

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 525**

51 Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A23L 2/52 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2009 PCT/JP2009/064335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010 WO2010024138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009 E 09809791 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2330104**

54 Título: **Inhibidor de la glucosiltransferasa que contiene un polímero de galato de epigallocatequina como principio activo**

30 Prioridad:

29.08.2008 JP 2008222851

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

26.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FUKUI, YUKO;
NAKANO, MICHIO y
OOSHIMA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 619 525 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

Inhibidor de la glucosiltransferasa que contiene un polímero de galato de epigalocatequina como principio activo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un inhibidor de la glucosiltransferasa que contiene un polímero de galato de epigalocatequina como principio activo y a un alimento y una bebida en los que se añade el inhibidor.

10 **Antecedentes de la técnica**

Aunque se han propuesto diversas hipótesis en cuanto a la causa de la caries dental en el pasado, en la actualidad, la caries dental es reconocida como una enfermedad infecciosa bacteriana basándose en la teoría quimio-microbiana de Miller. De acuerdo con la teoría, el mecanismo de desarrollo de caries dental es el siguiente: la glucosiltransferasa (GTF), que es producida por estreptococos orales, en particular, *Streptococcus mutans* (en lo sucesivo en el presente documento denominado simplemente "*S. mutans*"), produce un polisacárido pegajoso e insoluble (glucano) a partir de la sacarosa de la boca como sustrato. Las células bacterianas de *S. mutans* se adhieren a una superficie del diente con la ayuda del glucano producido de este modo para formar la placa. En la placa, diversos microorganismos, incluyendo el *S. mutans*, viven juntos y se propagan. Se produce un ácido orgánico por el metabolismo de estos microorganismos, que actúa reduciendo el pH dentro de la placa y descalcifica la superficie del esmalte de los dientes. De esta manera, la caries dental se desarrolla y progresa. Además, se dice que la formación de placa es una causa no solo de la caries dental sino también de la enfermedad periodontal y del mal aliento.

25 Como se ha descrito anteriormente, puesto que la placa formada por los estreptococos orales, incluyendo principalmente al *S. mutans*, es una causa de caries dental, la supresión de la formación de placa puede ser, con el tiempo, un medio eficaz para prevenir el desarrollo de caries dental.

30 Recientemente, han atraído la atención las catequinas contenidas en las plantas, como sustancias que tienen una acción anticaries dental.

La Bibliografía de Patente 1 notifica que un polímero de flavonoides que tiene un peso molecular de 800 a 5000, producido mediante el tratamiento de un flavonoide (una catequina) con peroxidasa, tiene una acción inhibidora de la glucosiltransferasa más fuerte en comparación con antes del tratamiento.

35 La Bibliografía No de Patente 1 notifica que un polímero de flavonoides inhibe la actividad de la glucosiltransferasa derivada de *Streptococcus sobrinus* al 50 % en una cantidad de 2,5 µg/ml.

40 La Bibliografía de Patente 2 notifica que se descubrió que un polímero de flavonoides que tiene un peso molecular de 1000 a 10000 y se produce por la condensación de un producto reducido de una flavanona/flavanol o una leucocianidina con una catequina, tiene actividad inhibidora de la glucosiltransferasa.

45 Sin embargo, estos polímeros de flavonoides son una mezcla de un trímero a un pentámero de flavonoides o una mezcla de un dímero y un trímero de los mismos. Los compuestos contenidos en la mezcla todavía no se han aislado. Por tanto, la actividad inhibidora de la glucosiltransferasa de cada uno de los compuestos todavía no se ha dilucidado.

50 Se ha informado que, del té tomado a diario, una mezcla de catequinas derivadas del té no fermentado, es decir, del té verde, tiene una actividad inhibidora de la glucosiltransferasa (Bibliografía No de Patente 2). Sin embargo, también se ha notificado que no se obtuvo una acción anticaries dental suficiente en un ensayo con ratas.

55 Se ha notificado que el té semifermentado, es decir, el té oolong y sus productos purificados tienen actividad inhibidora de la glucosiltransferasa (Bibliografía de Patente 3, Bibliografía No de Patente 3, Bibliografía No de Patente 4 y Bibliografía No de Patente 5). También se sabe que la actividad inhibidora de la glucosiltransferasa se potencia mediante el tratamiento del té verde, el té oolong y el té negro con calor (Bibliografía de Patente 4) y que la actividad inhibidora de la glucosiltransferasa se potencia mediante el tratamiento de una catequina con calor (Bibliografía de Patente 5).

60 La Bibliografía de Patente 6 se refiere a un alimento o bebida que contiene un edulcorante en el que se suprime el dulzor que persiste como un regusto desagradable y que conserva un grado casi intacto de dulzor del edulcorante en su máximo. Esto se obtiene mediante la adición de un polifenol polimerizado, en particular, una catequina polimerizada, que es un polifenol polimerizado derivado del té, al alimento o bebida.

65 La Bibliografía de Patente 7 divulga la incorporación de dímeros (oolong homobisflavanos) o trímeros de epigalocatequina en los alimentos o bebidas. Como resultado, la absorción de la grasa derivada del alimento se suprime y se obtiene un efecto antioxidante. Los compuestos se producen haciendo reaccionar galato de

epigallocatequina con formaldehído en presencia de un ácido.

Como se divulga en la Bibliografía de Patente 8, la supresión de la absorción de la grasa derivada del alimento y la acción antioxidante se consiguen mediante la adición de un dímero (oolonghomobisflavano) o trímero de epigallocatequina a un alimento o bebida. Los compuestos se producen haciendo reaccionar galato de epigallocatequina con formaldehído en presencia de un ácido.

La Bibliografía de Patente 9 se refiere a un enjuague bucal cariostático para un lactante. El enjuague bucal es té de cebada que contiene (-)-galato de epigallocatequina a una concentración de 100-300 ppm y ácido ascórbico a una concentración de 100-400 ppm y que tiene un contenido de cafeína ajustado a ≤ 10 ppm.

La Bibliografía de Patente 10 divulga un polifenol de un fruto que tiene acciones fisiológicas, especialmente resistencia a la oxidación, actividad inhibidora de la ECA, acción antimutagénica, actividad inhibidora de la hialuronidasa, actividad inhibidora del aislamiento de la histamina, acción inhibidora sobre la actividad GTgsa, acción desodorante sobre un mal olor y acción inhibidora sobre la producción de una sustancia que tiene mal olor. El polifenol del fruto se prensa y/o se extrae a partir de un fruto inmaduro de un fruto que pertenece a la familia Rosaceae y está comprendido como principio activo en un antioxidante, un agente antihipertensivo, un agente antimutagenicidad, un inhibidor de la alergia, un agente cariostático y un desodorante.

Sin embargo, en cualquier caso, no se ha dilucidado qué compuesto de la mezcla derivada del té tiene la actividad.

Lista de citas

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTE

- BPT 1: Patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 6-247959
- BPT 2: Patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 7-242556
- BPT 3: Patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 6-279302
- BPT 4: Patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 3-284625
- BPT 5: Patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 3-284671
- BPT 6: Solicitud de patente europea EP 2 193 723 A1
- BPT 7: Solicitud de patente europea EP 1 754 702 A1
- BPT 8: Solicitud de patente japonesa JP 2005-336117 A
- BPT 9: Solicitud de patente japonesa JP 2004-244385 A
- BPT 10: Solicitud de patente japonesa JP 07-285876 A

BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTE

- BNP 1: *FEMS Microbiology Letters* 143 (1996) 35-40, Hamada S. et al.
- BNP 2: *Caries Res.* 25 (1991) 438-443, Otake S. et al.
- BNP 3: *Applied and Environmental Microbiology*, 59, N.º 4 (1993) 968-973, Nakahara K. et al.
- BNP 4: *The Nippon Dental review* N.º 622 (agosto de 1994) 179-189, Ooshima T. y Hamada S.
- BNP 5: *FEMS Microbiology Letters* 228 (2003) 73-80, Matsumoto M. et al.

Sumario de la invención

Problema técnico

Como se ha descrito anteriormente, ha habido informes acerca de extractos de plantas, etc. que tienen actividad inhibidora de la glucosiltransferasa. Sin embargo éstos solo informan de que una mezcla derivada de un extracto de la planta tiene la actividad; pero no informan claramente acerca de un principio activo específico (compuesto). Por tanto, se ha deseado identificar el principio activo. Además, en el caso en el que se utilice un inhibidor derivado de una planta de sabor poco agradable como alimento y bebida, el sabor y la seguridad se ven presumiblemente afectados. Por tanto, se ha deseado buscar un principio activo derivado de una planta de sabor muy agradable.

Solución al problema

Los presentes inventores se centraron en un componente contenido en el té tomado a diario y realizaron estudios exhaustivos teniendo en cuenta el uso como alimento y bebida. Como resultado, descubrieron que un polímero de EGCG obtenido mediante la polimerización de (-)-epigallocatequina-3-O-galato (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado EGCG), que es una catequina contenida en el té oolong, etc., en particular un trímero de EGCG, tiene una actividad inhibitoria de la glucosiltransferasa fuerte. Basándose en el descubrimiento, se logró la presente invención.

Más específicamente, la presente invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Efectos ventajosos de la invención

Los presentes inventores descubrieron que un polímero de (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), en particular un dímero y un trímero de EGCG predeterminados tienen una acción inhibitoria de la glucosiltransferasa alta. Como se ha descrito anteriormente, puesto que la glucosiltransferasa (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada GTF) produce glucano (una causa de la placa) en la boca, la caries dental puede prevenirse mediante la inhibición de la actividad de la GTF. Por tanto, el inhibidor de la GTF de la presente invención puede utilizarse como un agente anticaries dental. Además, puesto que el inhibidor de la GTF de la presente invención suprime la generación de glucano (una causa de la placa), también se espera el efecto de supresión del mal aliento. Además, puesto que el inhibidor de la GTF de la presente invención deriva del EGCG contenido en un alimento y una bebida tomados a diario tal como el té oolong, tiene una alta palatabilidad y una alta seguridad para el cuerpo humano. Además, mediante la adición de una cantidad predeterminada de inhibidor de la GTF a un alimento y una bebida, un alimento y una bebida que tienen una alta palatabilidad, la seguridad y la acción anticaries dental puede proporcionarse sin alterar excesivamente el sabor.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un espectro de RMN ^1H del compuesto 2.

