

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 463**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/122** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**C07D 311/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2010 PCT/JP2010/058624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10134595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2010 E 10777827 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2433625**

54 Título: **Agente antiobesidad que comprende un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona**

30 Prioridad:

**21.05.2009 JP 2009123585**

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

**23.11.2017**

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;  
ASAMI, SUMIO y  
MAEDA, MITSURU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 643 463 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

Agente antiobesidad que comprende un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente antiobesidad que contiene un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona.

10 **Técnica anterior**

La obesidad es una de las enfermedades más significativas en la sociedad moderna y el principal factor de obesidad es la excesiva ingesta de grasa. Se sabe que la excesiva ingesta de grasa no solo provoca obesidad, sino también diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, arterioesclerosis y similares que se atribuyen a la obesidad. La afección en la que dos o más de hiperglucemia, hipertensión e hiperlipidemia se desarrollan con obesidad causada por grasa visceral se llama síndrome metabólico (síndrome de grasa visceral), que se encuentra en alto riesgo de provocar enfermedades cardíacas y apoplejía y, de esta manera, en los últimos años se ha considerado un problema. Como un agente terapéutico para la obesidad, está disponible comercialmente como un agente antiobesidad, por ejemplo, Xenical<sup>(R)</sup>, que tiene una acción supresora sobre la absorción de las grasas en el tubo gastrointestinal debido a su actividad inhibidora de la lipasa; sin embargo, se han notificado sus efectos secundarios, tales como esteatorrea, frecuencia incrementada de la defecación, heces sueltas, diarrea y dolor abdominal y, de esta manera, el agente puede que no sea necesariamente seguro (documento distinto de patente 1).

A fin de prevenir la obesidad, la reducción de las calorías en un régimen restrictivo es una manera eficaz. No obstante, a menudo es difícil ponerla en práctica en la vida diaria porque se debe recibir una orientación nutricional sustancial. Por consiguiente, se espera que la supresión de una manera segura y saludable de la absorción de la grasa derivada de la alimentación en el cuerpo sea una medida realista y eficaz para el tratamiento de la obesidad y las enfermedades relacionadas con la obesidad o la potenciación de la salud.

En estas circunstancias, el desarrollo de alimentos naturales especificados que sean seguros y se haya demostrado que son eficaces en seres humanos está suscitando atención. Hasta la fecha, los siguientes materiales alimenticios, que suprimen la elevación del nivel de triglicéridos en suero después de las comidas, se venden comercialmente como alimentos naturales especificados: hidrolizado de globina, que suprime la absorción de las grasas mediante su inhibición de la lipasa pancreática; diacilglicerol, que tiene propiedades digestivas y de absorción diferentes del triacilglicerol; ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), que se purifican a partir de aceite de pescado; y similares.

Además, el reciente interés se centra en sustancias activas derivadas de plantas que inhiben las lipasas, y particularmente, se han notificado los siguientes polifenoles que tienen actividad inhibidora de la lipasa: tanino derivado de cortezas vegetales; taninos y flavonoides y glucósidos de los mismos en la leguminosa *Cassia nomame*; alimentos que inhiben la absorción de los lípidos que contienen galato de epigallocatequina y galato de epicatequina, que son los componentes principales del té verde; inhibidores de la lipasa que comprenden extractos en agua de pimienta, hongo *shimeji*, calabaza, hongo *maitake*, algas marinas *Hizikia fusiformis*, té verde, té oolong y similares; flavonas y flavonoles; ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico), compuestos triterpénicos y derivados de los mismos; agentes antiobesidad que contienen, como ingrediente activo, procianidina de tamarindo; y similares. Se conocen adicionalmente la acción inhibidora de la lipasa del extracto de semillas de uva (documento distinto de patente 2); la acción inhibidora de la lipasa del polifenol derivado de *Salacia reticulata* y la acción antiobesidad en ratas (documento distinto de patente 3); la acción antiobesidad derivada del extracto de té oolong en ratones (documento distinto de patente 4); y similares. Además, los tés contienen gran cantidad de catequinas, muchos componentes de las cuales se han separado e identificado (documento distinto de patente 5), y hay notificaciones sobre los inhibidores de la lipasa que contienen componentes derivados del té (documentos de patente 1 y 2). Sobre todo, las teaflavinas, conocidas como los pigmentos del té negro y del té oolong, presentan una fuerte actividad inhibidora de la lipasa en proporción al número de grupos galato en una molécula (documento de patente 2, documento distinto de patente 6). Sin embargo, el contenido y la proporción de estas teaflavinas no son constantes entre los tés.

Las sustancias que inhiben la alfa-glucosidasa tienen una acción inhibidora sobre la elevación de la glucemia inhibiendo la alfa-glucosidasa, que se localiza en el epitelio del intestino delgado, y suprimiendo o retrasando la degradación y absorción del azúcar. Por consiguiente, las sustancias que inhiben la alfa-glucosidasa son útiles en diversas enfermedades, tales como diabetes y obesidad, que derivan de la cronicidad de los síntomas de hiperglucemia.

Desde que la actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa se descubriera en un componente de la malta en 1933, se han descubierto muchas sustancias que inhiben la alfa-glucosidasa que derivan del trigo y las legumbres. En 1966, la nojirimicina, que tiene actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa, se aisló a partir de un metabolito microbiano y se determinó su estructura. A partir del extracto de hoja de morera, se obtuvo un compuesto relacionado de nojirimicina, 1-desoxinojirimicina, que se sabe que tiene actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa, y se divulga un procedimiento

de extracción para evitar que la actividad disminuya (documento de patente 3).

Se notifica que un compuesto que contiene una estructura de ciclitol de anillo de 13 miembros que tiene un sulfóxido, que se aísla del extracto de la raíz de *Salacia reticulata*, tiene actividad inhibidora de la maltasa (documento de patente 4). Se notifica que los 3-soforósido-5-glucósidos de peonidina, cianina y pelargonidina diacilados tienen actividad inhibidora de la maltasa como un compuesto de antocianina aislado a partir de glorias de la mañana o la raíz del boniato morado (documento distinto de patente 7). La actividad inhibidora de la maltasa también se ha confirmado en los componentes contenidos en las hojas del té, tales como teasinensina A, derivados de teaflavina que tienen un grupo galoilo, y proantocianidinas que tienen galato de epiafzelequina como unidad constitucional. Aunque los derivados de teaflavina que tienen un grupo galoilo tienen actividad inhibidora de la maltasa, están contenidos en las hojas del té solo en una pequeña proporción, de un 0,1 a un 0,2 % (documento de patente 5, documento distinto de patente 8).

Se notifica que las teaflavinas del té negro y las catequinas del té verde tienen actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa (documento distinto de patente 8); la actividad se ha confirmado en catequinas que tienen un grupo galoilo en su posición 3 que comprenden 3-O-galato de epigalocatequina (denominado en el presente documento "EGCG") y 3-O-galato de epicatequina y teaflavinas que comprenden 3-O-galato de teaflavina y 3,3'-di-O-galato de teaflavina. También se han examinado las fracciones y similares del té negro frente a su actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa; también se sabe que las fracciones poliméricas formadas por fermentación tienen la actividad (documento distinto de patente 9).

Por otra parte, se sabe que en el proceso de fermentación en la producción del té negro o té oolong, los polifenoles, tales como las catequinas o el ácido gálico, se condensan en un compuesto que tiene un anillo de benzotropolona a través de la actividad de las enzimas, tales como polifenol oxidasa, en las hojas del té (documento distinto de patente 10).

Se notifica que, aparte de las teaflavinas, en los tés están presentes muchos compuestos que contienen un anillo de benzotropolona. Por ejemplo, se notifican una inducción de la apoptosis provocada por derivados de purpurogalina (documento de patente 6) y un procedimiento de fabricación de epiteaflagalina para su uso en alimentos (documento de patente 7), de un procedimiento enzimático de fabricación de un trímero de tipo teafavina, teadibenzotropolona A y de la presencia de las mismas en el té negro (documento distinto de patente 11) y similares. También se conocen las acciones antiinflamatorias de diversos compuestos que contienen un anillo de benzotropolona (documento distinto de patente 12). No obstante, para los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona distintos de las teaflavinas y epiteaflagalinas, no se sabe nada sobre su acción inhibidora de la lipasa en relación con la absorción de las grasas y su acción inhibidora de la alfa-glucosidasa en relación con su acción inhibidora sobre la elevación de la glucemia.

El documento WO 99/22728 A1 divulga procedimientos y composiciones para la regulación de la actividad de 5-alfa reductasa.

SANG S *ET AL* se refiere a nuevos derivados de dibenzotropolona caracterizados a partir del té negro usando CL-EM/EM (BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY. PERGAMON, GB, vol. 12, n.º 11, 1 de junio de 2004 (01-06-2004).

ZHENG *ET AL* describe la construcción de un farmacóforo tridimensional para los inhibidores de la Bcl-2 mediante acoplamiento flexible y el procedimiento de búsqueda simultánea de múltiples copias (BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 15, n.º 19, 10 de agosto de 2007 (10-08-2007), páginas 6407-6417).

El documento WO 2005/021479 A1 se refiere a los derivados de benzotropolona y a la modulación de la respuesta inflamatoria.

El documento JP 2009 028010 A se refiere a un procedimiento para producir té fermentado.

El documento JP 2006 052191 A describe composiciones para prevenir, mejorar o tratar la diabetes.

El documento JP 2004 155784 A divulga composiciones para disminuir el colesterol.

El documento WO 2006/004114 A1 se refiere a un inhibidor de la lipasa que contiene un dímero de flavan-3-ol.

El documento JP 2007 504168 describe los derivados de benzotropolona y la modulación de la respuesta inflamatoria.

