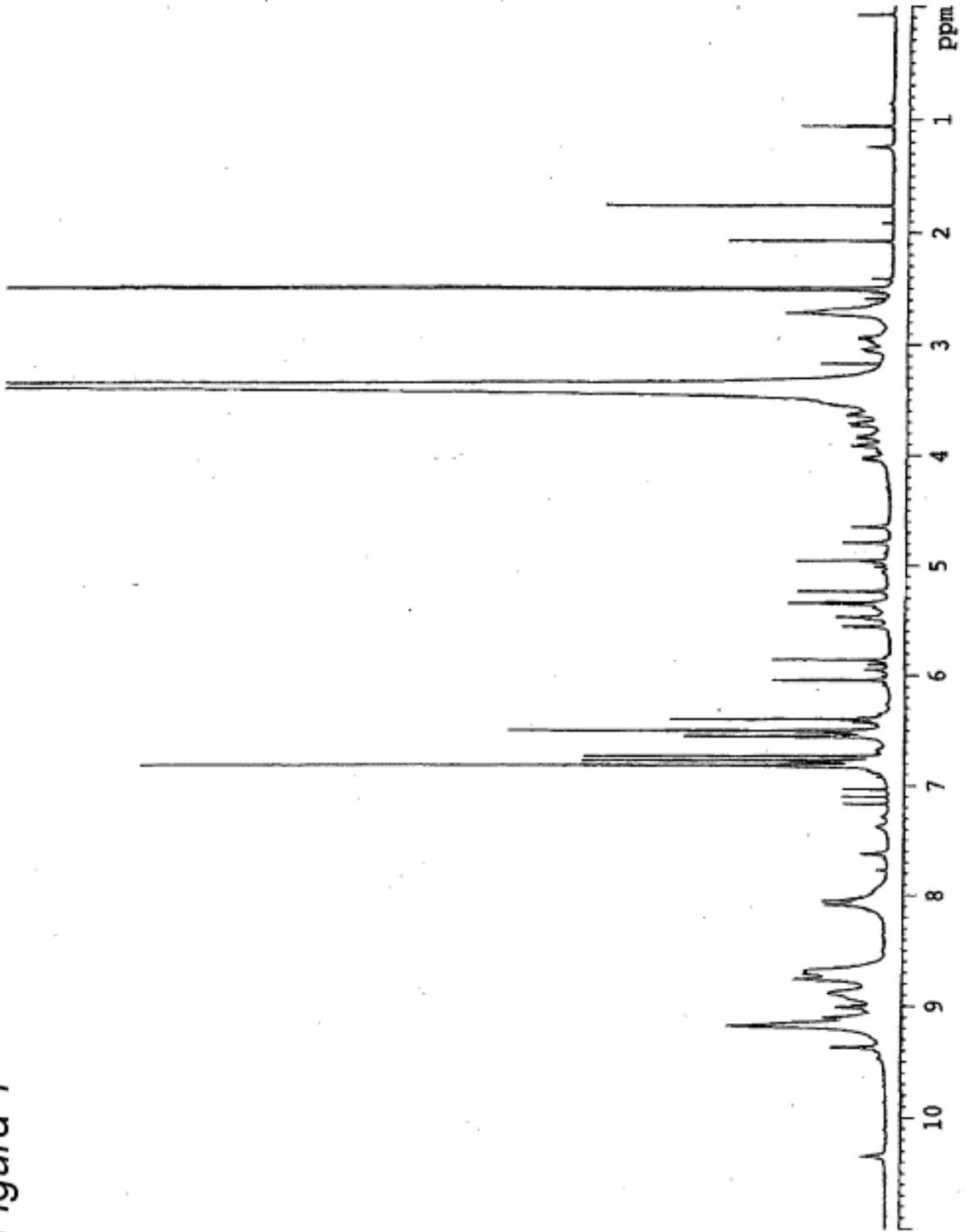
o una sal del mismo.

5. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar como un medicamento.

6. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar mejorando la función del endotelio vascular.

7. Un método para producir el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende hacer reaccionar galato de epigallocatequina o epigallocatequina con formaldehído en presencia de un ácido.