La Figura 2 muestra un espectro de RMN ^{13}C del compuesto 2.

La Figura 3 muestra un espectro de RMN ^1H del compuesto 3.

La Figura 4 muestra un espectro de RMN ^{13}C del compuesto 3.

La Figura 5 muestra un espectro de RMN ^1H del compuesto 1.

La Figura 6 muestra un espectro de RMN ^{13}C del compuesto 1.

La Figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la acción inhibitoria de cada uno de los compuestos de dímeros y trímeros de EGCG sobre la glucosiltransferasa B.

La Figura 8 muestra los resultados de la evaluación de la acción inhibitoria de cada uno de los compuestos de dímeros y trímeros de EGCG sobre la glucosiltransferasa C.

La Figura 9 muestra los resultados de la evaluación de la acción inhibitoria de cada uno de los compuestos de dímeros y tetrámeros de EGCG sobre la glucosiltransferasa B.

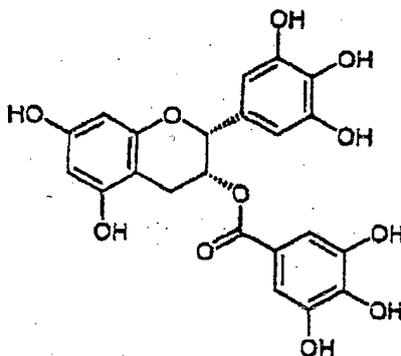
La Figura 10 muestra los resultados de la evaluación de la acción inhibitoria de cada uno de los compuestos de dímeros y tetrámeros de EGCG sobre la glucosiltransferasa C.

Descripción de las realizaciones

<Polímero de galato de epigallocatequina>

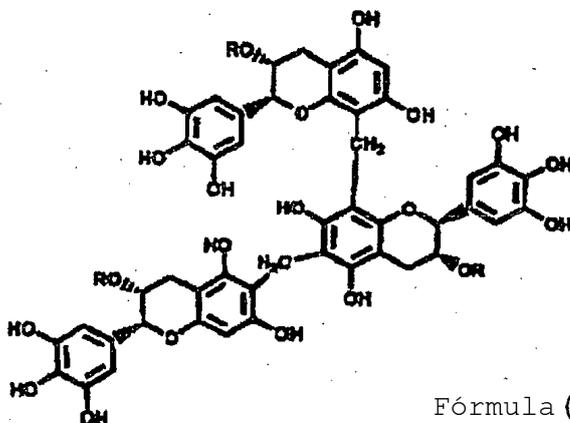
El (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) es un componente principal de una catequina contenida en el té verde, etc. y un compuesto que tiene una estructura representada por la siguiente Fórmula:

[Producto químico 6]



Un principio activo contenido en el inhibidor de la GTF de la presente invención es el polímero de EGCG mencionado anteriormente. En la presente invención, en particular, se utiliza un polímero de EGCG que tiene EGCG en el que 2 o 3 anillos de cromano están unidos en la posición 6 y/o 8 a través de un grupo metileno. Los polímeros de EGCG son trímeros de EGCG representados por las siguientes Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III):

[Producto químico 9]

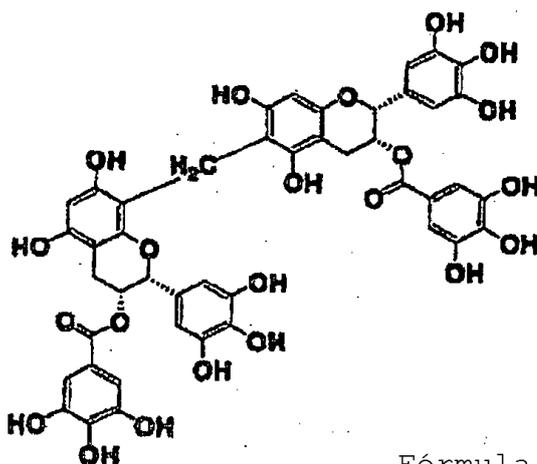


Fórmula (III)

donde R representa un grupo galoilo,
y un dímero de EGCG representado por la siguiente Fórmula (IV):

5

[Producto químico 10]



Fórmula (IV)

El compuesto de Fórmula (I) puede expresarse como EGCG8:8EGCG6:8EGCG basándose en el esquema de acoplamiento del EGCG (en lo sucesivo en el presente documento, en la memoria descriptiva, denominado oolong homobisflavano-trímero-1, OHBF-Tri-1 o Tri-1). De forma similar, el compuesto de Fórmula (II) puede expresarse como EGCG6:8EGCG6:8EGCG (en lo sucesivo en el presente documento, en la memoria descriptiva, denominado oolong homobisflavano-trímero-2, OHBF-Tri-2 o Tri-2). Además, el compuesto de Fórmula (III) puede expresarse como EGCG8:8EGCG6:6EGCG (en lo sucesivo en el presente documento, en la memoria descriptiva, denominado oolong homobisflavano-trímero-4, OHBF-Tri-4 o Tri-4). El compuesto de Fórmula (IV) puede expresarse como EGCG6:8EGCG. El compuesto de Fórmula (IV) se notifica como un compuesto contenido en el té oolong, etc. y es conocido como oolong homobisflavano-B (OHBF-B). Nótese que los compuestos de Fórmula (II) y (III) son compuestos nuevos.

Los polímeros de EGCG mencionados anteriormente pueden producirse cada uno haciendo reaccionar galato de epigalocatequina con formaldehído en un disolvente en presencia de un ácido.

Los ejemplos del disolvente que puede utilizarse en la reacción incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol e isopropanol. La cantidad de disolvente utilizada no está particularmente limitada; sin embargo, por ejemplo, pueden utilizarse de 20 a 200 partes en masa de disolvente con respecto a 1 parte en masa de galato de epigalocatequina.

25

Los ejemplos del ácido que puede utilizarse 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 ácido utilizada no está particularmente limitada; sin embargo, pueden utilizarse de 0,01 a 2 moles de ácido con respecto a 1 mol de galato de epigallocatequina.

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

10 La temperatura y el tiempo de reacción pueden variar dependiendo de, por ejemplo, la cantidad de disolvente que se utiliza; sin embargo, por ejemplo, la temperatura de reacción es de -10 a 50 °C y el tiempo de reacción es de 10 minutos a 12 horas. Normalmente, la temperatura de reacción es la temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

15 El producto obtenido mediante la reacción de EGCG con formaldehído es generalmente una mezcla que contiene al menos dos compuestos diferentes en el esquema de acoplamiento de los anillos de cromano por un grupo metileno. A partir de una mezcla de este tipo, pueden aislarse compuestos de las Fórmulas (I) a (IV) mediante el uso de un método de purificación conocido tal como la cromatografía en columna abierta utilizando una resina de adsorción a base de estireno tal como HP-20 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation) y una resina a base de dextrano tal como Shephadex LH-20 y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

20 Nótese que se describe un método de preparación para el compuesto de Fórmula (I) (OHBF-Tri-1) como un método de síntesis y de purificación para el "trímero (4)" en la Bibliografía de Patente (documento WO2005/116005). Además, se describe un método de preparación del compuesto de Fórmula (IV) (OHBF-B) en la bibliografía (*Chem. Pharm. Bull* 37 (12), 3255-3563 (1989)).

25 El polímero de EGCG que puede utilizarse como un inhibidor de la glucosiltransferasa de la presente invención puede estar en forma de una sal. Una sal de este tipo no está particularmente limitada a condición de que sea una sal farmacéuticamente aceptable o una sal aceptable como alimento. Los ejemplos de las mismas incluyen una sal con un elemento metálico que pertenezca a la primera o 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. Puede formarse una sal metálica de este tipo con, por ejemplo, un grupo hidróxido fenólico del EGCG.

30 Por ejemplo, puede producirse una sal de sodio de un trímero de EGCG haciendo reaccionar el trímero de EGCG y sodio metálico o hidruro de sodio en un disolvente no prótico para convertir un grupo hidróxido (-OH) contenido en el trímero de EGCG en un grupo alcóxido de sodio (-ONa). En ese momento, todos los grupos hidróxido contenidos en el trímero de EGCG pueden convertirse en grupos alcóxido de sodio y solo una parte de los grupos hidróxido pueden convertirse en grupos alcóxido de sodio mediante el control de la cantidad utilizada de sodio metálico o hidruro de sodio.

40 Estos polímeros de EGCG pueden obtenerse por síntesis; sin embargo, como se describe en el Ejemplo 5 a continuación, se descubrió que también está presente en el té oolong. Por tanto, el principio activo del inhibidor de la GTF de la presente invención, es decir, el polímero de EGCG, puede aislarse de las hojas de té utilizando las hojas de *Camellia sinensis* [A1] como materia prima, preferentemente a partir de té fermentado tal como el té oolong y el té negro y el té tostado, mediante extracción y purificación.

45 <Inhibidor de la GTF o agente anticaries dental que contiene polímero de EGCG como principio activo>

50 Los presentes inventores descubrieron que el compuesto de la Fórmula (I) anterior, es decir, el oolong homobisflavano-trímero-1, el compuesto de Fórmula (II), es decir, el oolong homobisflavano-trímero-2, el compuesto de Fórmula (III), es decir, el oolong homobisflavano-trímero-4 y el compuesto de Fórmula (IV), es decir, el oolong homobisflavano-B tienen una actividad inhibidora de la glucosiltransferasa alta.