## Lista de citas

### Documento de patente

Documento de patente 1: WO2005/077384.

Documento de patente 2: WO 2006/004110.

Documento de patente 3: Divulgación pública de patente japonesa 2007-60908.

5 Documento de patente 4: Divulgación pública de patente japonesa 2008-137925.

Documento de patente 5: Divulgación pública de patente japonesa 2007-231009.

10 Documento de patente 6: Divulgación pública de patente japonesa 2004-359576.

Documento de patente 7: WO 2007-141945.

#### **Documento distinto de patente**

15 Documento distinto de patente 1 Lancet 1998; 352: 167-172.

Documento distinto de patente 2 Nutrition 2003; 19(10): 876-879.

20 Documento distinto de patente 3 J. Nutr. 2002; 132: 1819-1824.

Documento distinto de patente 4 Int. J. Obes. 1999; 23: 98-105.

25 Documento distinto de patente 5 Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, Vol. 46, n.º 3, pp. 138-147, marzo de 1999.

Documento distinto de patente 6 Chem. Pharm. Bull. 2008; 56: 266-272.

30 Documento distinto de patente 7 J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 1952-1956.

Documento distinto de patente 8 J. Agric. Food. Chem., 55, 99-105, 2007.

Documento distinto de patente 9 Chem. Pharm. Bull. 56(3), 266-272, 2008.

35 Documento distinto de patente 10 Tetrahedron 1973; 29: 125-142.

Documento distinto de patente 11 Tetrahedron Letters 2002; 43: 7129-7133.

40 Documento distinto de patente 12 Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004; 12: 459-467.

#### **Sumario de la invención**

##### **Problema técnico**

45 Incluso si se descubre que se obtiene algún efecto a partir de un extracto vegetal, a menos que se determine la cantidad de los componentes activos contenidos en el extracto, es difícil garantizar un mantenimiento estable de su actividad antiobesidad, puesto que el extracto es un producto de origen natural. Adicionalmente, algunos de los inhibidores de la lipasa e inhibidores de la alfa-glucosidasa notificados como se muestra anteriormente no son suficientemente eficaces.

50 Se espera que un agente antiobesidad derivado de vegetales menos apetitoso, cuando se usa como alimento o bebida, influya negativamente en su sabor. Por otra parte, un agente antiobesidad derivado del té más apetitoso puede ser posiblemente un candidato material eficaz; sin embargo, por ejemplo, incluso cuando se bebe un apetitoso té negro o té oolong a fin de reducir los lípidos, no se puede obtener su efecto sin beber el té en grandes cantidades, y, de esta manera, poner esto en práctica en la vida cotidiana, por tanto, no es realista. El té negro o té oolong condensado simplemente tampoco es apropiado para beber como una medida realista debido a su fuerte amargor y astringencia y cafeína incrementada.

60 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente antiobesidad que sea un producto de origen natural y eficaz.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor apetitoso derivado del té de la actividad de lipasa que muestre una actividad altamente inhibidora frente a la lipasa pancreática y suprima la absorción de la grasa derivada de la alimentación y/o contribuya a la supresión y la prevención de la obesidad. Todavía otro objeto es proporcionar un inhibidor de la alfa-glucosidasa que suprima la absorción del azúcar derivado de la alimentación y contribuya al tratamiento y/o la prevención a largo plazo de la diabetes que resulta de la cronicidad de los síntomas

de hiperglucemia.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar alimentos y bebidas que sean apetitosos y estén destinados a reducir los triglicéridos en sangre y que potencien la salud.

5 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que suprima la absorción de la grasa derivada de la alimentación y la elevación de los triglicéridos en sangre.

**Solución al problema**

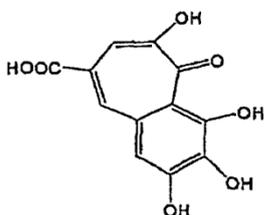
10 Como resultado de los estudios intensivos para resolver los problemas anteriores, los autores de la presente invención han descubierto componentes de las hojas del té que inhiben potentemente la lipasa pancreática, esencial para la absorción de las grasas, y que tienen alta actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa. Específicamente, los inventores han sometido a ensayo las actividades inhibidoras de diversos polifenoles presentes en las hojas del té  
 15 frente a la lipasa y la alfa-glucosidasa, y descubrieron que los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona de fórmulas (13), (15) a (20), (22) y (23) tienen una fuerte actividad inhibidora de la lipasa y una fuerte actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa. Estos compuestos son óxidos de catequinas y polifenoles que están contenidos en el té negro, y, de esta manera, son superiores en sabor y seguridad y se pueden tomar durante largos periodos de tiempo. A partir de estos hallazgos, los inventores han descubierto que es posible proporcionar  
 20 alimentos y bebidas a las que se añadan un inhibidor de la lipasa y un inhibidor de la alfa-glucosidasa, que estén destinados a suprimir la absorción de la grasa y el azúcar derivados de la alimentación y la elevación de los triglicéridos en sangre y a tratar y/o prevenir la diabetes que resulta de la cronicidad de los síntomas de hiperglucemia a la larga. De esta manera, se ha conseguido la presente invención.

25 Más específicamente, la presente invención se define por [1] a [7] a continuación.

[1] Un agente para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende uno o más compuestos de fórmulas (13), (15) a (20), (22) y (23)

30 Fórmula (13):

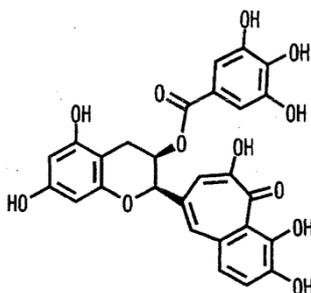
[Fórmula química 13]



Fórmula (13)

35 Fórmula (15):

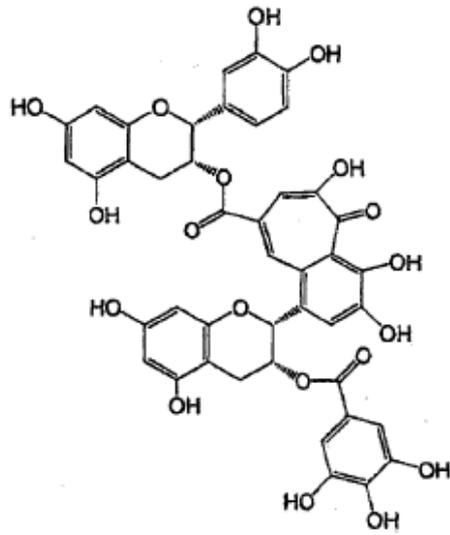
[Fórmula química 15]



Fórmula (15)

40 Fórmula (16):

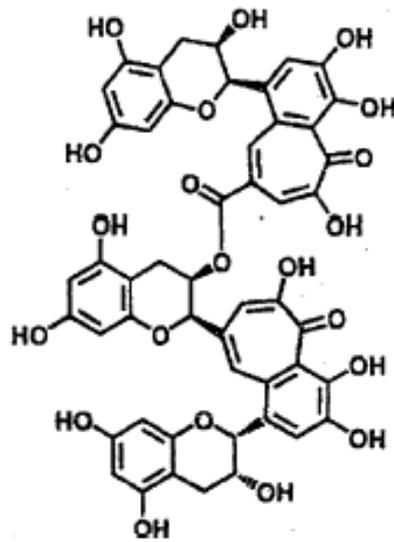
[Fórmula química 16]



Fórmula (16)

Fórmula (17):

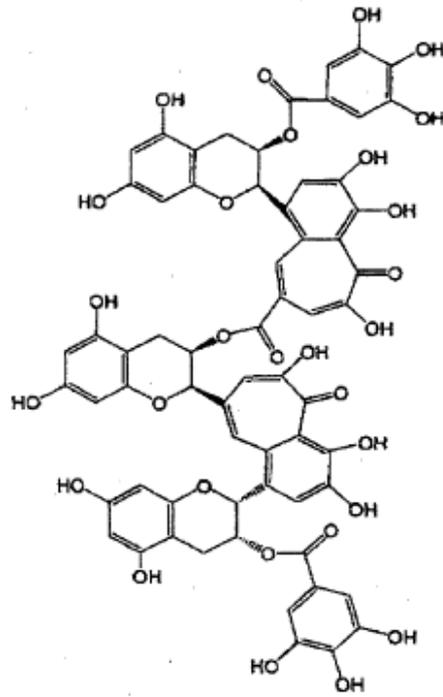
[Fórmula química 17]



Fórmula (17)

Fórmula (18):

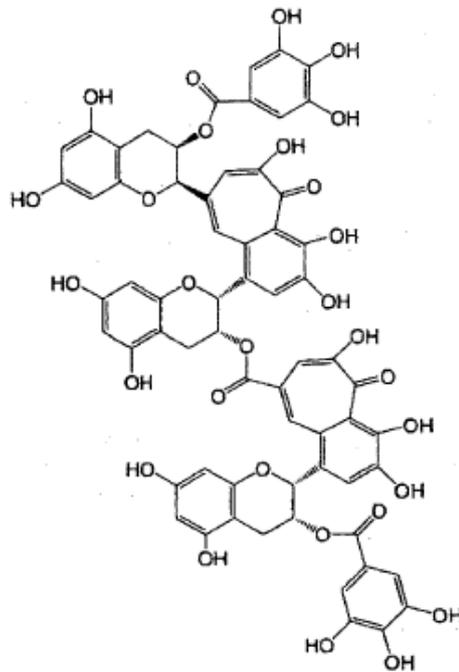
[Fórmula química 18]



Fórmula (18)

Fórmula (19):

[Fórmula química 19]



Fórmula (19)

Fórmula (20):



alimentación.