Figura 1



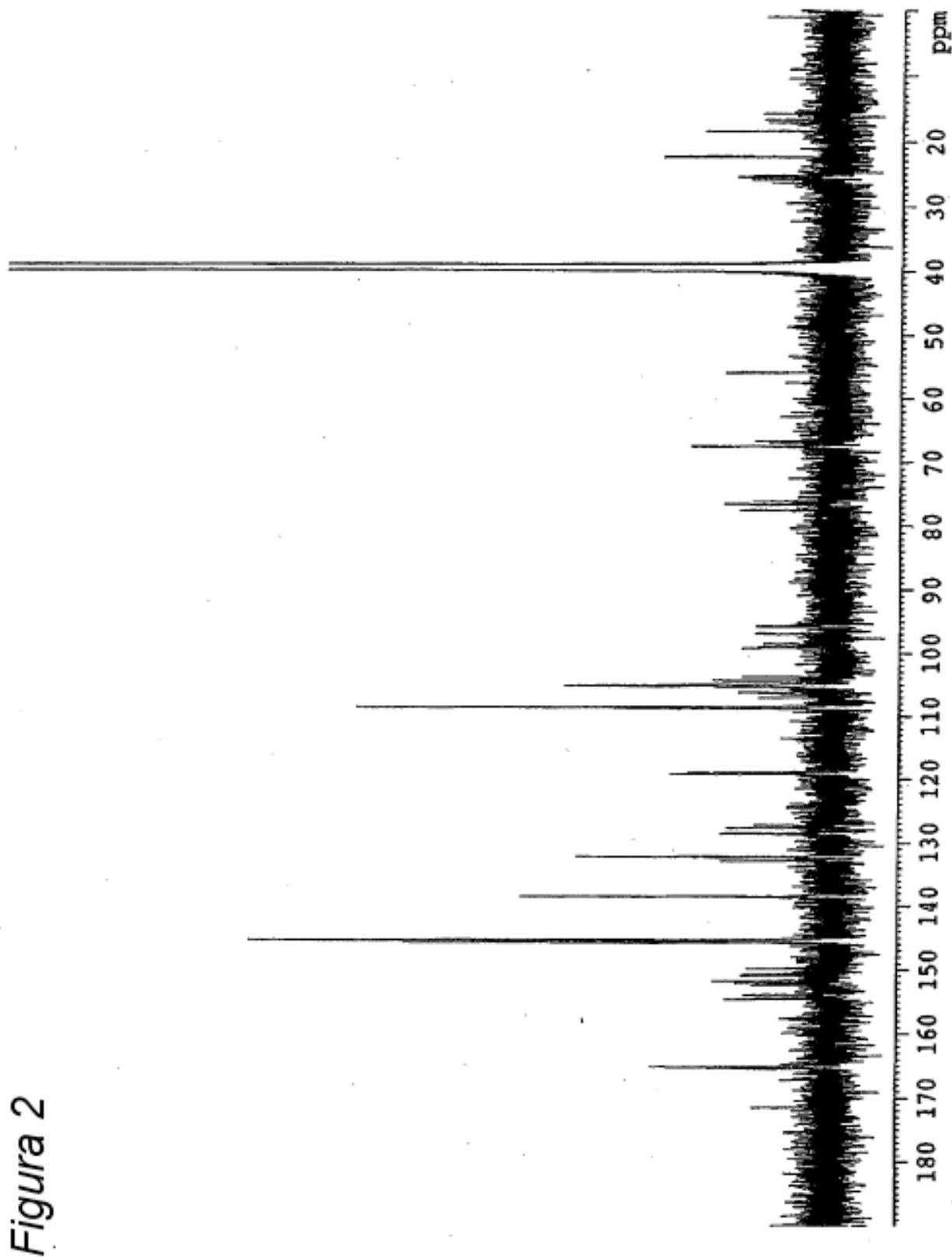
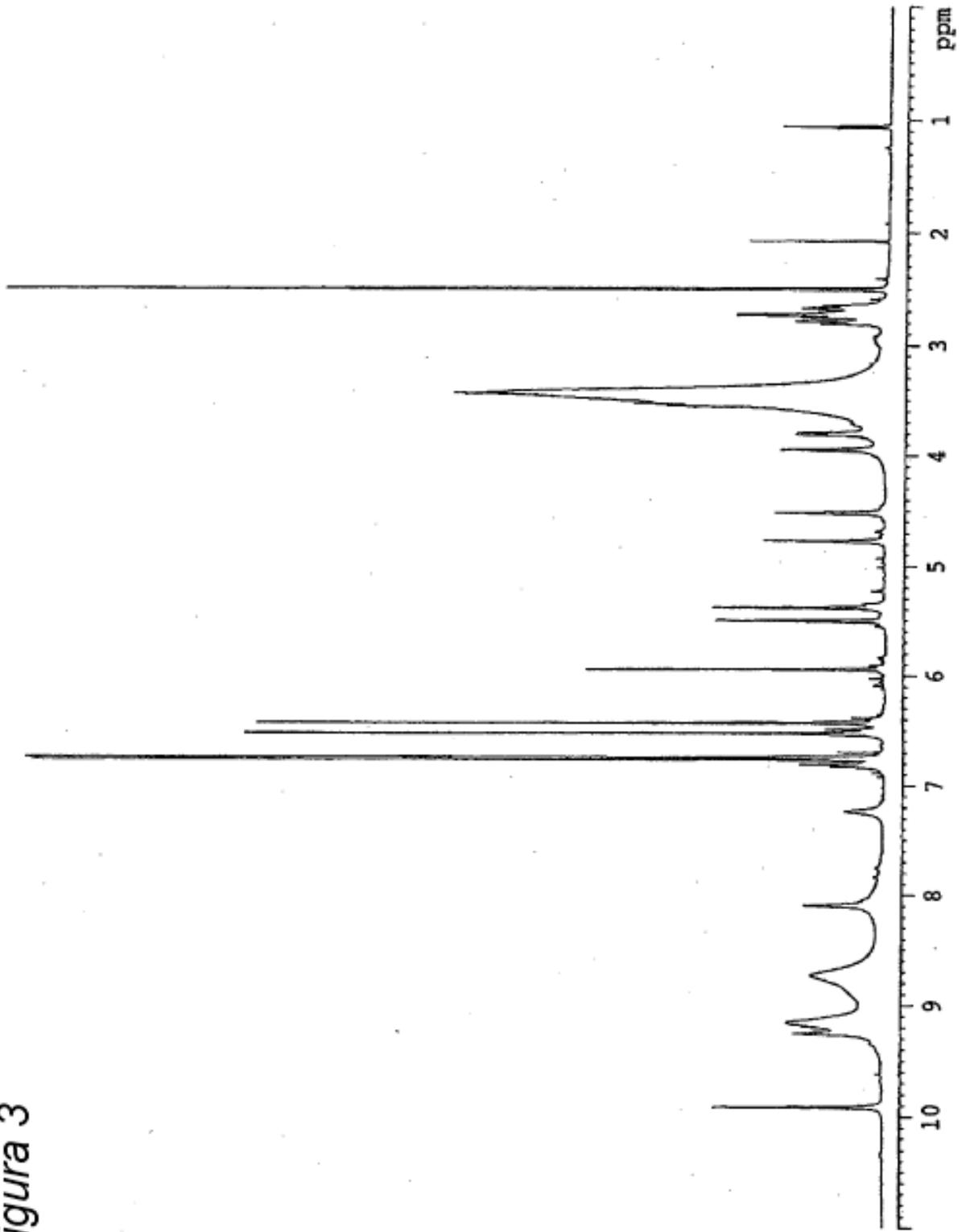