55 La actividad inhibidora de la glucosiltransferasa puede medirse utilizando cualquiera de los métodos de evaluación descritos en las bibliografías de la técnica anterior expuestas en Antecedentes de la técnica. Por ejemplo, se añade glucosiltransferasa preparada a partir de *Streptococcus mutans* etc., a una solución acuosa que contiene sacarosa y se incuban a aproximadamente la misma temperatura (aproximadamente 37 °C) que en la cavidad oral durante menos de 24 horas, preferentemente de aproximadamente 16 a 20 horas para producir glucano enzimáticamente a partir de sacarosa. Puesto que el glucano es insoluble en agua, se mide la turbidez de la solución de reacción resultante (por ejemplo, la turbidez a una longitud de onda de 550 nm). De esta manera, el rendimiento del glucano puede evaluarse. Si el rendimiento del glucano es bajo (en otras palabras, la turbidez es baja), se dice que la actividad de la glucosiltransferasa está más inhibida que la del caso donde el rendimiento del glucano es grande (en otras palabras, la turbidez es alta).

60 Puesto que el inhibidor de la glucosiltransferasa de la presente invención inhibe la actividad de la glucosiltransferasa (GTF) para suprimir de este modo la producción de glucano (una causa de la formación de placa en la boca), éste puede utilizarse como un agente anticaries dental.

65

Puesto que el inhibidor de la glucosiltransferasa o agente anticaries dental de la presente invención deriva del EGCG contenido en un alimento y una bebida, tal como el té oolong, tomado a diario, tiene un sabor muy agradable y es muy seguro para el cuerpo humano.

5 <Alimento y bebida>

El inhibidor de la glucosiltransferasa o agente anticaries dental de la presente invención puede añadirse a diversos tipos de alimentos y bebidas para la prevención de la caries dental, tal como el picado dental. Los ejemplos de alimentos y bebidas a los que se va a añadir el inhibidor de la glucosiltransferasa o agente anticaries dental de la presente invención incluyen las bebidas tales como refrescos, bebidas de té; medicamentos tónicos líquidos, bebidas saludables, bebidas nutricionales, bebidas deportivas y bebidas carbonatadas (incluyendo soluciones madre concentradas y polvos de preparación de estas bebidas) y alimentos tales como gomas, caramelos, jaleas, comprimidos, alimentos saludables, alimentos y complementos nutricionales.

15 La cantidad de adición a un alimento y una bebida no está particularmente limitada a condición de que pueda obtenerse un efecto deseado y pueda determinarse apropiadamente en vista de, por ejemplo, el sabor, el color y el aroma de un alimento y una bebida. Por ejemplo, cuando se prepara una bebida anticaries dental, puede añadirse un polímero de EGCG a la bebida en una concentración de aproximadamente 0,01 a 1000 ppm. Además, cuando se añade un polímero de EGCG a un alimento sólido, el polímero de EGCG puede añadirse en aproximadamente de 20 0,01 a 5000 µg/g basándose en el peso del alimento sólido.

<Producto de higiene oral>

Puesto que el inhibidor de la glucosiltransferasa o agente anticaries dental de la presente invención inhibe la actividad de la glucosiltransferasa (GTF), suprimiendo de este modo la generación de glucano, (una causa de la formación de placa), puede utilizarse como un producto de higiene oral, por ejemplo, para la prevención del picado de los dientes y el mal aliento. Los ejemplos del producto de higiene oral de acuerdo con la presente invención incluyen una pasta dentífrica, un enjuague bucal y un trocisco. Estos productos de higiene oral pueden producirse utilizando un vehículo utilizado convencionalmente en la técnica mediante un proceso convencional. Los ejemplos del vehículo que puede utilizarse incluyen diversos tipos de sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas utilizadas convencionalmente como material de preparación. Además, si es necesario, pueden mezclarse aditivos para una preparación tales como un conservante, un agente antioxidante, un agente colorante y un agente edulcorante. La cantidad de adición de inhibidor de la GTF o agente anticaries dental de la presente invención a un producto de higiene oral puede determinarse apropiadamente dependiendo de, por ejemplo, la forma de un producto de higiene bucal; por ejemplo, puede añadirse un polímero de EGCG a un producto de higiene bucal con el fin de obtener una concentración de aproximadamente el 0,0001 al 10 % en peso.

La presente invención se describirá en más detalle por medio de Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada por éstos.

40

Ejemplo 1

Síntesis y purificación de polímero de EGCG

45 A. Síntesis y fraccionamiento mediante columna abierta:

Se disolvieron seis gramos de (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) (Teavigo (marca comercial registrada) fabricado por Roche) en 120 ml de etanol que contenía HCl 0,02 N y se añadió una solución en etanol de formaldehído al 4 % (180 ml) y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de la finalización de la reacción, la solución de reacción resultante se diluyó 10 veces con agua pura y se aplicó a una columna CHP-20P de resina de adsorción (600 ml, 37-75 mm, fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation). Después de que se lavara con agua (1200 ml), se realizó una elución secuencialmente con 900 ml de CH₃CN al 25 % y 1200 ml de CH₃CN al 30 %. La fracción de elución con CH₃CN al 25 % se separó en tres fracciones (de la fr. 1 a la fr. 3) de 300 ml para cada una, mientras que la fracción de elución con CH₃CN al 30 % se separó en cuatro fracciones (de la fr. 4 a la fr. 7) de 300 ml para cada una.

55

B. Condiciones de HPLC preparativa:

Los productos fraccionados obtenidos mediante la purificación en columna CHP-20P se purificaron adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa.

60

<Condiciones>

Columna: Develosil ODS-HG-5 (5 cm φ × 50 cm, fabricada por Nomura Chemical Co., Ltd.)
Fase móvil: A: 0,05 % de TFA/H₂O, B: 90 % de CH₃CN/0,05 % de TFA/H₂O
Caudal: 32 ml/min

65

Programa de gradiente: isocrático a 80 % a A/20 % de B (30 min), gradiente de 80 % de A/20 % de B a 60 % a A/40 % de B (100 min), isocrático a 60 % de A/40 % de B (20 min)

Detección: A 280 nm

5 Muestra: se disolvieron cada una de las fr. 2 a fr. 7, obtenidas por purificación en columna CHP-20P, en CH₃CN al 20 % y la cantidad total se aplicó en varias veces.

10 En las condiciones de fraccionamiento anteriores, se recogieron picos individuales correspondientes al tiempo de retención 113 minutos (compuesto 1), 120 minutos (compuesto 2), 130 minutos (compuesto 3) y al tiempo de retención 85 minutos (compuesto 4), el tiempo de retención 106 minutos (compuesto 5) y el tiempo de retención 104 minutos (compuesto 6).

C. Análisis estructural del compuesto:

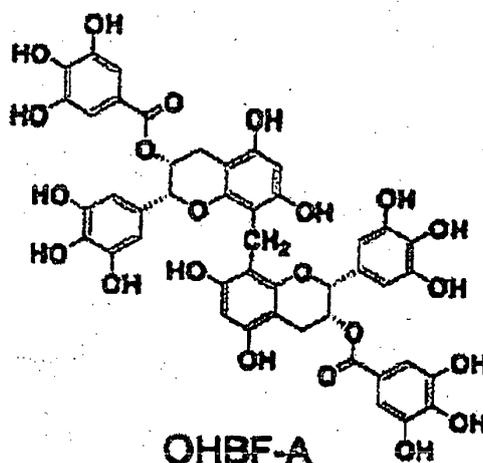
15 Los compuestos aislados mediante HPLC preparativa se sometieron a mediciones de EM y RMN. De ellas, la EM de los compuestos 4 a 6 se midió mediante Q-TOF Premier (fabricada por Micromass, Reino Unido) en un modo V negativo. Como resultado, se observaron picos de iones del mismo, respectivamente, a m/z 927,160, 927,163 y 1397,248 [MH]⁻. Además, los datos del espectro de RMN del compuesto 4 coincidieron con los datos del espectro de RMN del oolong homobisflavano-A descritos en la bibliografía (*Chem. Pharm. Bull* 37 (12), 3255-3563 (1989)). Los datos del espectro de RMN del compuesto 5 coincidieron con los datos del espectro de RMN del oolong homobisflavano-B descritos en la bibliografía (*Chem. Pharm. Bull* 37 (12), 3255-3563 (1989)). Además, a partir de los datos del espectro de RMN del compuesto 6, el compuesto 6 se identificó como el compuesto de Fórmula (I), a saber, oolong homobisflavano-trímero-1. A partir de estos resultados, se confirmó que el compuesto 4 es un dímero de EGCG que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:8EGCG, es decir, oolong homobisflavano-A (OHBF-A); el compuesto 5 es un dímero de EGCG que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG6:8EGCG, es decir, oolong homobisflavano-B (OHBF-B); y el compuesto 6 es un trímero de EGCG que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:8EGCG6:8EGCG, es decir, oolong homobisflavano-trímero-1 (en la presente solicitud, también denominado OHBF-Tri-1 o Tri-1). Nótese que el enlace entre los restos de EGCG expresado como 6:8 o 8:8 representa el estado donde el carbono de la posición 6 u 8 del anillo A de EGCG está reticulado con un homólogo a través de un grupo metileno intercalado entre ellos. Las fórmulas estructurales de los compuestos individuales se muestran a continuación.