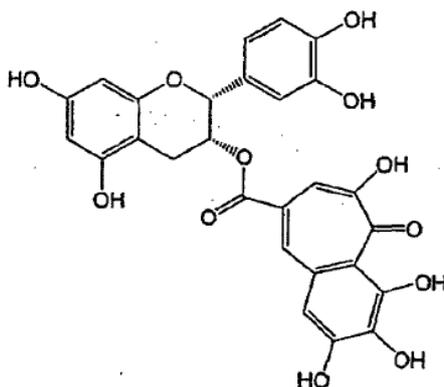
[4] El agente para su uso según uno cualquiera de [1] a [3], que está en forma de un alimento o una bebida.

5 [5] El agente para su uso según [4], donde el alimento o bebida se selecciona del grupo que consiste en una bebida de té, un refresco y un alimento natural.

[6] El agente para su uso según uno cualquiera de [1] a [3], que está en forma de una composición farmacéutica.

10 [7] Un compuesto de fórmula (23):

[Fórmula química 23]



Fórmula (23)

### Efectos ventajosos de la invención

15 El inhibidor de la lipasa que sirve como el agente antiobesidad de la presente invención contiene un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona derivado del té y, de esta manera, presenta una actividad inhibidora de la lipasa superior. El inhibidor de la lipasa de la presente invención no compromete el sabor de los alimentos y bebidas, presenta apetitosidad y se puede usar en diversas aplicaciones de uso, que comprenden alimentos y bebidas  
20 destinados a la reducción de los triglicéridos y a la potenciación de la salud. Es deseable tomar este inhibidor junto con las comidas para la supresión de la absorción de las grasas alimenticias, y, por lo tanto, las bebidas que contienen ingredientes activos potenciados derivados del té son de gran importancia. Particularmente, la potenciación de estos ingredientes ha posibilitado proporcionar una bebida destinada a una acción antiobesidad y una potenciación de la salud.

25 El inhibidor de la alfa-glucosidasa que sirve como el agente antiobesidad de la presente invención puede suprimir la degradación del azúcar derivado de los polisacáridos y el almidón derivados de la alimentación y la absorción del azúcar, en menos cantidad que el inhibidor de la alfa-glucosidasa derivado del producto natural conocido convencionalmente. Adicionalmente, todos los compuestos son óxidos de catequinas y polifenoles contenidos en los  
30 téis y, de esta manera, son superiores en sabor y seguridad, lo que posibilita la ingesta a largo plazo de los compuestos.

Además, el agente antiobesidad de la presente invención contiene un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona, un componente derivado de los téis, que se usan ampliamente en la alimentación, y, de esta  
35 manera, son seguros y también se pueden usar como una composición farmacéutica con efectos secundarios reducidos.

### Breve descripción de los dibujos

40 [Fig. 1] La fig. 1 muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 12. (Ejemplo de referencia).

[Fig. 2] La fig. 2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 12. (Ejemplo de referencia).

### Descripción de los modos de realización

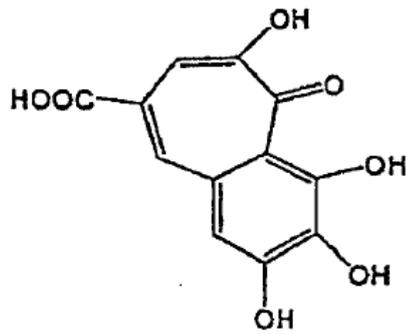
45 Los modos de realización de la presente invención se describen en detalle a continuación.

**Agentes antiobesidad**

La presente invención es un agente antiobesidad que contiene un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona de las siguientes fórmulas como ingrediente activo:

5 ácido carboxílico de purpurogalina de fórmula (13):

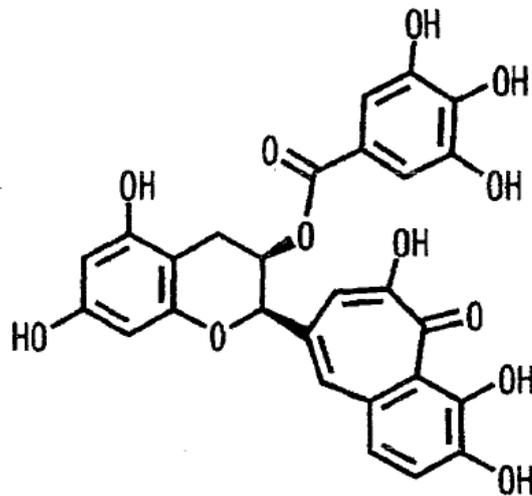
[Fórmula química 27]



Fórmula (13)

10 EGCG-catecol de fórmula (15):

[Fórmula química 29]

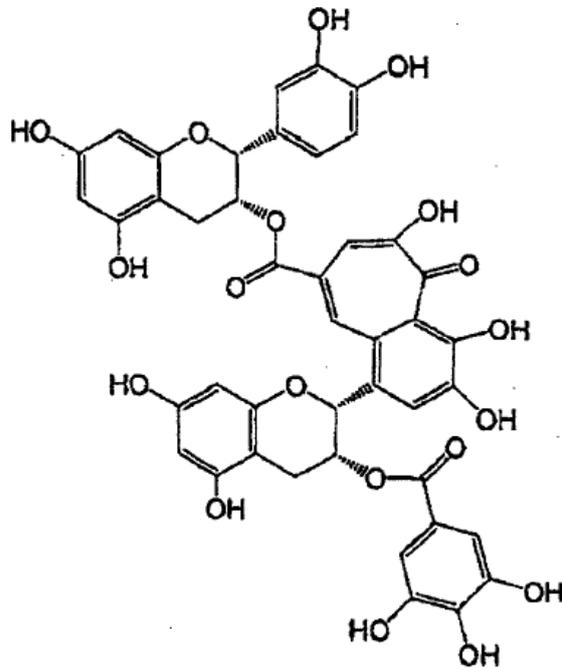


Fórmula (15)

teaflavato A de fórmula (16):

15

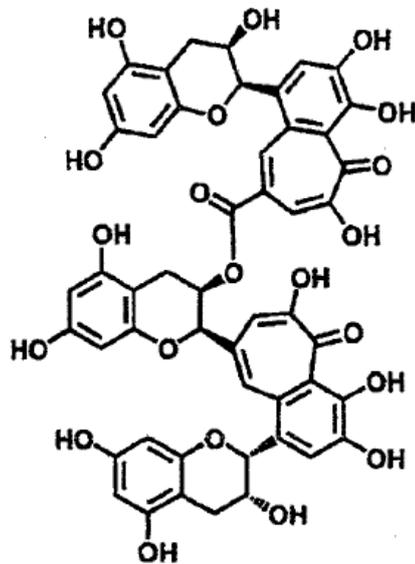
[Fórmula química 30]



Fórmula (16)

teadibenzotropolona A de fórmula (17):

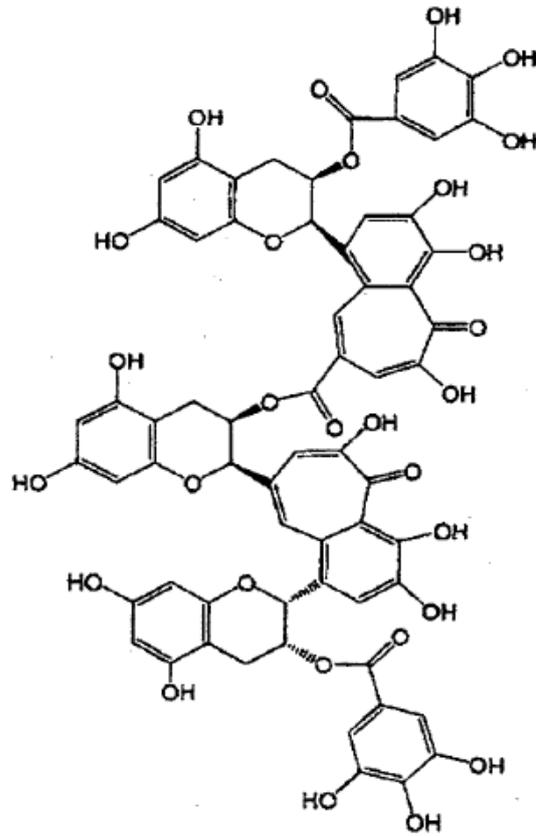
[Fórmula química 31]



Fórmula (17)

trímero de digalato de teaflavina 1 (TFdiGA-tri1) de fórmula (18):

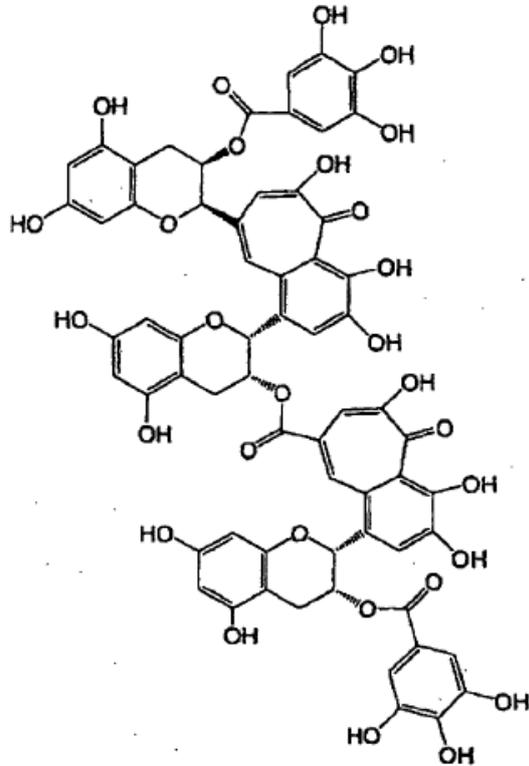
[Fórmula química 32]