Figura 2

Figura 3



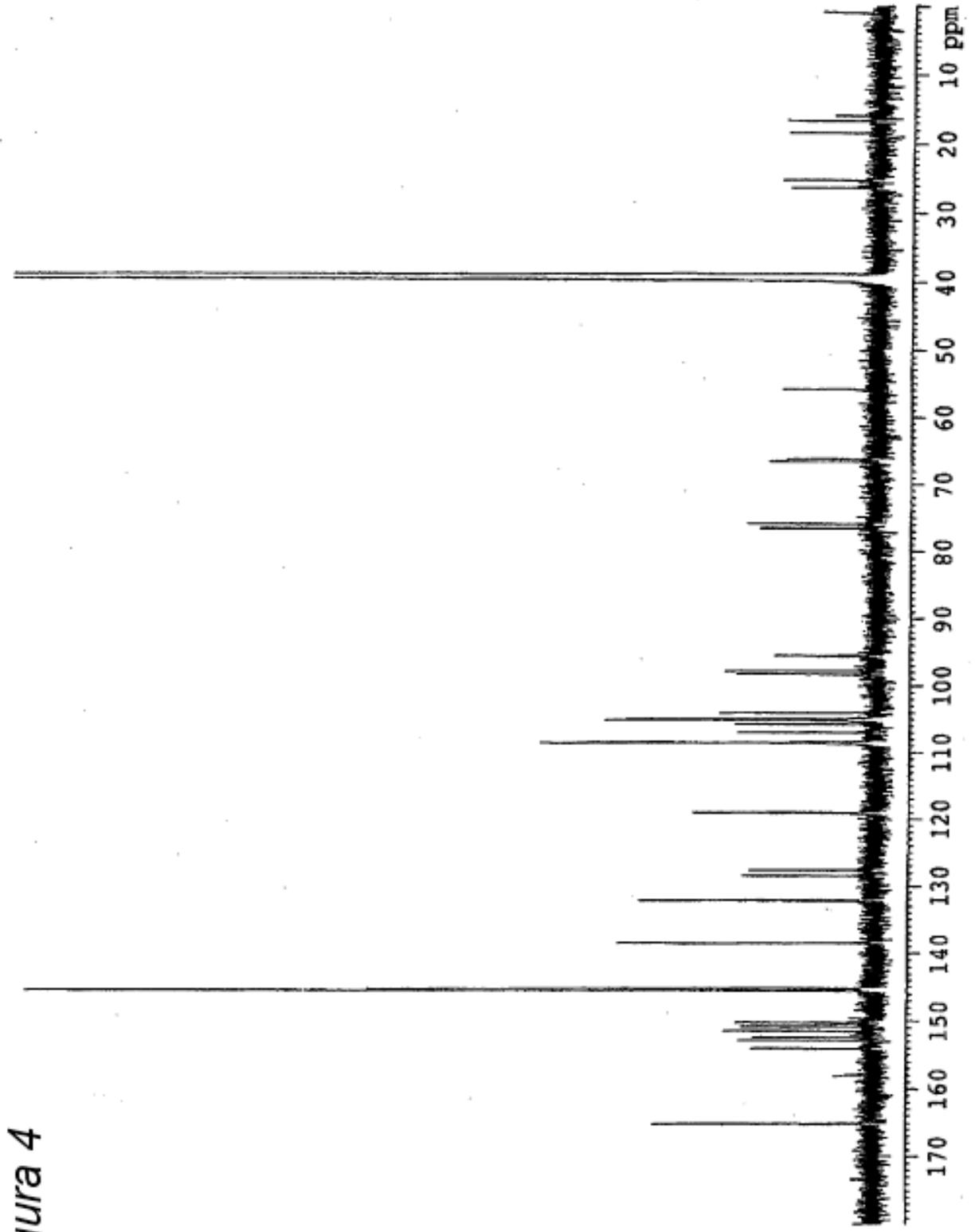


Figura 4

Figura 5

Expresión del gen de eNOS