20

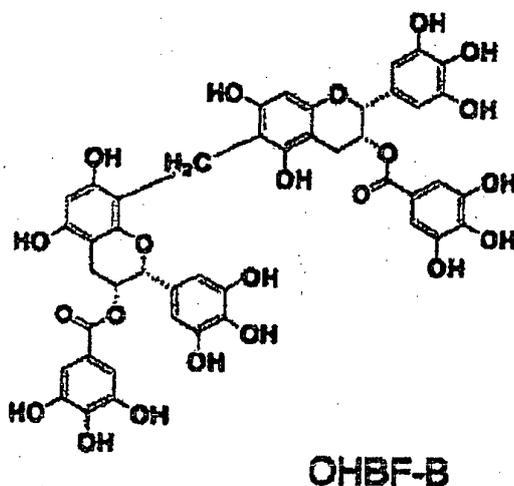
25

30

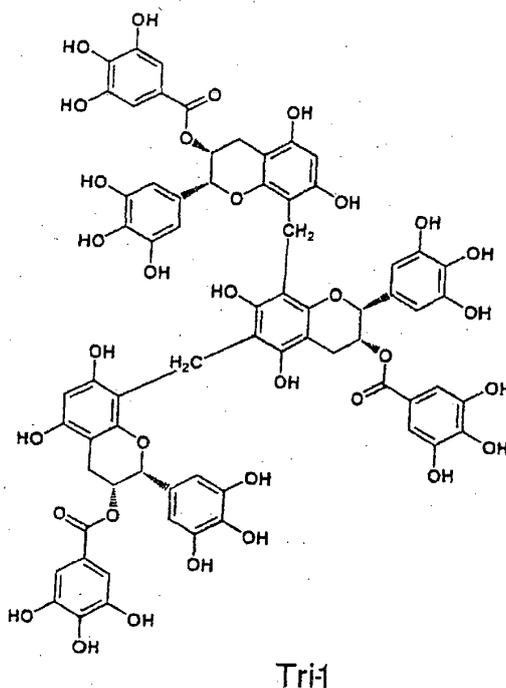
[Producto químico 11]



[Producto químico 12]



[Producto químico 13]



- 5 Con respecto al compuesto 1 al compuesto 3, el análisis estructural se realizó mediante EM y RMN. La EM se midió mediante Q-TOF Premier (fabricado por Micromass, RU) utilizando IEN equipado con una fuente de iones por nebulización Z como fuente de iones en un modo V negativo. Se realizó una corrección de la masa mediante nebulización por bloqueo a un voltaje de cono: 45 V, tensión capilar: 3 KV, temperatura de la fuente: 80 °C y temperatura de desolvatación: 180 °C. Como referencia se utilizó leucina encefalina (m/z 554,2615 [MH]⁺).
- 10 Como resultado, el compuesto 2 proporcionó iones moleculares de m/z 1397,2479 [M-H]⁻ y una fórmula molecular del mismo se calculó como C₆₈H₅₄O₃₃ (err.: 0,7 ppm); y el compuesto 3 proporcionó iones moleculares de m/z 1397,2509 [M-H]⁻ y una fórmula molecular del mismo se calculó como C₆₈H₅₄O₃₃ (err.: 2,9 ppm). Se estimaron como sustancias que tenían tres moléculas de EGCG reticuladas con dos grupos metileno. Además, el compuesto 1
- 15 proporcionó iones moleculares de m/z 1867,3100 [M-H]⁻ y 933,1151 [M-2H]²⁻ divalente y una fórmula molecular del mismo se calculó como C₉₁H₇₂O₄₄ (err.: -11,7 ppm) y se estimó como una sustancia que tenía cuatro moléculas de EGCG reticuladas con tres grupos metileno.

La RMN se midió disolviendo el compuesto 2 en CD₃OH y el compuesto 3 en DMSO-d₆ ((CD₃)₂SO). Se utilizaron picos residuales de un protón de CD₃OH y ¹³C, es decir, δ 3,30 y δ 48, 97 como los patrones internos del compuesto 2. Se utilizaron el pico residual de ¹H de DMSO-d₆, es decir, δ 2,50 y el de ¹³C, es decir, δ 39,43 como los patrones internos del compuesto 3. Los artículos de medición, que eran RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC-¹H{¹³C}, HMBC-¹H{¹³C}, TOCSY y DQF-COSY, se midieron mediante el espectrómetro DMX-750 (BRUKER BIOSPIN, Alemania). Como resultado de la RMN, se dilucidó que el compuesto 2 es el compuesto de Fórmula (II) anterior (más específicamente, oolong homobisflavano-trímero-2 y también denominado en el presente documento OHBF-Tri-2 o Tri-2) que tiene una esquema de acoplamiento de EGCG6:8EGCG6:8EGCG; y que el compuesto 3 es el compuesto de Fórmula (III) anterior (más específicamente, oolong homobisflavano-trímero-4 y también denominado en el presente documento OHBF-Tri-4 o Tri-4) que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:8EGCG6:6EGCG. Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C de los compuestos 2 y 3 se muestran en las Figuras 1 a 4.

Compuesto 2:

Con respecto al oolong homobisflavano-trímero-2 (en CD₃OH), las señales de RMN ¹H observadas fueron δ 6,95, 6,92, 6,90, 6,60, 6,54, 6,44, 6,08, 6,02, 5,57, 5,55, 5,49, 5,18, 5,12, 4,91, 3,86, 3,83, 3,81, 3,76, 3,03, 3,01, 2,94, 2,89, 2,89, 2,82 y las señales de RMN ¹³C observados fueron δ 167,72, 167,46, 167,37, 156,29, 155,25, 155,08, 154,79, 154,43, 153,64, 152,91, 151,64, 151,20, 147,00, 146,93, 146,38, 146,38, 146,34, 146,29, 140,03, 139,89, 139,89, 134,65, 134,48, 133,85, 130,64, 129,29, 129,10, 121,33, 121,14, 121,14, 110,31, 110,24, 110,24, 109,19, 108,07, 107,42, 107,05, 107,02, 106,79, 106,10, 101,59, 101,00, 100,45, 97,23, 96,71, 80,07, 79,94, 78,45, 70,00, 69,32, 69,28, 27,21, 27,21, 26,81, 17,91, 17,91.

Compuesto 3:

Con respecto al oolong homobisflavano-trímero-4 (en DMSO-d₆) las señales de RMN ¹H observadas fueron δ 10,46, 9,18, 9,16, 9,16, 9,12, 9,06, 9,05, 8,90, 8,88, 8,84, 8,72, 8,69, 8,69, 8,46, 8,34, 8,05, 8,02, 8,00, 6,81, 6,78, 6,78, 6,52, 6,47, 6,35, 6,03, 5,93, 5,48, 5,46, 5,39, 5,04, 4,95, 4,89, 4,05, 3,95, 3,56, 3,56, 3,06, 3,00, 2,98, 2,76, 2,71, 2,67 y las señales de RMN ¹³C observadas fueron δ 165,11, 165,09, 164,99, 157,66, 154,29, 153,82, 153,48, 153,07, 152,68, 152,23, 152,18, 150,88, 145,56, 145,52, 145,50, 145,26, 145,24, 145,23, 138,43, 138,43, 138,39, 132,34, 132,23, 132,19, 128,34, 128,34, 128,23, 119,17, 119,12, 119,04, 110,35, 110,31, 110,29, 109,19, 108,59, 108,56, 108,51, 106,97, 106,63, 105,26, 105,26, 105,13, 104,73, 101,28, 99,44, 99,41, 98,21, 97,34, 97,15, 96,03, 79,48, 79,07, 78,47, 69,95, 69,39, 69,28, 27,18, 26,98, 26,58, 18,16, 17,13.

Además, el compuesto 1 se disolvió en DMSO-d₆ y se sometió a medición de RMN utilizando picos residuales de ¹H y ¹³C, es decir, δ 2,50 y δ 39,43, como los patrones internos.

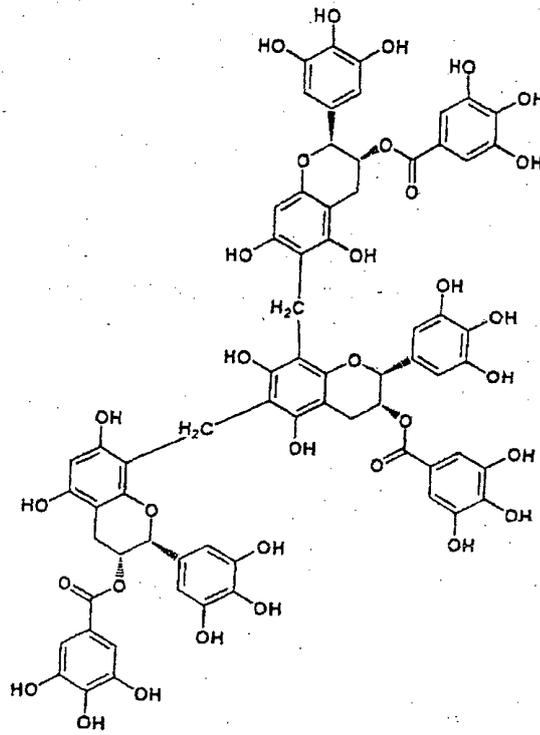
Los artículos de medición, que eran RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC-¹H{¹³C}, HMBC-¹H{¹³C}, TOCSY y DQF-COSY, se midieron mediante el espectrómetro DMX-750 (BRUKER BIOSPIN, Alemania). Como resultado de la RMN, se dilucidó que el compuesto 1 es un tetrámero de EGCG que tiene un esquema de acoplamiento de EGCG8:6EGCG8:8EGCG6:8EGCG (oolong homobisflavano-tetrámero-2 y también denominado en el presente documento OHBF-Tet-2 o Tet-2). Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C del compuesto 1 se muestran en la Figura 5 y la Figura 6.

Compuesto 1:

Con respecto al oolong homobisflavano-tetrámero-2, 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 y 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.

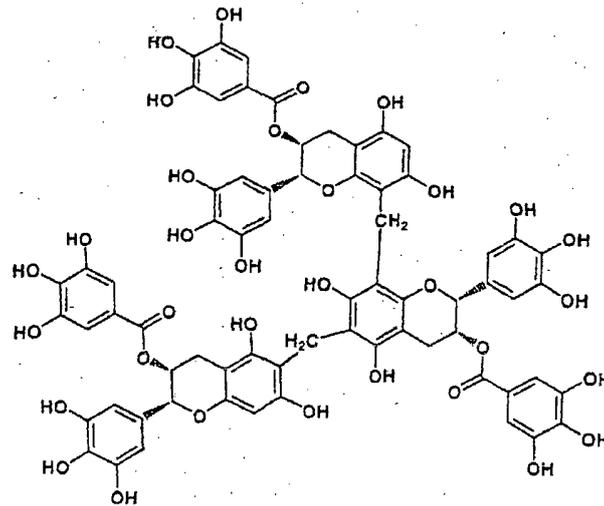
Las Fórmulas estructurales de los compuestos individuales identificados como se ha mencionado anteriormente se muestran a continuación.