Fórmula (18)

trímero de digalato de teaflavina 2 (TFdiGA-tri2) de fórmula (19):

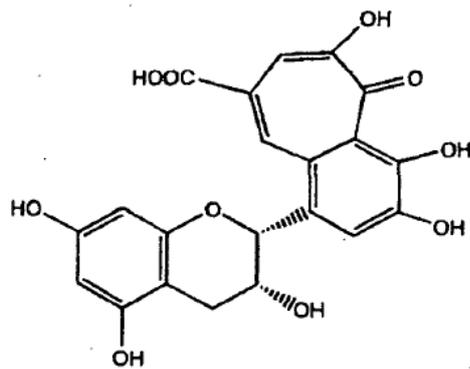
[Fórmula química 33]



Fórmula (19)

ácido epiteaflávic de fórmula (20):

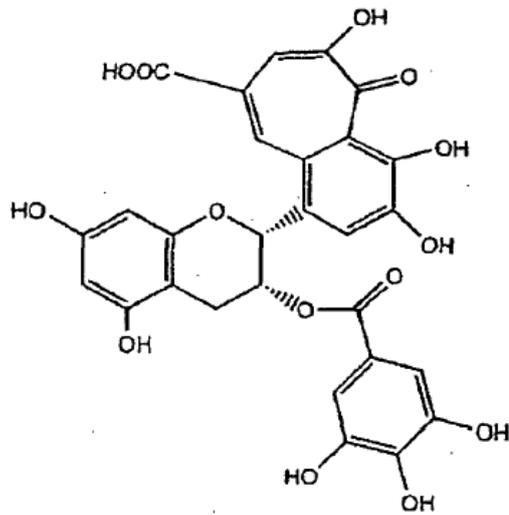
[Fórmula química 34]



Fórmula (20)

3-O-galato del ácido epiteaflávic de fórmula (22):

[Fórmula química 36]

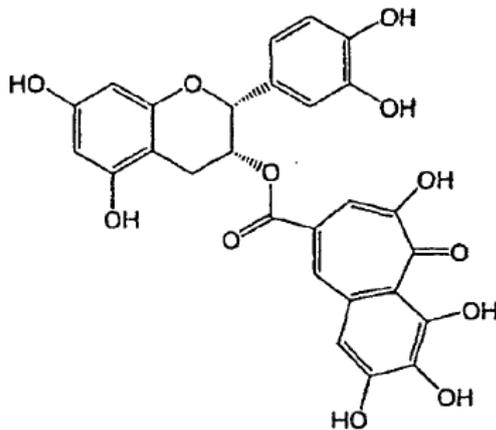


Fórmula (22)

o 2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo de fórmula (23):

5

[Fórmula química 23]



Fórmula (23)

Los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona anteriores, que son ingredientes activos del agente antiobesidad de la presente invención, se pueden obtener mediante extracción con disolventes a partir de materiales naturales, tales como té verde, té negro, té oolong o también mediante síntesis química o síntesis enzimática de los materiales.

10

Con respecto a los materiales naturales que sean materias primas de extracción, se pueden usar las hojas del té tal cual o en forma molida. El disolvente para su uso en la extracción puede ser agua, un disolvente orgánico, mezclas de estos disolventes o similares, y preferentemente, agua caliente. El extracto obtenido se puede separar y purificar usando un vehículo adecuado para la separación. Se puede usar cualquier vehículo si el vehículo puede absorber el compuesto que contiene un anillo de benzotropolona anterior y separarlo con un disolvente adecuado para la

15

separación. Por ejemplo, se pueden usar adsorbentes sintéticos a base de estireno o dextrano para la separación y purificación. Después de cargar el extracto anterior sobre dicho vehículo, se usa un disolvente adecuado para separar el compuesto que contiene un anillo de benzotropolona anterior. Más específicamente, se puede obtener el compuesto que contiene un anillo de benzotropolona anterior para su uso en el agente antiobesidad de la presente invención según las descripciones en el ejemplo 1 de la presente memoria descriptiva. El compuesto que contiene un anillo de benzotropolona obtenido de esta manera se puede usar en forma condensada o como un polvo obtenido mediante procedimientos tales como liofilización.

Los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona anteriores se pueden sintetizar con enzimas, tales como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), o con oxidantes, tales como ferricianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) como catalizador usando, como materias primas, catequinas (3-O-galato de epigallocatequina, 3-O-galato de epicatequina, epicatequina, epigallocatequina y similares) y ácido gálico. Específicamente, se puede realizar la síntesis según las descripciones, por ejemplo, en los ejemplos 2 y 7 de la presente memoria descriptiva.

El agente antiobesidad de la presente invención tiene una fuerte acción inhibitoria frente a la lipasa, especialmente, la lipasa pancreática. Se puede medir la actividad inhibitoria de la lipasa mediante cualquier procedimiento de los ensayos de actividad de lipasa descritos en las solicitudes relacionadas mostradas en la sección Técnica anterior. Por ejemplo, se puede lograr el ensayo usando el éster oleato de 4-metilumbeliferona fluorescente como un sustrato para medir la fluorescencia de 4-metilumbeliferona producida por reacción con lipasa. Es ejemplar el procedimiento descrito en el ejemplo 6, que permite una medición de la actividad inhibitoria de la lipasa. La actividad inhibitoria de la lipasa se puede expresar, por ejemplo, como  $CI_{50}$ , un volumen de muestra que produce una inhibición de un 50 %.

Los agentes antiobesidad de la presente invención tienen una potente actividad inhibitoria de la alfa-glucosidasa. Se puede medir la actividad mediante cualquier procedimiento de los ensayos de actividad descritos en las solicitudes relacionadas mostradas en la sección Técnica anterior. Es ejemplar el procedimiento descrito en el ejemplo 11, que permite una medición de la actividad inhibitoria de la alfa-glucosidasa. La actividad inhibitoria de la alfa-glucosidasa se puede expresar, por ejemplo, como  $CI_{50}$ , un volumen de muestra que produce una inhibición de un 50 %.

Los productos purificados o productos parcialmente purificados de los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona anteriores se pueden usar en solitario como agente antiobesidad o se pueden combinar con un disolvente o un vehículo para que se usen como un agente antiobesidad. Es preferente que el disolvente o el vehículo se pueda usar de manera segura como un alimento o un producto farmacéutico, con vistas a su uso como los alimentos y bebidas a continuación y/o productos farmacéuticos. El agente antiobesidad de la presente invención tiene diversas aplicaciones de uso; es ejemplar el uso del agente como alimentos y bebidas o composiciones farmacéuticas que se usen para un estudio experimental y estén destinados a la prevención de la acumulación de triglicéridos.

### Alimentos y bebidas

El agente antiobesidad de la presente invención puede estar en forma de un alimento y bebida que suprima la elevación indeseable de los triglicéridos en sangre asociada con la ingesta de grasas en las comidas. Los ejemplos preferentes de alimentos y bebidas comprenden los que se toman a diario; por ejemplo, té verde, té de cebada, té oolong, té negro, café, bebidas isotónicas, agua, condimentos y aderezos. Sin embargo, los alimentos y bebidas también pueden ser los que se consumen comúnmente: refrescos, cócteles, cerveza, *whisky*, licor destilado (*shochu*), vino, *sake*, condimentos, aderezos, arroz saborizado, alimentos procesados, alimentos instantáneos, alimentos en envases retortables, chocolate, nata fresca, dulces occidentales, productos lácteos, alimentos naturales, complementos y similares.

En el agente antiobesidad de la presente invención que está en forma de alimento y bebida, los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona de fórmulas (13), (15) a (20), (22) o (23) están contenidos de modo que la ingesta del compuesto sea de 0,1 mg a 10 g por comida, preferentemente de 0,5 mg a 5 g. Sin embargo, los compuestos de fórmulas (13), (15) a (20), (22) o (23) usados en el agente antiobesidad de la presente invención son altamente seguros porque derivan de alimentos y, de esta manera, no hay un límite superior sustancial en la cantidad de adición a los alimentos y bebidas.

### Composición farmacéutica

También se puede usar el agente antiobesidad de la presente invención que sirve como un inhibidor de la lipasa como una composición farmacéutica destinada a suprimir la absorción de la grasa derivada de la alimentación y a prevenir el incremento indeseable de triglicéridos en sangre y/o a reducir los triglicéridos en sangre incrementados. También se puede usar el agente antiobesidad que sirve como un inhibidor de la alfa-glucosidasa como una composición farmacéutica destinada a suprimir la absorción de la grasa derivada de la alimentación y a prevenir el incremento indeseable de triglicéridos en sangre y/o a reducir los triglicéridos en sangre incrementados. Son preferentes los agentes destinados a la administración por vía oral; los ejemplos del agente comprenden bebidas, comprimidos, cápsulas, granulados, polvos, caramelos, gotas y similares. Los agentes contienen un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona de fórmulas (13), (15) a (20), o (23) en cantidades de 0,1 mg a 10 g por dosis,

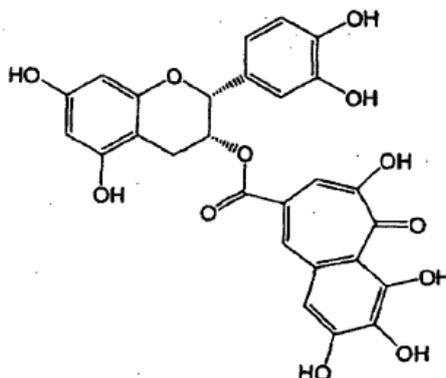
preferentemente de 0,5 mg a 5 g.