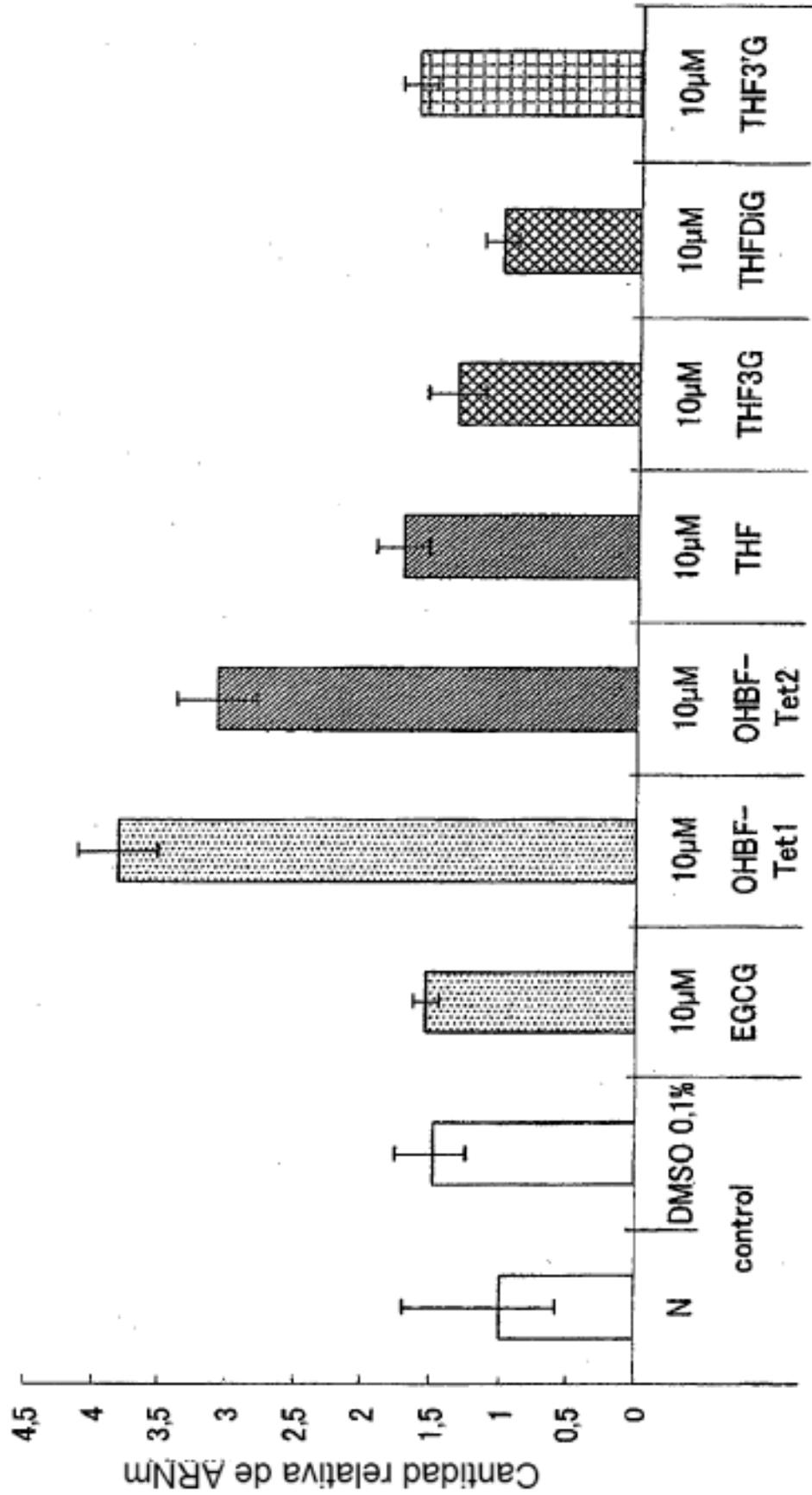


Figura 6

Expresión del gen de GTP-CH1

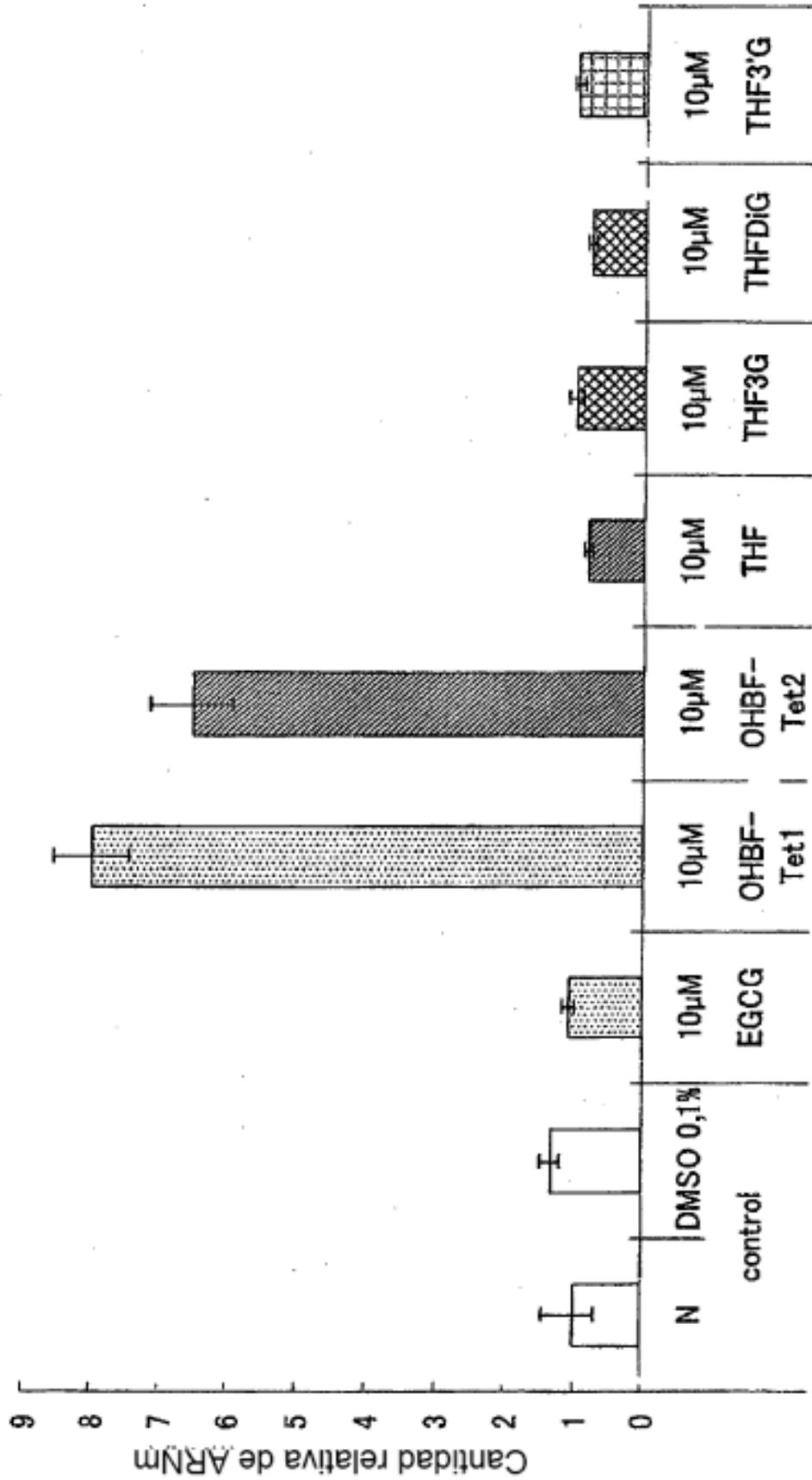


Figura 7