[Producto químico 14]



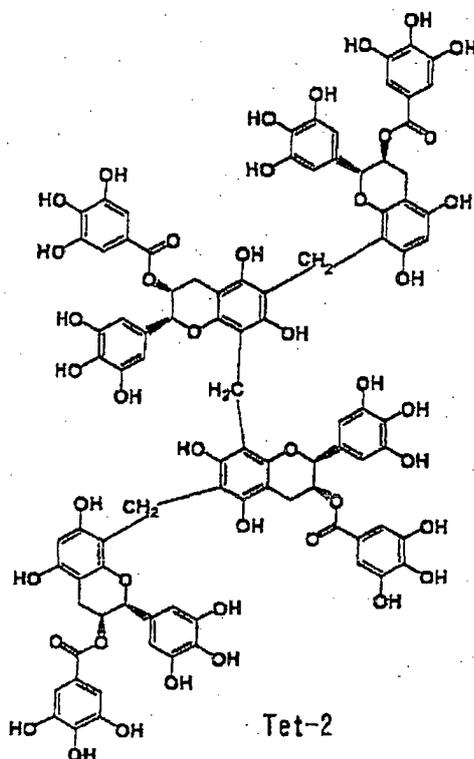
Tri2

[Producto químico 15]



Tri4

[Producto químico 16]



Los rendimientos de los compuestos individuales obtenidos mediante el procedimiento de síntesis y purificación anteriormente mencionado fueron los siguientes:

- 5 oolong homobisflavano-A (984 mg), oolong homobisflavano-B (374 mg), oolong homobisflavano-trímero-1 (468 mg), oolong homobisflavano-trímero-2 (73 mg), oolong homobisflavano-trímero-4 (12 mg) y oolong homobisflavano-tetrámero-2 (44 mg).

10 Ejemplo 2

Preparación de glucosiltransferasa recombinante (rGTF)

- 15 Se preparó rGTF mediante el método descrito en el artículo de M. Matsumoto et al, *FEMS Microbiology Letters* 228 (2003) 73-80. Más específicamente, una cepa XL-2 de *Escherichia coli* que albergaba un plásmido pSK6 que tenía un gen que codificaba la glucosiltransferasa B (GTFB) de *Streptococcus mutans* se sometió a cultivo en agitación realizado en medio líquido Luria Bertani que contenía ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (7,5 µg/ml) a 37 °C durante 16 horas. Las células bacterianas se recogieron mediante separación por centrifugación del medio, se suspendieron en un tampón de fosfato 10 mM (pH 6,5) previamente enfriado y se trituraron mediante un generador de ultrasonidos (de tipo UD201, fabricado por Tomy Seiko Co., Ltd., Tokio) con enfriamiento con hielo. Después del triturado, los precipitados se retiraron por centrifugación a 12.000 × g durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se utilizó como glucosiltransferasa B (rGTFB) y se puso en uso en experimentos posteriores.

- 25 De manera similar, se preparó glucosiltransferasa C recombinante (rGTFC) mediante el uso de una cepa XL-2 de *Escherichia coli* que albergaba un plásmido pSK6 que tenía un gen que codificaba la glucosiltransferasa C (GTFC) de *Streptococcus mutans* y se puso en uso en experimentos posteriores.

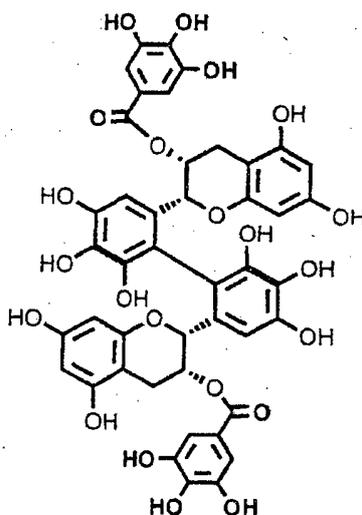
- 30 La rGTFB que tenía una actividad específica de 503 mU/mg de proteína y la rGTFC que tenía una actividad específica de 6,3 a 22,3 mU/mg de proteína se utilizaron como una mezcla. La actividad 1U representa la actividad de una enzima en la conversión de la glucosa (1,0 mM) derivada de sacarosa en glucano por minuto. La proteína se cuantificó utilizando el método del ácido bicinonínico (método BCA) (kit de ensayo de proteínas BCA, fabricado por PIERCE).

Ejemplo 3

Evaluación de la actividad inhibidora de la glucosiltransferasa (1)

- 5 Se evaluaron cada uno de oolong homobisflavano-A (OHBF-A), oolong homobisflavano-B (OHBF-B) y oolong homobisflavano-trímero-1 (Tri-1) obtenidos en el Ejemplo 1 y teasinensina A (TSN-A) preparada de acuerdo con el artículo (Hashimoto, F. Nonaka, G. Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (5), 1676-1684 (1988)) para determinar la actividad inhibidora de una glucosiltransferasa (GTF) mediante el siguiente procedimiento. Nótese que la teasinensina A (TSN-A) utilizada en el presente documento como referencia es una sustancia en la que los anillos B del EGCG están mutuamente unidos simétricamente en las posiciones 2' y que tiene la siguiente estructura:
- 10

[Producto químico 17]



TSN-A

- 15 Se mezclaron 2 ml de KPB 0,1 M (pH 6,0) que contenía dextrano T10 al 1 % que contenía sacarosa al 0,1 %, rGTFB o rGTFC (cantidad correspondiente a 15 mU (valor promedio)) obtenidas en el Ejemplo 2 y cada una de las muestras anteriores (concentración final: 0,1 mg/ml). La mezcla se incubó a 37 °C durante la noche. La turbidez (550 nm) de la solución de reacción resultante se midió para obtener el rendimiento de glucano insoluble en agua. El rendimiento inferior del glucano insoluble en agua (en otras palabras, la turbidez es baja) significa que la actividad de la glucosiltransferasa está más inhibida. Los resultados se muestran en la Figura 7 y la Figura 8. Nótese que el control (cont) que se muestra en las figuras representa la turbidez en ausencia de las muestras mencionadas anteriormente.
- 20

- Como se muestra en las Figuras 7 y 8, se descubrió que OHBF-A inhibe la actividad de la GTFB y, a la inversa, potencia ligeramente la actividad de la GTFC. Además, se descubrió que la TSN-A no tiene sustancialmente ningún efecto sobre la actividad de la GTFB y, a la inversa, potencia extremadamente la actividad de la GTFC. Por otra parte, se descubrió que OHBF-B y OHBF-Tri-1 inhiben las actividades tanto de la GTFB como de la GTFC. En particular, un trímero, OHBF-Tri-1, inhibe mucho más fuertemente las actividades tanto de la GTFB como de la GTFC en comparación con otros compuestos de dímero.
- 25

Ejemplo 4

Evaluación de la actividad inhibidora de la glucosiltransferasa (2)

- 35 Se evaluaron cada uno de oolong homobisflavano-trímero-1 (OHBF-Tri-1), oolong homobisflavano-trímero-2 (OHBF-Tri-2), oolong homobisflavano-trímero-4 (OHBF-Tri-4) y oolong homobisflavano-tetrámero-2 (OHBF-Tet-2) obtenidos en el Ejemplo 1 para determinar la actividad inhibidora de una glucosiltransferasa (GTF) mediante el siguiente procedimiento.

- 40 Se mezclaron 2 ml de KPB 0,1 M (pH 6,0) que contenía dextrano T10 al 1 % que contenía sacarosa al 0,1 %, rGTFB o rGTFC (cantidad correspondiente a 15 mU (valor promedio)) obtenidas en el Ejemplo 2 y cada una de las muestras anteriores (concentración final: 0,05 mg/ml). La mezcla se incubó a 37 °C durante la noche. La turbidez

(550 nm) de la solución de reacción resultante se midió para obtener el rendimiento de glucano insoluble en agua. El rendimiento inferior del glucano insoluble en agua (en otras palabras, la turbidez es baja) significa que la actividad de la glucosiltransferasa está más inhibida. Los resultados se muestran en la Figura 9 y la Figura 10. Nótese que el control (cont) que se muestra en las figuras representa la turbidez en ausencia de las muestras mencionadas anteriormente.

Como se muestra en las Figuras 9 y 10, un tetrámero de EGCG, es decir, Tet-2, inhibió ligeramente la actividad de la GTFC; sin embargo, no se confirmó un efecto inhibitor significativo sobre la GTFB. Por otra parte, se confirmó que los trímeros de EGCG, Tri-1, Tri-2 y Tri-4, tienen cada uno actividades inhibitoras sobre la GTFB y la GTFC. La acción inhibitora sobre la GTFB era más alta que la de un tetrámero de EGCG, Tet-2.

A partir de los resultados mencionados anteriormente, se descubrió que los trímeros de EGCG, es decir, Tri-1, Tri-2 y Tri-4 y un dímero de EGCG, es decir, OHBF-B tienen una actividad inhibitora de la GTF alta. En particular, se descubrió que los trímeros de EGCG, es decir, Tri-1, Tri-2 y Tri-4, tienen una actividad inhibitora de la GTF mayor que los dímeros de EGCG, es decir, OHBF-A, OHBF-B y TSN-A y que un tetrámero de EGCG, es decir, Tet-2.

Ejemplo 5

Cuantificación de polifenoles polimerizados mediante condiciones de medición de CL-EM/EM de trímero y tetrámero mediante CL-EM/EM y cuantificación del "té oolong Negro Suntory" (fabricado por Suntory Limited.)

Se midió la CL-EM/EM de un polímero de EGCG mediante 4000 TRAP Q (fabricado por Applied) utilizando turbo nebulización iónica en las siguientes condiciones: energía de colisión: 46 eV (nega.), tensión de nebulización iónica: 4500 V, temp: 450 °C.

Como canal de medición para cada compuesto en el MRM (control de reacción múltiple, por sus siglas en inglés), se utilizó 698,40/168,90 (divalente nega.) para los oolong homobisflavano-trímeros y se utilizó oolong homobisflavano-trímero-1 como sustancia patrón. Se utilizó un canal de 933,16/168,90 (divalente nega.) para los oolong homobisflavano-tetrámeros y se utilizó oolong homobisflavano-tetrámero-2 como sustancia patrón. La medición se realizó en las siguientes condiciones.