- 5 La composición farmacéutica de la presente invención es segura para su dosificación a largo plazo debido a la alta seguridad de la actividad de alfa-glucosidasa y de lipasa de los componentes inhibidores. Por consiguiente, también se puede tomar a diario la composición para prevenir o revertir la obesidad como una enfermedad relacionada con el estilo de vida.

**Compuesto novedoso**

- 10 Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto mostrado a continuación como un compuesto novedoso presente en el té negro.

[Fórmula química 38]



- 15 Este compuesto es útil como material antiobesidad.

La presente invención se describe más específicamente en los ejemplos a continuación, pero no se limita a los mismos.

**20 Ejemplo 1**

**Separación en LH-20**

- 25 Se extrajeron hojas del té negro originarias de Assam (India) con agua caliente a 90 °C y se liofilizaron, y se añadió agua destilada al producto resultante seguido de calentamiento y disolución para obtener una solución de concentración 10 mg/ml. Mientras se calentaba la solución de 60 a 70 °C en un baño de agua caliente, se cargaron 15 ml de la misma en 60 ml de Sephadex LH-20 (GE Healthcare Biosciences, Ltd.). Después de lavar con 45 ml de acetona al 20 % (acetona:agua destilada=2:8, v/v) y lavado posterior con 60 ml (1 volumen de columna) de la misma, se efectuó la elución con 4 volúmenes de columna de cada uno de los siguientes disolventes: acetona al 30 % (acetona:agua destilada=3:7, v/v); acetona al 50 % (acetona:agua destilada=1:1, v/v); y acetona al 60 % (acetona:agua destilada=6:4, v/v), y se fraccionó la solución resultante en 1 volumen de columna para cada fracción. Se concentraron a vacío dos mililitros tomados cada uno de un total de catorce fracciones de 60 ml y, entonces, se prepararon 0,1 ml de una solución acuosa de dimetilsulfóxido al 50 % (dimetilsulfóxido:agua destilada=1:1, v/v) y la solución se sometió a una medición de la actividad inhibidora de la lipasa. Además, se concentró a vacío y se liofilizó cada fracción, y se calculó el volumen de recuperación a partir de los sólidos resultantes; se usaron los cálculos para el análisis de componentes efectuado en el ejemplo 5. Los pesos y las tasas de recuperación de la actividad inhibidora de la lipasa se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

40

Tabla 1: Localización de la actividad en fracciones de LH20

Fra. n.º	Fracción	Relación de abundancias de actividad (%)		Relación de abundancias de rendimiento (%)	
1	acetona al 20 %_1	0,0005	5,0	30,6	54,3
2	acetona al 20 %_2	5,01		23,7	
3	acetona al 30 %_1	4,72	20,1	3,7	16,3

Fra. n.º	Fracción	Relación de abundancias de actividad (%)		Relación de abundancias de rendimiento (%)
4	acetona al 30 %_2	6,30		4,7
5	acetona al 30 %_3	5,63		5,1
6	acetona al 30 %_4	3,48		2,8
7	acetona al 50 %_1	14,12	70,9	4,8
8	acetona al 50 %_2	33,59		11,2
9	acetona al 50 %_3	17,08		5,1
10	acetona al 50 %_4	6,15		2,5
11	acetona al 60 %_1	2,53	3,9	1,3
12	acetona al 60 %_2	1,05		1,8
13	acetona al 60 %_3	0,20		1,2
14	acetona al 60 %_4	0,13		1,5

Como resultado de la medición de la actividad inhibitora de la lipasa según el procedimiento descrito en el ejemplo 6, fracciones de acetona al 20 %\_1 y acetona al 20 %\_2, que presentaban un alto rendimiento, se descubrió que cada una contenía polisacáridos y cafeínas y que prácticamente no tenían actividad. Por otra parte, en la fracción de acetona al 50 %\_2, que presentaba el siguiente rendimiento más alto (11,2 % en peso), se eluyó la actividad de un 33,6 %; en la entrada posterior, fracción de acetona al 50 %\_3, se eluyó la actividad de un 17,1 %. En las porciones de elución de acetona al 50 % que comprendían estas fracciones, se descubrió que se eluyó un 70,9 % de la actividad. En el ensayo descrito en el ejemplo 5, se eluyeron muchos de los compuestos que contenían un anillo de benzotropolona activos con acetona al 50 %, lo cual es realmente consistente con la alta actividad descubierta en porciones de elución de acetona al 50 %.

## Ejemplo 2

### Síntesis de los compuestos de prueba

1. purpurogalina (ejemplo de referencia)
2. ácido carboxílico de purpurogalina
3. epiteaflagalina (ejemplo de referencia)
4. 3-O-galato de epiteaflagalina (ejemplo de referencia)
5. teaflavato A
6. teadibenzotropolona A
7. trímero de digalato de teaflavina 1 (TFdiGA-tri1)
8. trímero de digalato de teaflavina 2 (TFdiGA-tri2)
9. ácido epiteaflávico
10. teaflavanina (ejemplo de referencia)
11. 3-O-galato del ácido epiteaflávico
12. 2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo

### Síntesis de epiteaflagalina (3) y 3-O-galato de epiteaflagalina (4)

Se añadieron a epigalocatequina (0,2 mmol) (EGC; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) o 3-O-galato de epigalocatequina (0,2 mmol) (EGCG; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) ferricianuro de potasio (0,8 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (0,8 mmol) para preparar 150 ml de una solución acuosa y se enfrió la solución en hielo. Se hicieron gotear cincuenta mililitros de una solución acuosa de pirogalol (0,2 mmol) en la solución y se continuó la agitación de la mezcla durante una hora. Se cargó la solución de reacción en un volumen de 20 ml de Sep-pak C18 (Waters Corp.) y, después de lavar con 60 ml de agua y lavado posterior con agua/acetoneitrilo al 5 %, se usó agua/acetoneitrilo al 50 % que contenía ácido fórmico al 0,1 % para eluir un producto de reacción. Se liofilizó y purificó el producto eluido mediante HPLC preparativa mostrada a continuación.

Se cargó el producto de reacción de EGC y pirogalol en una YMC Pak Polymer C-18 (20 x 300 mm, YMC Co., Ltd.) y se realizó una elución con un gradiente lineal de acetoneitrilo al 30-50 % (6 ml/min, 60 minutos) en presencia de ácido fórmico al 0,1 %. Se liofilizó el componente eluido a entre 48 y 50 minutos para obtener 4 mg de un sólido marrón (epiteaflagalina (3)). Además, se liofilizó el componente eluido a entre 68 y 70 minutos en este cromatograma para obtener 2 mg de un sólido marrón (purpurogalina (1)).

Se cargó el producto de reacción de EGCG y pirogalol en Develosil C30-UG-5 (20 mm x 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.) y se realizó una elución con un gradiente lineal de acetonitrilo al 15-50 % (6 ml/min, 60 minutos) en presencia de ácido fórmico al 0,1 %. Se liofilizó el componente eluido a entre 44 y 46 minutos para obtener 6 mg de un sólido marrón (3-O-galato de epiteaflagalina (4)). Además, se liofilizó el componente eluido a entre 48 y 50 minutos en este cromatograma para obtener 3 mg de un sólido marrón (purpurogalina (1)).

De la misma manera que en las reacciones anteriores, se sometieron a reacción 800 mg de ácido gálico para obtener 65 mg de ácido carboxílico de purpurogalina (2), que se produce mediante polimerización de dos moléculas de ácido gálico. Además, se sometieron a reacción 100 mg de 3-O-galato de epicatequina (ECG) para obtener 3 mg de teaflavato A (5), que se produce mediante polimerización de dos moléculas de ECG. Adicionalmente, se sometieron a reacción 400 mg de cada una de epicatequina (EC) y EGCG para obtener un producto principal, 3-O-galato de teaflavina, así como 2 mg de un subproducto, teadibenzotropolona A (6). De la misma manera que en la reacción anterior, se sometieron a reacción 200 mg de cada una de 3-O-galato de epicatequina (ECG) y EGCG, y se sometieron a reacción 12 mg de la 3,3'-digalato de teaflavina resultante y 20 mg de ECG para obtener 1,7 mg de TFdiGA-tri1 (7) y 0,6 mg de TFdiGA-tri2 (8). También se obtuvieron los siguientes compuestos: 48 mg de ácido epiteaflávico (9) obtenido por reacción de 330 mg de ácido gálico y 101 mg de EC; 12 mg de teaflavanina (10) obtenida por reacción de 869 mg de pirogalol y 400 mg de EC; y 37 mg de 3-O-galato del ácido epiteaflávico (11) y 3,3 mg de 2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo (12) que se obtuvieron simultáneamente por reacción de 470 mg de ácido gálico y 221 mg de ECG.

### Ejemplo 3

#### 25 Análisis estructurales de los compuestos

Se realizaron mediciones mediante EM y RMN de los compuestos obtenidos en el ejemplo 2. Se determinaron sus espectros de masas con Q-TOF Premier (Micromass Co., Ltd., Reino Unido) usando una fuente de iones de ESI Z-Spray, en modo V negativo. Voltaje de cono: 45 V, Voltaje capilar: 3 KV, Temp. de fuente: 80 °C, Temp. de desolvatación: 180 °C. Se efectuó el defecto de masa con LockSpray, y se usó como referencia leucina-enkefalina (m/z 554,2615 (M-H)<sup>-</sup>).