Expresión del gen de DDAH2

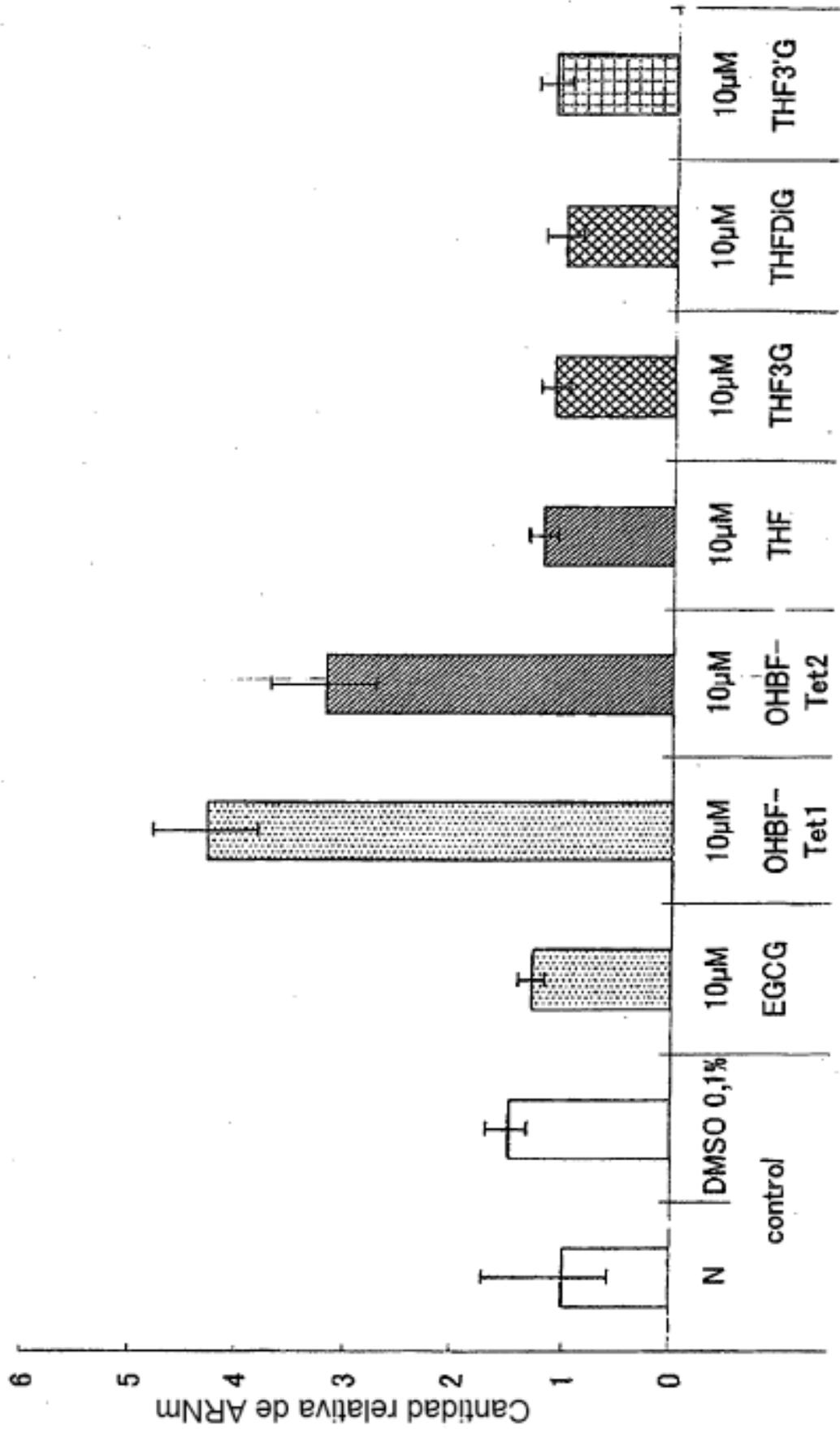


Figura 8

Expresión del gen de la NADPH oxidasa (subunidad Nox4)