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

Caudal: 0,3 ml/min,

Temp. de la columna: 40 °C

Fase móvil A: HCOOH al 0,1 %/H₂O,

Fase móvil B: HCOOH al 0,1 %/CH₃CN

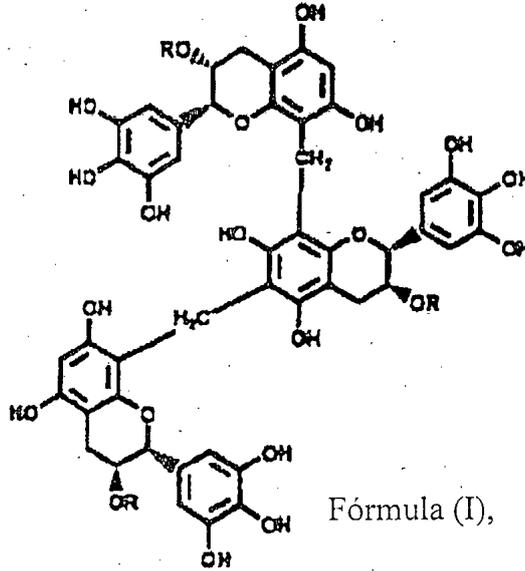
Programa de gradiente 91 % de A/9 % de B (0 min) → 40 % de A/60 % de B (17 min) → 15 % de A/85 % de B (17,1 min), posteriormente isocrático (de 17,1 a 19 min) a 15 % de A/85 % de B.

Puesto que estos compuestos estaban contenidos solo en una cantidad traza en el "té oolong Negro Suntory", fue imposible cuantificarlos de manera directa. Entonces, el "té oolong Negro Suntory" (antes de ser esterilizado) se fraccionó por etapas mediante una columna CHP-20P (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation). Después de que se cuantificara cada una de las fracciones, se añadieron las concentraciones de las fracciones individuales detectados hasta obtener la concentración en el té original. La concentración en el "té oolong Negro Suntory" se obtuvo como se indica a continuación. La concentración de trímeros se obtuvo convirtiendo las concentraciones de cinco componentes detectados en términos de oolong homobisflavano-trímero-1 y sumándolas. Era de 172 ng/ml. La concentración de tetrámeros se obtuvo mediante la suma de las concentraciones de cuatro componentes detectados. Era de 55 ng/ml en términos de oolong homobisflavano-tetrámero-2.

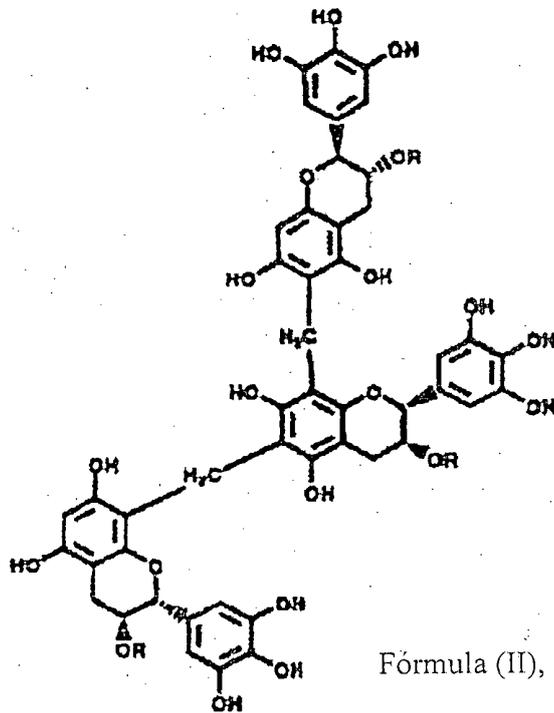
REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la glucosiltransferasa que comprende un trímero de galato de epigalocatequina que tiene la siguiente Fórmula (I):

5

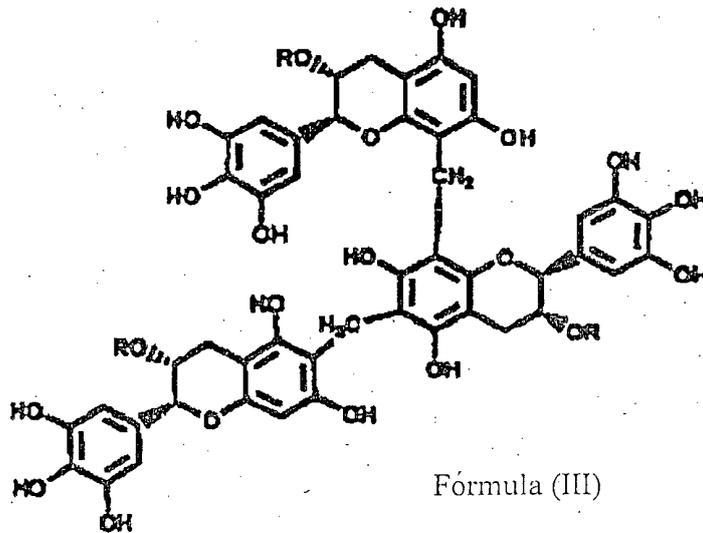


un trímero de galato de epigalocatequina que tiene la siguiente Fórmula (II):

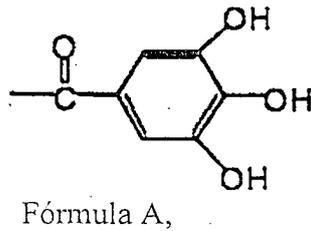


10

un trímero de galato de epigalocatequina que tiene la siguiente Fórmula (III):

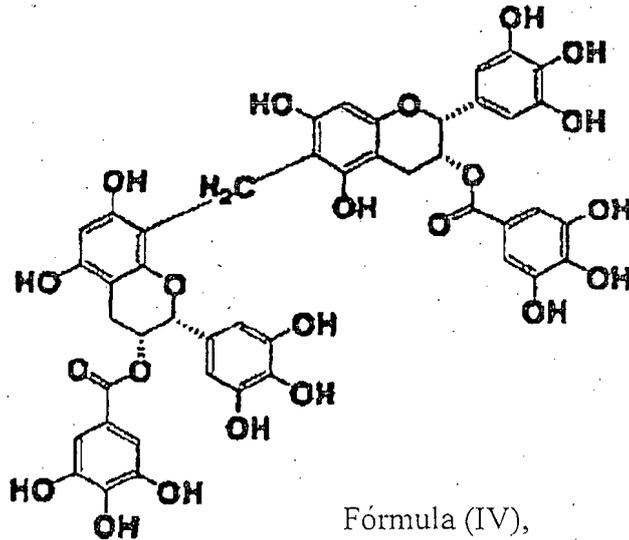


donde R es un grupo galóilo representado por la siguiente Fórmula A:



5

un compuesto que tiene la siguiente Fórmula (IV):



10

o una sal del mismo, para su uso en la prevención de la caries dental y/o el mal aliento.

15

2. El inhibidor de la glucosiltransferasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el trímero de galato de epigalocatequina que tiene la Fórmula (II) o el trímero de galato de epigalocatequina que tiene la Fórmula (III).

3. Un alimento o bebida para el uso como se ha definido en la reivindicación 1, al que se añade el inhibidor de la glucosiltransferasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

4. El alimento o bebida para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el alimento o bebida es una bebida de té.
5. Un producto de higiene oral para el uso como se ha definido en la reivindicación 1, al que se añade el inhibidor de la glucosiltransferasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
6. El producto de higiene oral para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el producto de higiene oral se selecciona entre el grupo que consiste en una pasta dentífrica, un enjuague bucal y un trocisco.