La masa exacta, la fórmula molecular y el valor de masa teórico de cada compuesto se muestran en la tabla 2. [Tabla 2]

Tabla 2: Resultados de espectrometría de masas de los compuestos

Compuesto n.º	Compuesto	Valor de masa real m/z	Fórmula molecular	Valor cal. ma/z
1	purpurogalina	219,0285	C11H8O5	219,0293
2	ácido carboxílico de purpurogalina	263,0183	C12H8O7	263,0192
3	epiteaflagalina	399,0701	C20H16O9	399,0716
4	3-O-galato de epiteaflagalina	551,0818	C27H20O13	551,0826
5	teaflavato A	851,1471	C43H32O19	851,1460
6	teadibenzotropolona A	973,1832	C50H38O21	973,1827
7	TFdiGA-tri1	1279,2185	C64H46O29	1279,2203
8	TFdiGA-tri2	1279,2218	C64H46O29	1279,2203
9	ácido epiteaflávico	427,0666	C21H16O10	427,0665
10	teaflavanina	383,0764	C20H16O8	383,0767
11	3-O-galato del ácido epiteaflávico	579,0778	C28H20O14	579,0775
12	2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo	535,0883	C27H20O12	535,0877
14	3-O-galato de teaflavanina	535,0871	C27H20O12	535,0877
15	EGCG-catecol	535,0885	C27H20O12	535,0877

Los compuestos n.º 1, 3, 4, 10, 14 son ejemplos de referencia.

**Ejemplo 4**

**5 (Cuantificación en el extracto de hoja del té)**

Se realizaron las mediciones mediante CL-EM/EM con 4000 Q TRAP (Applied Biosystems Inc.) usando Turbolon-Spray en modo negativo en las siguientes condiciones: Energía de colisión: 46 eV (neg.); Voltaje de pulverización iónica: 4500 V; Temperatura: 450 °C.

10

El tiempo de elución y los canales de medición de cada compuesto en son como se muestra en la tabla 3.

[Tabla 3]

15

Tabla 3: Parámetros cuantitativos de CL-EM/EM

Compuesto	Compuesto	T.R.	Q1/Q3
1	purpurogalina	10,99	219,0/191,0
2	ácido carboxílico de	8,01	263,0/190,9
3	epiteaflagalina	8,64	399,1/233,0
4	3-O-galato de epiteaflagalina	11,54	551,1/233,1
5	teaflavato A	14,46	851,2/579,1
6	teadibenzotropolona A	11,49	973,2/227,1
7	TFdiGA-tri 1	15,01	1277,2/579,1
8	TFdiGA-tri2	17,37	1277,2/697,1

Los compuestos 1, 3 y 4 son ejemplos de referencia.

20

Columna: YMC-Polymer C18, S-6 µm (YMC Co., Ltd., 2 mmφ x 150 mm)

Caudal: 0,2 ml/min

Temp. de columna: 40 °C

Fase móvil A: 0,1 % V/V HCOOH/H<sub>2</sub>O

Fase móvil B: 0,1 % V/V HCOOH/CH<sub>3</sub>CN

25

Programa de gradientes: A/B=91/9 (0 min)----> A/B=40/60 (17 min)----> A/B=15/85 (17,1 min)----> A/B=15/85 (17,1 a 19 min).

Se usaron las condiciones anteriores para someter a ensayo un extracto en agua caliente de té CTC indio de Assam. Se descubrió que los compuestos 2 a 8 estaban presentes en las hojas del té. Los valores cuantitativos se muestran en la tabla 4.

30

[Tabla 4]

35

Tabla 4: Valores cuantitativos de los componentes del té negro

Compuesto	Compuesto	µg/g de extracto
1	purpurogalina	0,15
2	ácido carboxílico de purpurogalina	166,00
3	epiteaflagalina	224,00
4	3-O-galato de epiteaflagalina	369,0
5	teaflavato A	165,5
6	teadibenzotropolona A	35,95
7	TFdiGtri1	67,20
8	TFdiGAtri2	61,55

Los compuestos 1, 3 y 4 son ejemplos de referencia.

### Ejemplo 5

5

#### (Distribución de cada compuesto en la fracción de hoja del té)

Se realizaron las mediciones mediante CL-EM/EM con Q-TOF Premier (Micromass Co., Ltd., Reino Unido) usando una fuente de iones de ESI Z-Spray, en modo V negativo. Voltaje de cono: 33 V, Voltaje capilar: 3 KV, Temp. de fuente: 150 °C, Temp. de desolvatación: 250 °C. Se efectuó el defecto de masa con LockSpray, y se usó como referencia leucina-encefalina (m/z 554,2615 [M-H]<sup>-</sup>).

Columna: YMC-Polymer C18, S-6 µm (YMC Co., Ltd., 2 mmφ x 150 mm)  
 Caudal: 0,2 ml/min  
 Temp. de columna: 40 °C  
 Fase móvil A: 0,1 % V/V HCOOH/H<sub>2</sub>O  
 Fase móvil B: 0,1 % V/V HCOOH/CH<sub>3</sub>CN  
 Programa de gradientes: A/B=70/30 ---> AB=50/50 (20 min) ---> AB=50/50 (25 min)

Se usaron las condiciones anteriores para analizar cada una de las fracciones de hojas del té originarias de Assam (India), que se obtuvieron mediante fraccionamiento en el ejemplo 1. Se detectó el compuesto 2 (m/z 263,02, T.R.=9,29 min) en la fracción de acetona al 30 %<sub>1</sub>, se detectó el compuesto 3 (m/z 399,07, T.R.=9,83 min) en las fracciones de acetona al 50 %<sub>2</sub> y acetona al 50 %<sub>3</sub>, se detectó el compuesto 4 (m/z 551,08, T.R.=13,48 min) en las fracciones de acetona al 50 %<sub>3</sub> y acetona al 50 %<sub>4</sub>, se detectó el compuesto 5 (m/z 851,15, T.R.=17,50 min) en la fracción de acetona al 50 %<sub>4</sub>, se detectó el compuesto 9 (m/z 427,07, T.R.=8,60 min) en la fracción de acetona al 50 %<sub>3</sub>, se detectó el compuesto 10 (m/z 383,08, T.R.=9,65 min) en las fracciones de acetona al 30 %<sub>3</sub> y acetona al 30 %<sub>4</sub>, se detectó el compuesto 11 (m/z 579,08, T.R.=13,86 min) en la fracción de acetona al 50 %<sub>2</sub> y se detectó el compuesto 12 (m/z 535,09, T.R.=13,90 min) en la fracción de acetona al 50 %<sub>2</sub>.

### Ejemplo 6

#### Medición de la actividad inhibidora de la lipasa

Se sintetizaron y purificaron las muestras de medición según el procedimiento del ejemplo 2.

35

1. purpurogalina (ejemplo de referencia)
2. ácido carboxílico de purpurogalina
5. teaflavato A
6. teadibenzotropolona A
- 40 7. trímero de digalato de teaflavina 1 (TFdiGA-tri1)
8. trímero de digalato de teaflavina 2 (TFdiGA-tri2)
9. ácido epiteaflávico
10. teaflavanina (ejemplo de referencia)
11. 3-O-galato del ácido epiteaflávico
- 45 12. 2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo
13. EGCG (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (ejemplo de referencia)

#### Procedimiento de medición

50

Se realizó la medición de la actividad de lipasa usando como sustrato el éster oleato de 4-metilumbeliferona fluorescente (4-MUO, Sigma-Aldrich Corp.) para medir la fluorescencia de 4-metilumbeliferona producida por reacción. En la medición, se usó como tampón Tris-HCl 13 mM (pH 8,0), que contenía NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 1,36 mM. Lo siguiente se sometió a una medición enzimática: el sustrato 4-MUO, que se disolvió en una solución de DMSO 0,1 M seguido de dilución de la solución 4000 veces con el tampón anterior; y como lipasa, lipasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich Corp.), que se preparó como una solución 400 U/ml usando igualmente el tampón anterior.

55

Se inició una reacción enzimática mediante las siguientes etapas en una condición a 25 °C: añadir a una microplaca de 96 pocillos 50 µl de una solución tampón de 4-MUO y 25 µl de agua destilada (o una solución acuosa de muestra) para cada pocillo; mezclarlos; y, entonces, añadir 25 µl de una solución tampón de lipasa a cada pocillo. Después de una reacción de 30 minutos, se añadieron 100 µl de un tampón de ácido cítrico 0,1 M (pH 4,2) para terminar la reacción, y se midió la fluorescencia de 4-metilumbeliferona (longitud de onda de excitación: 355 nm, longitud de onda de fluorescencia: 460 nm) producida por la reacción con un lector de placas de fluorescencia (Fluoroskan Asent CF de Labsystems, Inc.).

65

Se determinó la actividad inhibidora de las muestras de prueba como CI<sub>50</sub> (µM), un volumen de muestra que produce

una inhibición de un 50 %, con respecto a la actividad de un control (agua destilada).

## Resultados

5 La actividad inhibidora de la lipasa de los compuestos 1, 2 y 5 a 14 se muestra en la tabla 5.

[Tabla 5]

Tabla 5: Actividad inhibidora de la lipasa por mol

10

Compuesto n.º	Compuesto	CI <sub>50</sub> µM
-	pirogalol	17,273
1	purpurogalina	0,413
2	ácido carboxílico de purpurogalina	4,165
5	teaflavato A	0,202
6	teadibenzotropolona A	0,178
7	TFdiGA-tri1	0,135
8	TFdiGA-tri2	0,138
9	ácido epiteaflávico	4,626
10	teaflavanina	0,984
11	3-O-galato del ácido epiteaflávico	0,266
12	2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo	0,207
13	EGCG	0,349

Los compuestos n.º 1, 10 y 13 son ejemplos de referencia.