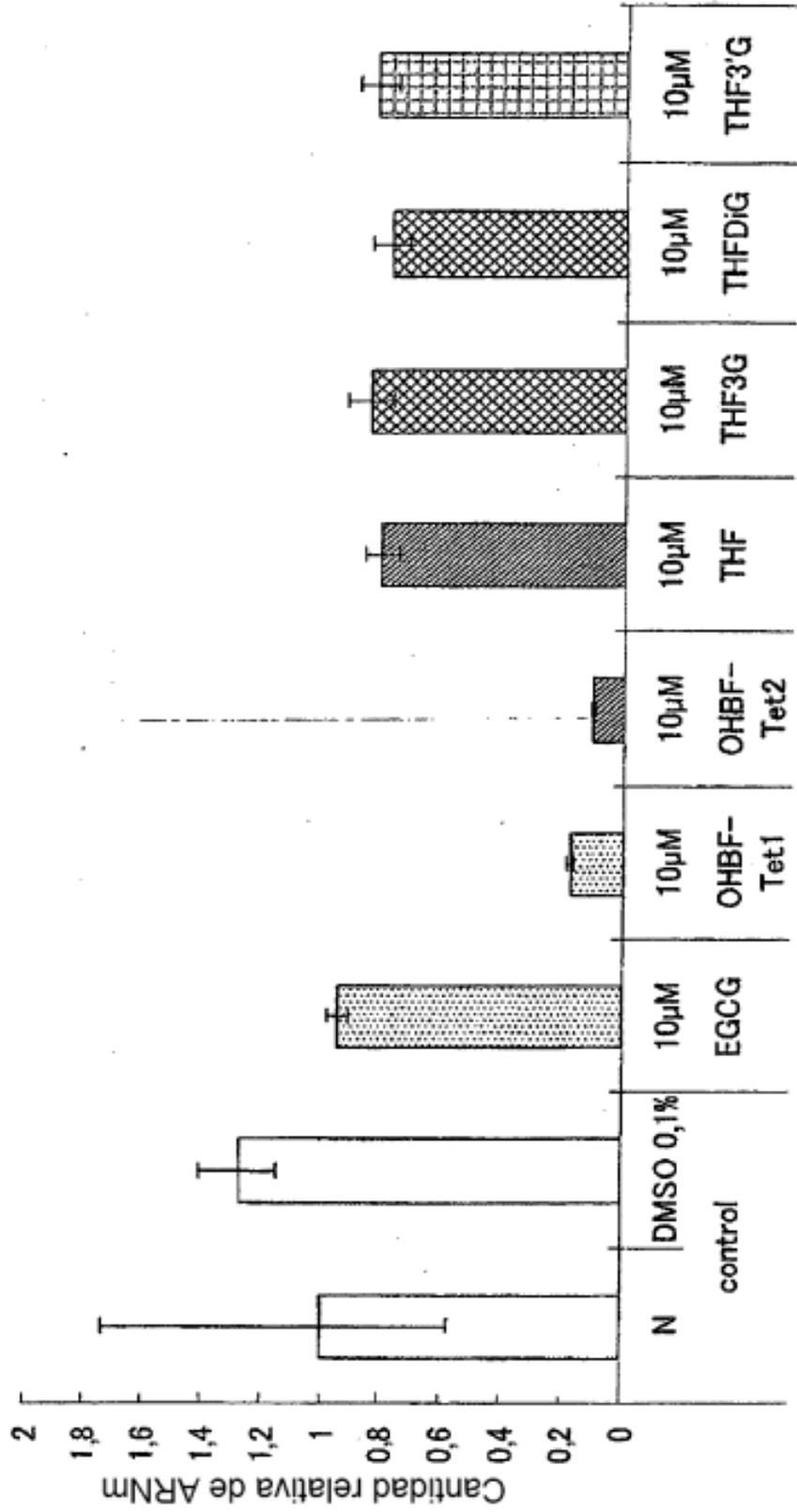


Figura 9

Expresión del gen de eNOS

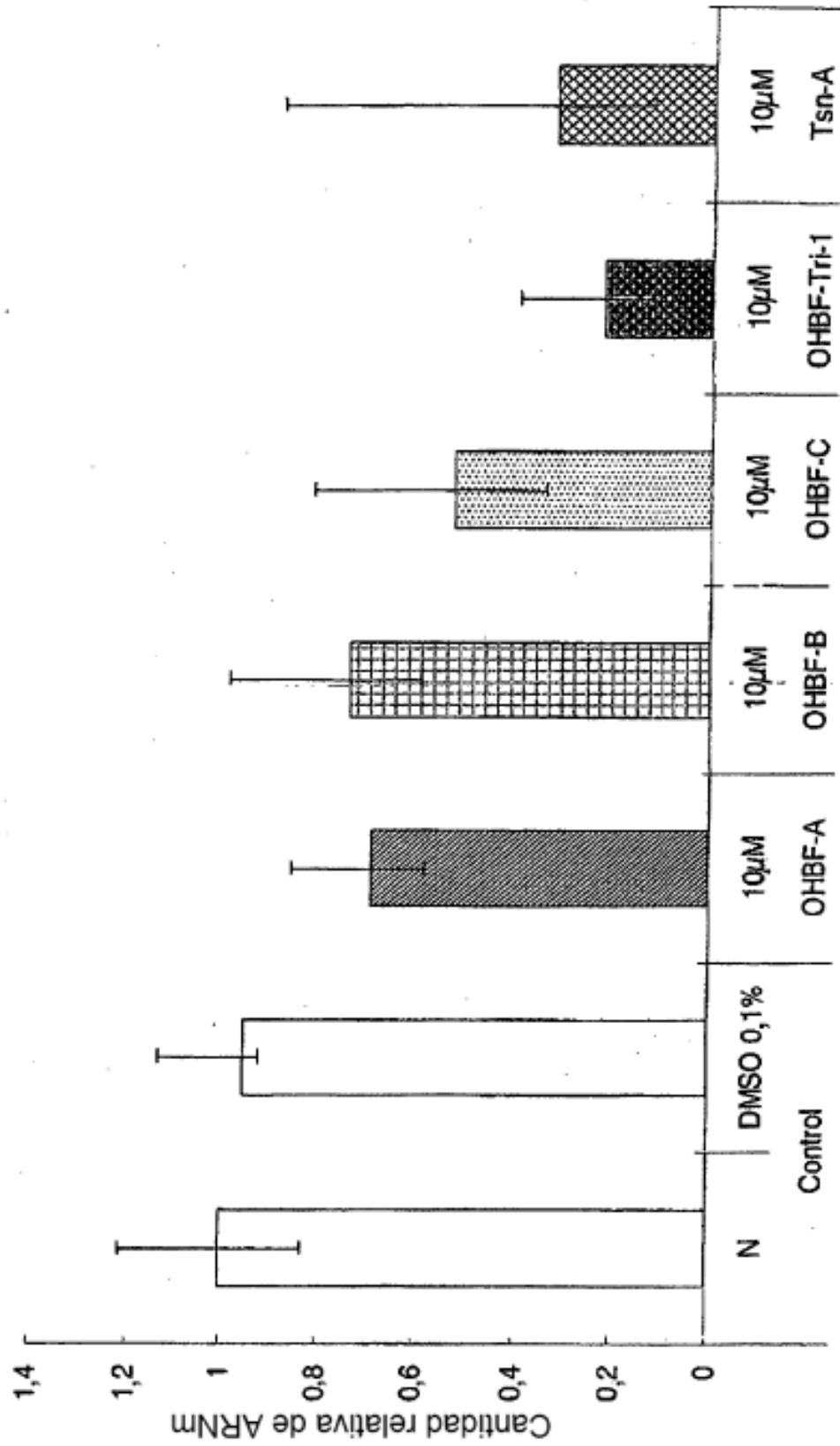