Figura 1

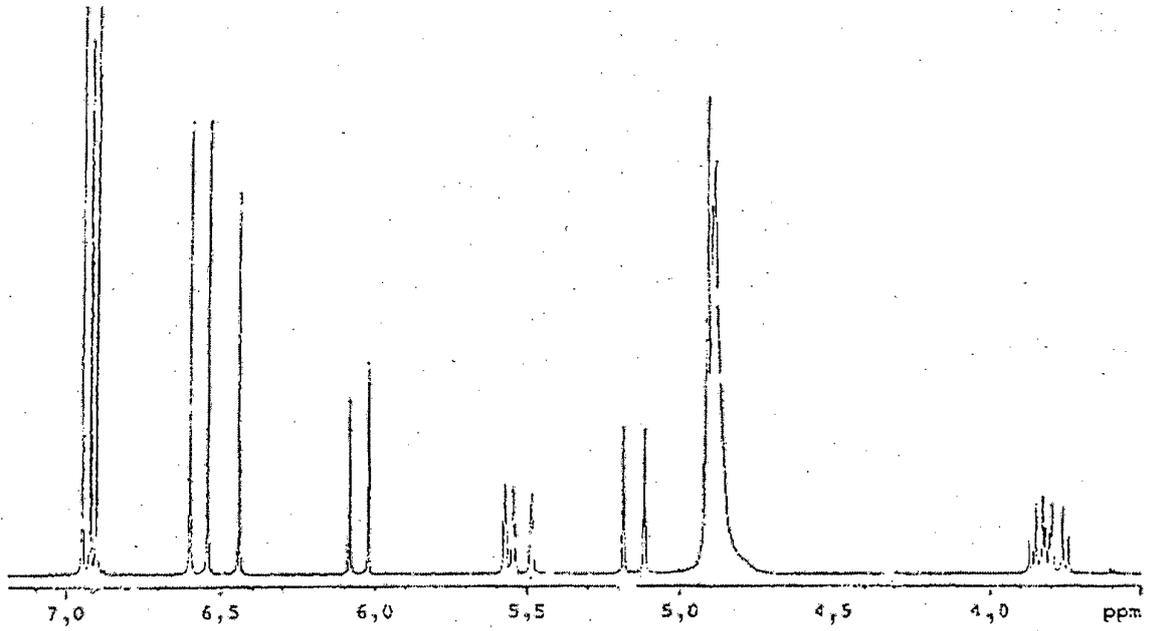


Figura 2

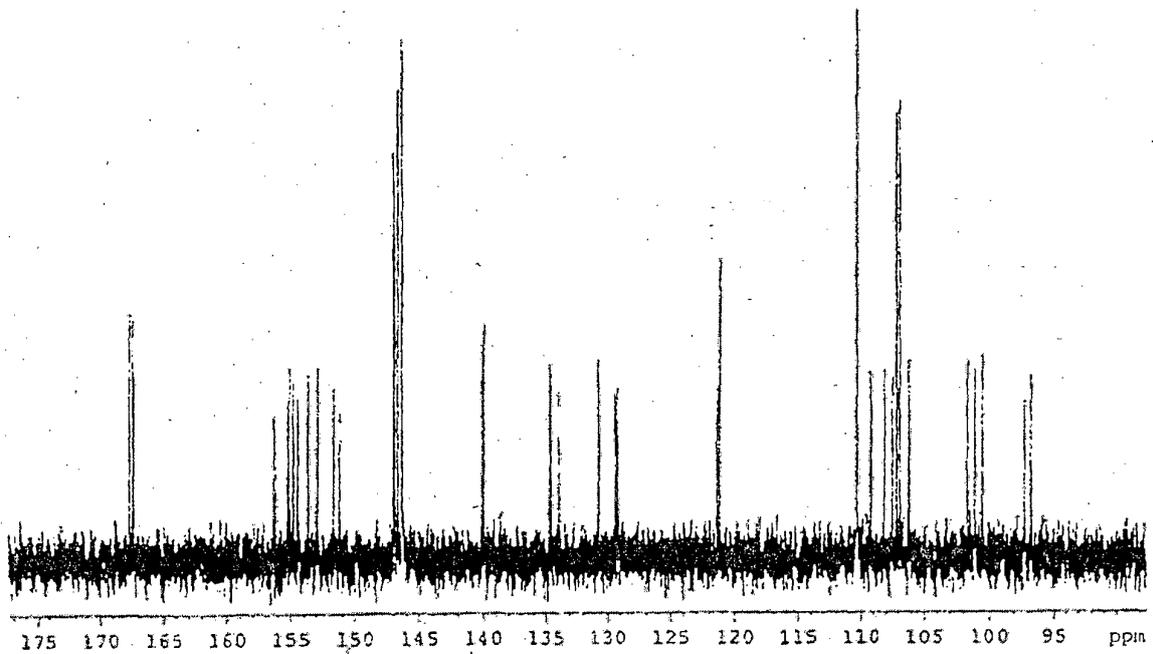


Figura 3

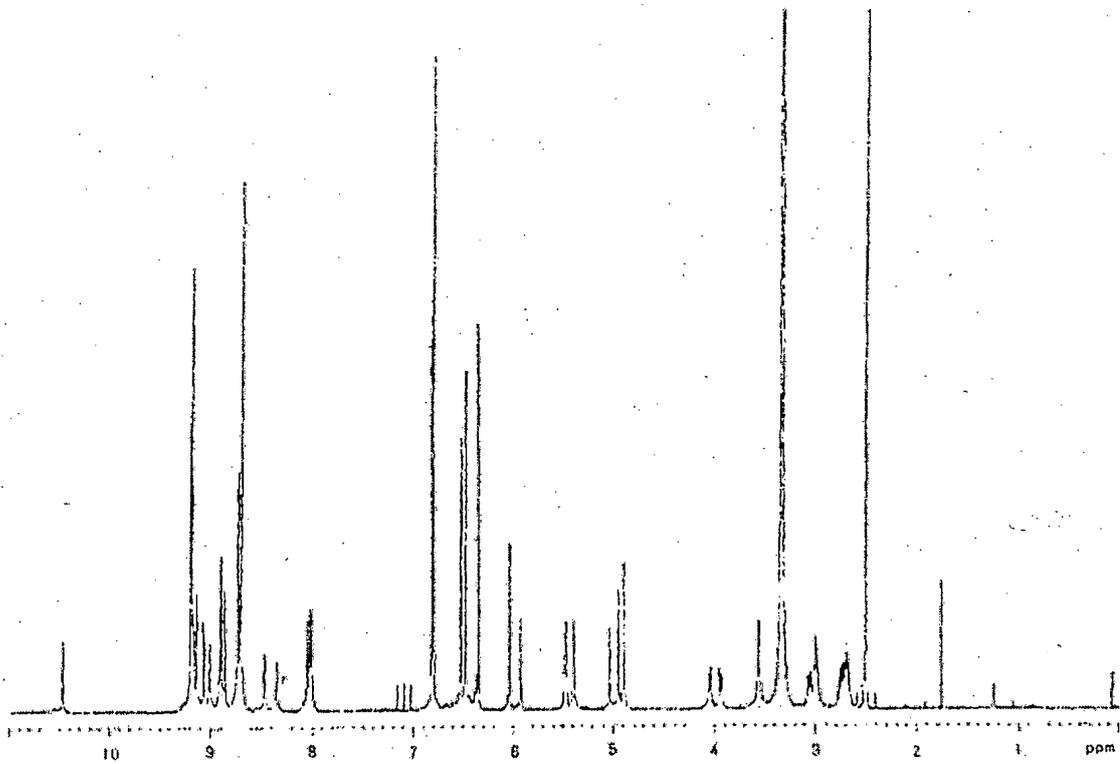


Figura 4

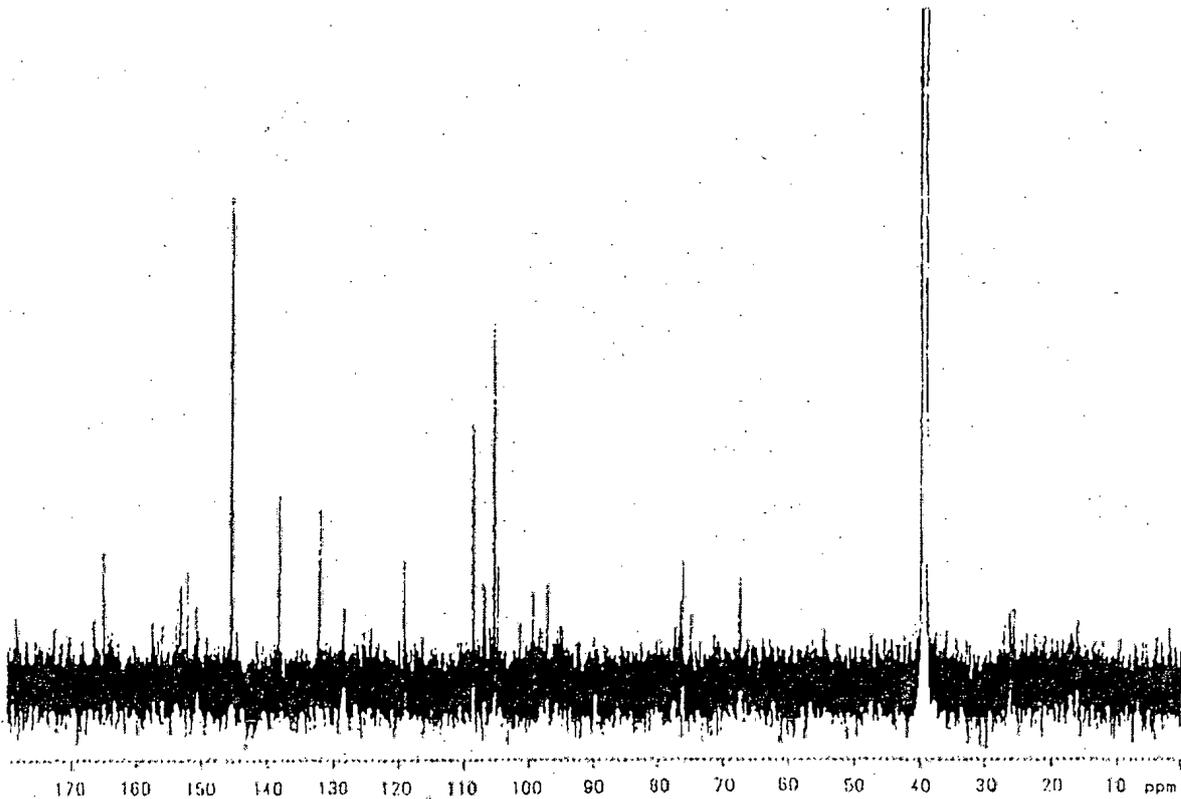


Figura 5

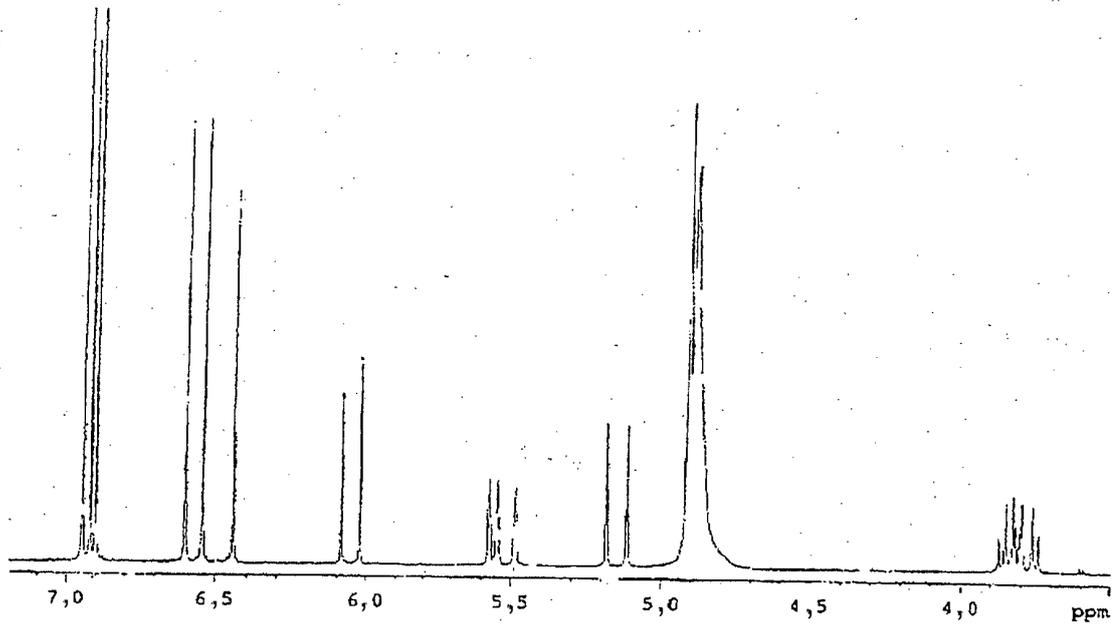


Figura 6

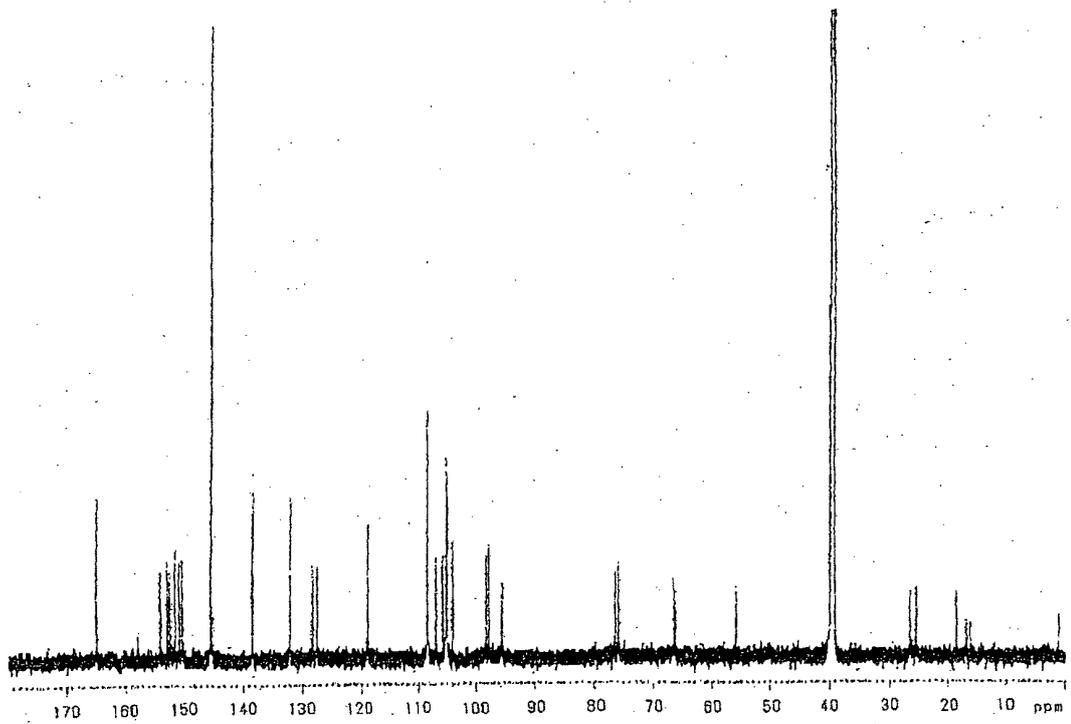
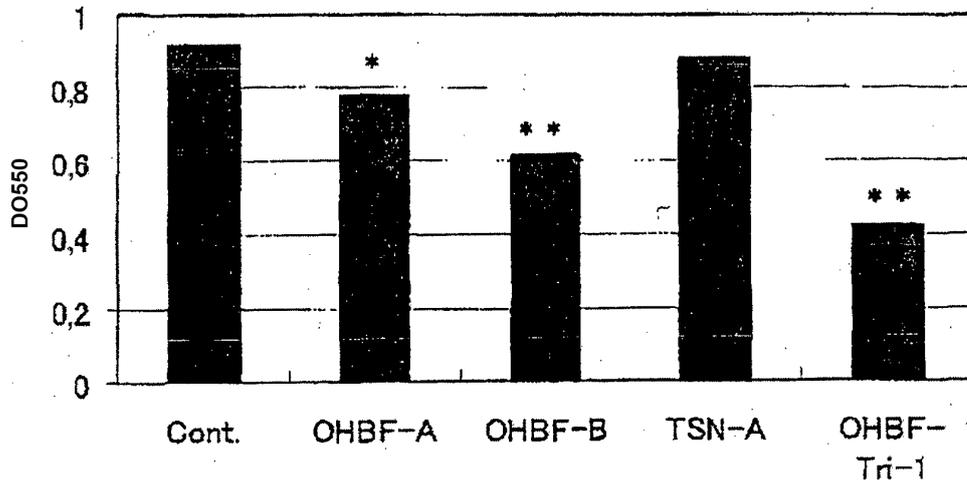


Figura 7

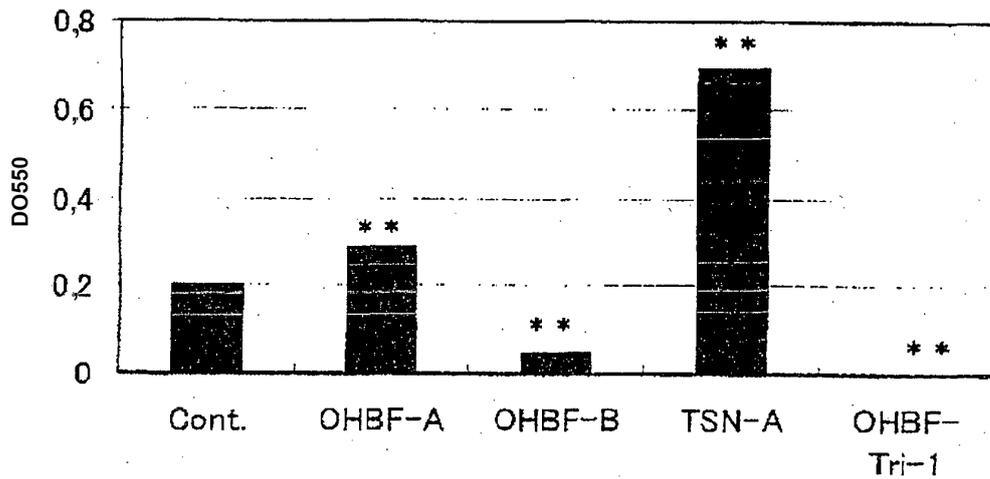
Acción inhibitoria de los compuestos de dímeros y trímeros de EGCG sobre GTFB
(Cantidad de muestra: 0,1 mg/ml)



Diferencia significativa entre cada muestra y el control a una concentración de 0,1 mg/ml (*P < 0,01, **P < 0,001)

Figura 8

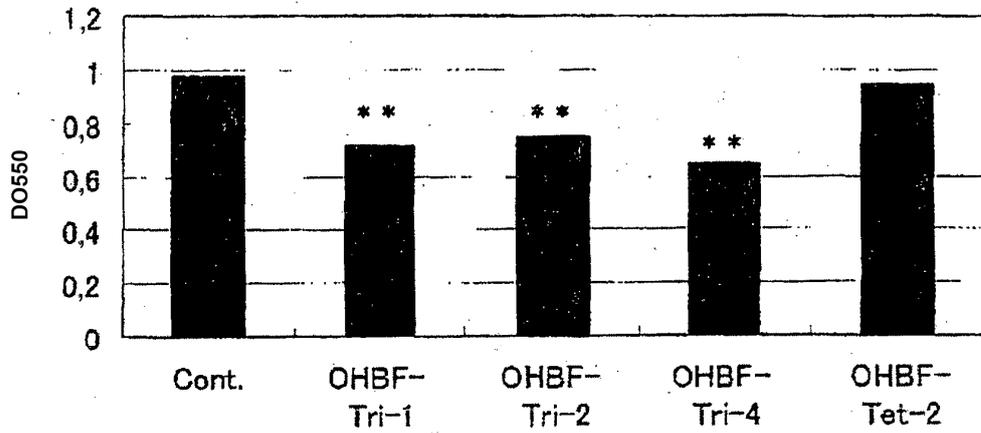