15 Todos los compuestos que contienen un anillo de benzotropolona presentaban actividad inhibidora de la lipasa. En 3-O-galato de (-)-epigallocatequina (EGCG, compuesto 13), que se sabe que presenta una fuerte inhibición de la lipasa, su CI<sub>50</sub> fue 0,349 µM. Los compuestos distintos del ácido carboxílico de purpurogalina (2) y del ácido epiteaflávico (9) que tienen un residuo de ácido carboxílico libre presentaron una actividad equivalente o más fuerte que EGCG, lo que demostró que su anillo de benzotropolona contribuye a su actividad inhibidora de la lipasa. Se descubrió que un residuo de ácido carboxílico servía para reducir la actividad. Por consiguiente, en la fórmula (1), R<sub>3</sub> es preferentemente un grupo distinto de COOH.

20

### Ejemplo 7 (ejemplo de referencia)

#### (1) Preparaciones de los compuestos

25

#### Síntesis de los compuestos 12 y 14 (3-O-galato de teaflavanina) con peroxidasa

30 Se usaron peroxidasa de rábano picante de Zyined Laboratories, Inc. como peroxidasa, 3-O-galato de epicatequina (ECG) de un 90 % de pureza o superior, que se purificó mediante HPLC de fase inversa a partir del extracto de té, y pirogalol de Nacalai Tesque, Inc. (99,0 % de pureza).

#### (2) Reacciones

35 Se disolvieron, en 10 ml de un tampón de ácido acético 0,058 M, 4,3 mg de peroxidasa de rábano picante, y a esta solución se añadieron 250 mg de ECG (0,566 mmol) disueltos en 500 µl de acetona y 192,8 mg de pirogalol (1,53 mmol) disueltos en 500 µl de acetona seguido de agitación. En una condición a 30 °C, se añadieron 450 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (p/v) para iniciar la reacción. Para la mejora de la eficacia de la reacción, se añadieron dos veces 450 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (p/v), es decir, después de 10 y 20 minutos desde la iniciación de la reacción. Se añadieron 192,8 mg de pirogalol (1,53 mmol) y 450 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % después de 30 minutos desde la iniciación de la reacción, y, entonces, se hicieron reaccionar durante otros 30 minutos.

40

Después de 60 minutos desde la iniciación de la reacción, se cargó la solución de reacción en una fase estacionaria de fase inversa (Waters Corp., Sep-Pak, C18-Vac 20 cm<sup>3</sup> (5 g)) seguido de lavado con 40 ml de agua destilada. Entonces, se realizaron eluciones consecutivas con 20 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 20 % (v/v) y, entonces, con 40 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 70 % (v/v). Se concentró y liofilizó el eluato de acetoneitrilo al 70 % para obtener 68,0 mg de una fracción que contenía los compuestos 12 y 14 (3-O-galato de teaflavanina).

Se purificó la mezcla que contenía los compuestos 12 y 14 (3-O-galato de teaflavanina) mediante HPLC en las condiciones a continuación.

Se cargó la mezcla en una YMC-Pak Polymer C-18 (20 x 300 mm, YMC Co., Ltd.), y en presencia de ácido fórmico al 0,1 %, se realizaron una elución isocrática de 30 minutos con acetoneitrilo al 30 % y, entonces, una elución con un gradiente lineal de acetoneitrilo al 30-45 % (6 ml/min, 150 minutos). Se liofilizaron el componente eluido a entre 144 y 148 minutos y el eluido a entre 158 y 162 minutos para obtener 3,9 mg del compuesto idéntico al compuesto 12 mostrado en el ejemplo 2 y 3,0 mg del compuesto 14 (3-O-galato de teaflavanina). Adicionalmente, se liofilizó el componente eluido a entre 108 y 113 minutos en este cromatograma para obtener 36 mg de un sólido marrón (compuesto 1 en el ejemplo 2: purpuroglina).

### Ejemplo 8 (ejemplo de referencia)

#### Análisis instrumental y estructural de los productos de reacción

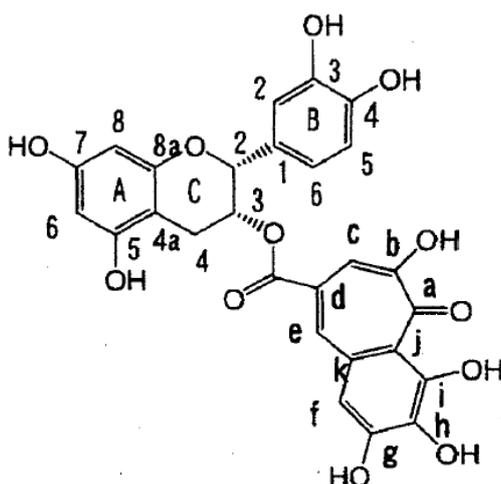
Se sometieron los compuestos 12 y 14, que se obtuvieron en el ejemplo 7, a mediciones mediante EM y RMN.

Se determinaron sus espectros de masas con Q-TOF Premier (Micromass Co., Ltd., Reino Unido) usando una fuente de iones de ESI Z-Spray, en modo V negativo. Voltaje de cono: 33 V, Voltaje capilar: 2,7 kV, Temp. de fuente: 80 °C, Temp. de desolvatación: 180 °C. Se efectuó el defecto de masa con LockSpray, y se usó como referencia leucina-encefalina (m/z 554.2615 [M-H]<sup>-</sup>). Se fijó la energía de colisión en 4 eV en el momento de la medición mediante EM y en 22 eV en el momento de la medición mediante EM/EM.

Los compuestos 12 y 14 produjeron iones moleculares de m/z 535,0883 y 535,0871 [M-H]<sup>-</sup>, respectivamente, y se determinó su fórmula molecular como C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> (valor teórico: 535,0877). Como resultado de la medición mediante EM/EM en la que se fijó la energía de colisión en 22 eV, se detectaron iones de fragmentos de 263,07 y 219,07 en el compuesto 12 y los de 383,08 y 169,01 en el compuesto 14. Se descubrió que el compuesto 14 era un compuesto conocido, 3-O-galato de teaflavanina.

Se realizó una medición mediante RMN para confirmar la estructura del compuesto 12. Los espectros de RMN de <sup>13</sup>C y RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 12 se muestran en las figs. 1 y 2, respectivamente. La medición mediante RMN se realizó en las condiciones a continuación. Se disolvieron, en CD<sub>3</sub>OH, 3 mg del compuesto 12 obtenido en el ejemplo 7 y se fijaron los picos residuales de protones y <sup>13</sup>C de CD<sub>3</sub>OH, 83:30 y δ48,97 como patrones internos. Se realizaron las mediciones según los siguientes procedimientos con un espectrómetro DMX-750 (BRUKER BIOSPIN, Alemania): RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C}-HSQC, <sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C}-HMBC, TOCSY, DQF-COSY, NOESY y ROESY. Como resultado, se confirmó que el compuesto 12, que se obtuvo en el ejemplo 7, tenía la estructura mostrada a continuación.

[Fórmula química 39]



La numeración de cada átomo se muestra en la fórmula estructural anterior.

Los resultados de medición mediante RMN y las asignaciones de señal se muestran a continuación.

5

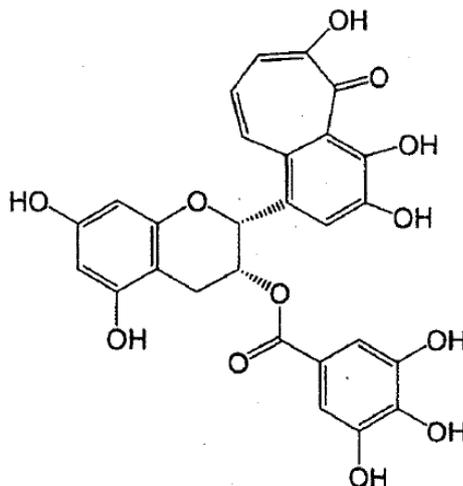
[Tabla 6]

		<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C
		$\delta$	<i>J</i> (Hz)	$\delta$
A(C)-anillo	C-2	5,09 s.a.		78,23
	C-3	5,58 d.d.		71,75
	C-4	2,94 d.d.	1-7,4, 1,9	26,48
	A-5	3,04 d.d.	17,4, 4,5	157,07
	A-6	6,02 d	2	96,75
	A-7	OH		157,91
	A-8	5,97 d		95,8
	A-8a			158,07
	C-4a			99,07
	B-anillo	B-1		
B-2		6,95 d	1,4	114,76
B-3		OH		146,25
B-4		OH		146,11
B-5		6,72 d	8	116,04
B-6		6,83 d.d.	8, 1,4	118,87
benzotropolona		a	C=O	
	b	OH		154,63
	c	7,51 d	1	114,45
	d			125,12
	e	8,03 s.a.		139,62
	f	6.91 s		114,76
	g	OH		152,62
	h	OH		138,44
	i	OH		153,73
	j			116,29
	k			131,96

La estructura del compuesto 14 también se muestra a continuación.