Figura 10

Expresión del gen de GTP-CH1

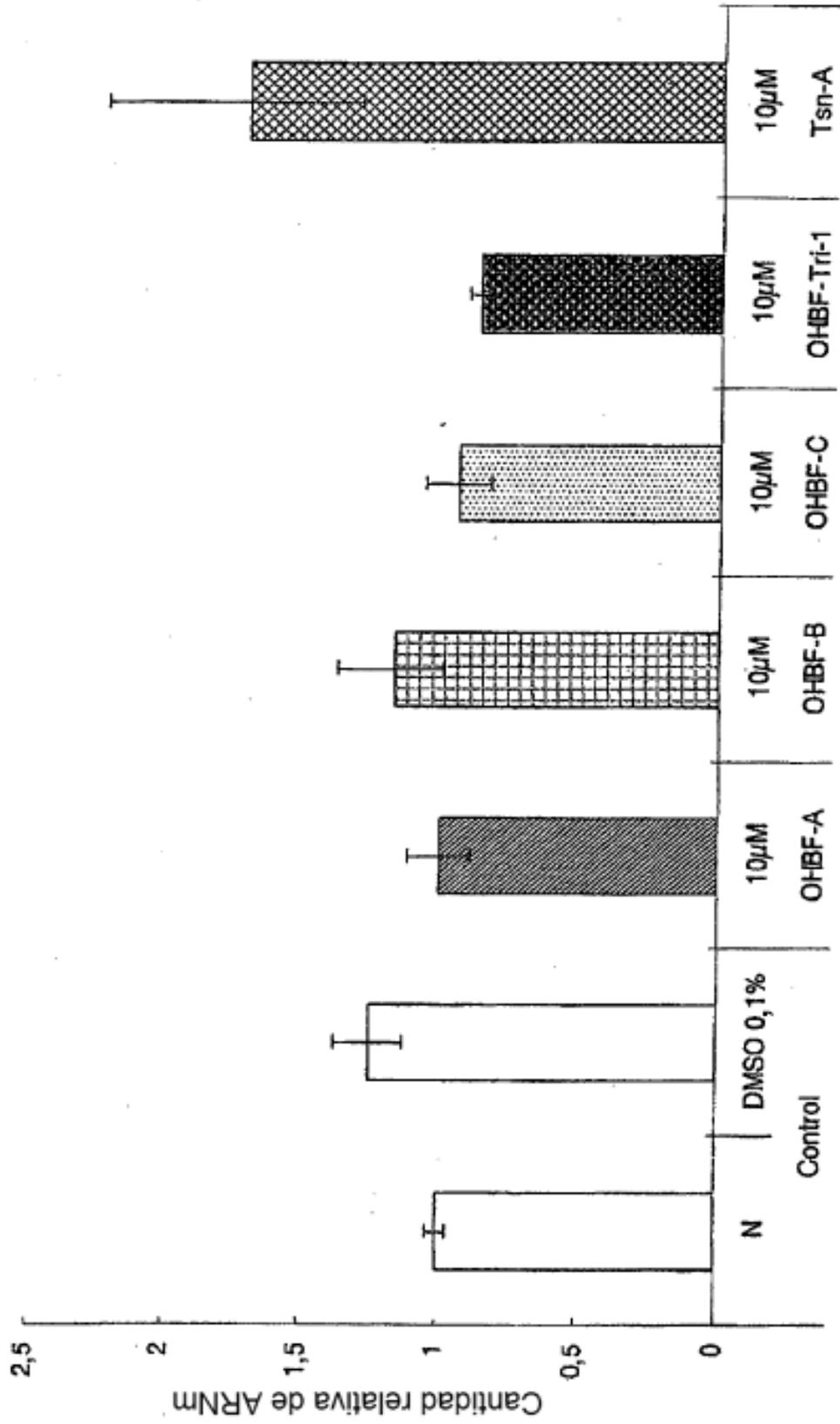


Figura 11

Expresión del gen de DDAH2