Acción inhibitoria de los compuestos de dímeros y trímeros de EGCG sobre GTFC
(Cantidad de muestra: 0,1 mg/ml)



Diferencia significativa entre cada muestra y el control a una concentración de 0,1 mg/ml (*P < 0,01, **P < 0,001)

Figura 9

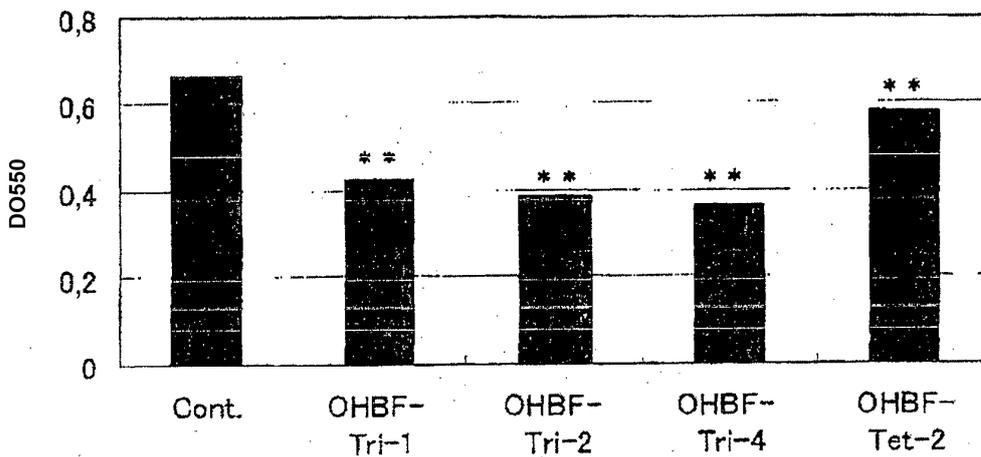
Acción inhibitoria de los compuestos de trímeros y tetrámeros de EGCG sobre GTFB
(Cantidad de muestra: 0,05 mg/ml)



Diferencia significativa entre cada muestra y el control a una concentración de 0,05 mg/ml (*P < 0,01, **P < 0,001)

Figura 10

Acción inhibitoria de los compuestos de trímeros y tetrámeros de EGCG sobre GTFC
(Cantidad de muestra: 0,05 mg/ml)



Diferencia significativa entre cada muestra y el control a una concentración de 0,05 mg/ml (*P < 0,01, **P < 0,001)