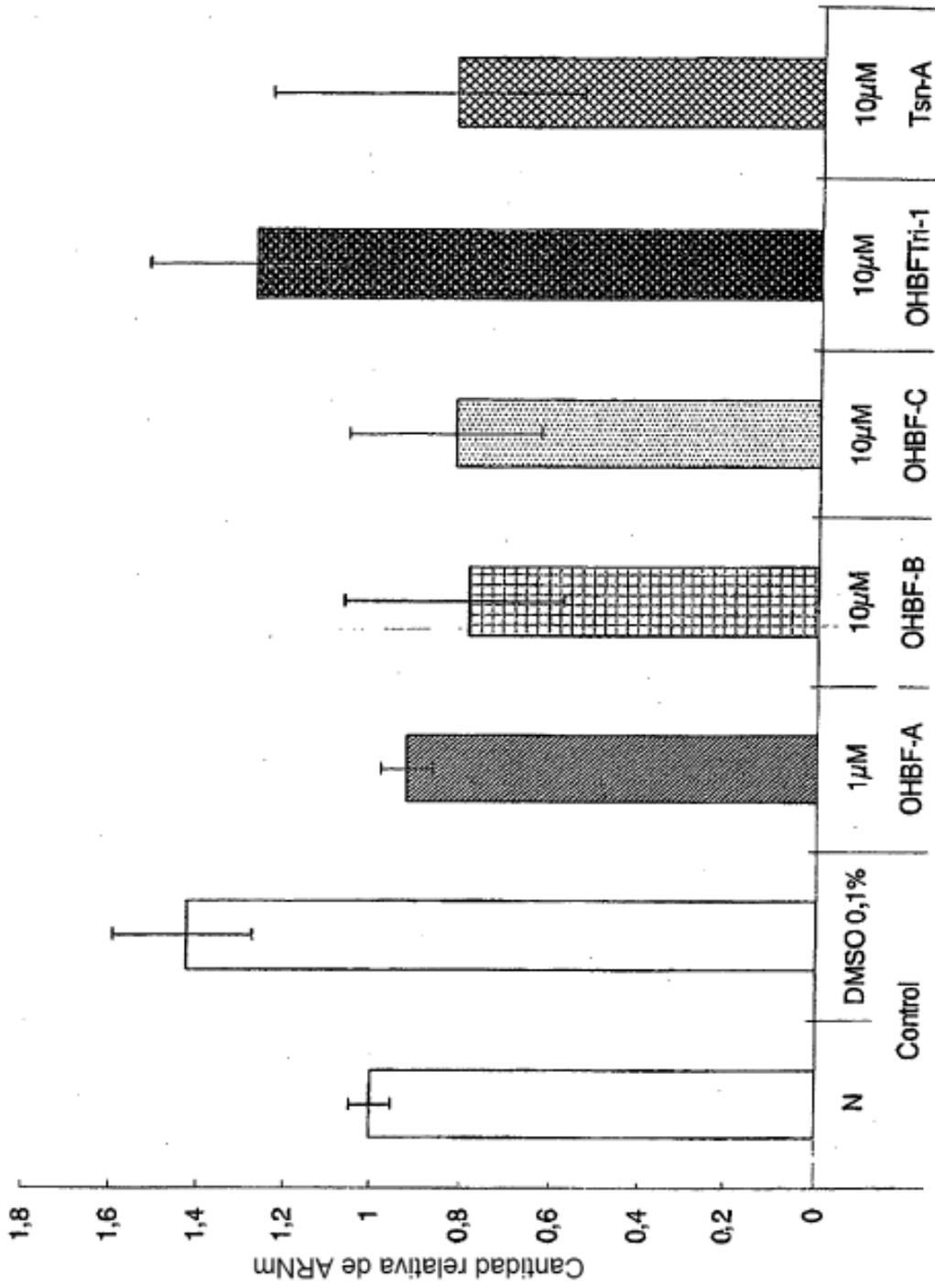


Figura 12 Expresión del gen de la NADPH oxidasa (subunidad Nox4)