10

[Fórmula química 40]



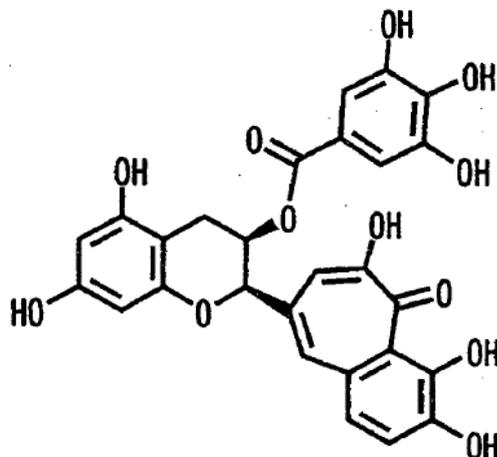
### Ejemplo 9

#### 5 Síntesis del compuesto 15

Se añadieron, a 229,2 mg de 3-O-galato de epigalocatequina (0,5 mmol) (EGCG; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 3,293 g de ferricianuro de potasio (10 mmol) (Nacalai Tesque, Inc.) y 0,84 g de NaHCO<sub>3</sub> (10 mmol) para preparar 400 ml de una solución acuosa, y la solución se enfrió en hielo. En la solución, se hicieron gotear 100 ml de una solución acuosa de 275,3 mg de catecol (2,5 mmol) durante una hora, y la mezcla se mantuvo en agitación. Se cargó la solución de reacción en 300 ml de Sephadex LH-20 (GE Healthcare Biosciences, Ltd.) y se realizaron eluciones con 1 l de agua/acetona al 40 %, 1,2 l de agua/acetona al 45 % y 900 ml de agua/acetona al 50 %, consecutivamente, seguido de liofilización. En consecuencia, se obtuvieron 77 mg de una fracción al 45 % que contenía EGCG-catecol. Se purificó la fracción mediante HPLC preparativa mostrada a continuación.

Se cargó la fracción que contenía EGCG-catecol en una YMC-Pak Polymer C-18 (20 x 300 mm, YMC Co., Ltd.), y a un caudal de 6 ml/min en presencia de ácido fórmico al 0,1 %, se realizó la elución con un gradiente lineal de acetonitrilo al 25-45 % (75 minutos), y, entonces, se mantuvo una elución isocrática de 30 minutos con acetonitrilo al 45 %. Se liofilizó el componente eluido a entre 92 y 95 minutos para obtener 24 mg de un sólido marrón (compuesto 15: EGCG-catecol). La estructura del compuesto 15 se muestra a continuación.

[Fórmula química 41]



25

### Ejemplo 10

#### Medición de la actividad de lipasa

30

#### Procedimiento de medición

Se realizó la medición de la actividad de lipasa usando como sustrato el éster oleato de 4-metilumbeliferona fluorescente (4-MUO, Sigma-Aldrich Corp.) para medir la fluorescencia de 4-metilumbeliferona producida por reacción. En la medición, se usó como tampón Tris-HCl 13 mM (pH 8,0), que contenía NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 1,36 mM. Lo siguiente se sometió a una medición enzimática: el sustrato 4-MUO, que se disolvió en una solución de DMSO 0,01 M seguido de dilución de la solución 667 veces con el tampón anterior; y como lipasa, lipasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich Corp.: tipo VI-S), que se preparó como una solución 400 U/ml usando igualmente el tampón anterior.

Se inició una reacción enzimática mediante las siguientes etapas en una condición a 25 °C: añadir a una microplaca de 96 pocillos 50 µl de solución tampón de 4-MUO y 25 µl de agua destilada (o solución acuosa de muestra) para cada pocillo; mezclarlos; y, entonces, añadir 25 µl de una solución tampón de lipasa a cada pocillo. Se diseñó esta medición para incrementar la solubilidad del sustrato para posibilitar que la actividad inhibidora se midiera con más exactitud, puesto que la concentración del sustrato era de 7,5 µM en el momento de la reacción, lo que demostró su dilución en comparación con la concentración de 12,5 µM lograda en ejemplo 6 y se incrementó la concentración de DMSO. Después de una reacción de 30 minutos, se añadieron 100 µl de tampón de ácido cítrico 0,1 M (pH 4,2) para terminar la reacción y se midió la fluorescencia de 4-metilumbeliferona (longitud de onda de excitación: 355 nm, longitud de onda de fluorescencia: 460 nm) producida por la reacción con un lector de placas de fluorescencia (Fluoroskan Asent CF de Labsystems, Inc.).

Se determinaron las actividades inhibitoras de las muestras de prueba como CI<sub>50</sub> (µM), un volumen de muestra que produce una inhibición de un 50 %, con relación a la actividad de un control (agua destilada).

Se midió la actividad inhibidora de la lipasa de los compuestos 3, 4, 12, 13, 14 y 15. Los resultados se muestran en la tabla 7.

[Tabla 7]

Tabla 7: Actividad inhibidora de la lipasa por mol

Compuesto	Compuesto	CI <sub>50</sub> µM
3	lepiteaflagalina	0,956
4	3-O-galato de epiteaflagalina	0,125
12	2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5Fl-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo	0,096
13	EGCG	0,349
14	3-O-galato de teaflavanina	0,168
15	EGCG-catecol	0,104

Los compuestos 3, 4, 13, 14 son ejemplos de referencia.

Todos los compuestos 12, 14 y 15 tenían una actividad más fuerte que el control positivo, EGCG, y presentaban una actividad equivalente a o más fuerte que el compuesto 4 (divulgación pública de patente japonesa 2009-114079), que se conoce como un inhibidor de la lipasa.

Las estructuras de los compuestos 14 y 15 se muestran como antioxidantes y agentes farmacéuticos antiinflamatorios en la divulgación pública de patente japonesa 2007-504168, pero sus inhibiciones de la lipasa y de la alfa-glucosidasa no eran conocidas.

Se pueden sintetizar los compuestos 12 y 14 usando polifenol oxidasa (PPO) u oxidantes tales como ferricianuro de potasio, además de la enzima mostrada en los ejemplos. Además, no solo se pueden sintetizar los compuestos mediante una combinación de ECG y pirogalol, sino también por reacción con ácido gálico.

### Ejemplo 11

#### Medición de la actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa de diversos compuestos que contienen un anillo de benzotropolona

Se preparó un tampón de fosfato de sodio 1 M mezclando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 M y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,1 M y ajustando la mezcla a pH 7,0, y a lo mismo se añadieron 2 g/l de seroalbúmina bovina (Nacalai Tesque, Inc., F-V, pH 5,2, 96% de pureza) y 0,2 g/l de NaN<sub>3</sub> (Nacalai Tesque, Inc., un reactivo de calidad especial). Para preparar una

solución de enzima, se disolvió alfa-glucosidasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., derivada de levadura, 100 unidades/mg) en el tampón anterior para lograr 0,5 unidades/mg de proteína/ml (100 µg/20 ml). Para preparar una solución de sustrato, se disolvió p-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosido (Nacalai Tesque, Inc., un reactivo de calidad especial) en el tampón anterior para lograr una concentración de 5 mM (7,525 mg/5 ml).

5 Entre las muestras usadas para los ensayos, el 3-O-galato de epigallocatequina (compuesto 13: EGCG), un control positivo, fue un producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., y los compuestos 1, 3, 4, 5, 11, 12, 14 y 15 fueron productos que se sintetizaron y purificaron en el ejemplo 1, 2 o 7.

10 Estas muestras se ajustaron para obtener 10 mg/ml de DMSO y la solución se diluyó 2 veces en 6 etapas. Usando una microplaca de 96 pocillos, se añadieron 45 µl de la solución de enzima a 10 µl de la solución de muestra. Después de la preincubación a 37 °C durante 5 minutos, se añadieron 45 µl de la solución de sustrato y se midió la absorbancia a 405 nm (A405 nm). Después de la incubación a 37 °C durante 5 minutos, se midió la absorbancia A405 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición como una diferencia en A405 nm a partir de una solución en la que solo se añadió DMSO como control en lugar de una muestra, y se realizaron dos mediciones consecutivas frente a la actividad de cada compuesto.

15 Como resultado, la actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa de cada compuesto, cuando se indica mediante el valor de CI<sub>50</sub>, es como se muestra en la tabla 8; los compuestos 12 y 14 presentaron una actividad particularmente fuerte.

[Tabla 8]

Tabla 8: actividad inhibidora de la alfa-glucosidasa

25

Compuesto	Compuesto	CI <sub>50</sub> (mM)
1	purpurogalina	1,237
3	epiteaflagalina	No
4	3-O-galato de lepiteaflapalina	0,180
5	teaflavato A	0,116
11	GA del ácido epiteaflávicico	0,287
12	2,3,4,6-tetrahidroxi-5-oxo-5H-benzo[7]anulen-8-carboxilato de (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicroman-3-ilo	0,159
13	EGCG	0,485
14	3-O-galato de teaflavanina	0,196
15	EGCG-catecol	0,103

Los compuestos 1, 3, 4, 13, 14 son ejemplos de referencia.

30 A partir de estos resultados, junto con los resultados sobre la actividad inhibidora de la lipasa, se descubrió que estos compuestos que contienen un anillo de benzotropolona tienen fuertes actividades inhibidoras frente a las enzimas digestivas. Entre todos, se confirmó que el compuesto 12, que presentaba fuertes actividades inhibidoras frente a ambas enzimas, también estaba presente en el té negro; hasta la fecha, no se había conocido el compuesto, pero se ha descubierto que es útil como material antiobesidad.

35 **Aplicabilidad industrial**

El agente antiobesidad de la presente invención contiene un compuesto que contiene un anillo de benzotropolona derivado del té y, de esta manera, presenta actividades inhibidoras superiores frente a la lipasa y la alfa-glucosidasa. El agente no compromete el sabor de los alimentos y bebidas, presenta apetitosidad y se puede usar en diversas aplicaciones de uso, que comprenden alimentos y bebidas destinados a la potenciación de la salud, tales como la reducción de los triglicéridos.

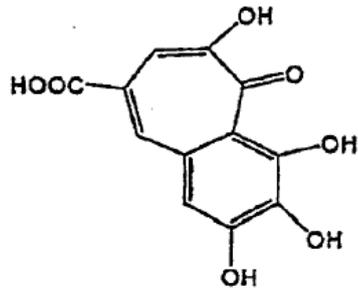
40

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende uno o más compuestos de

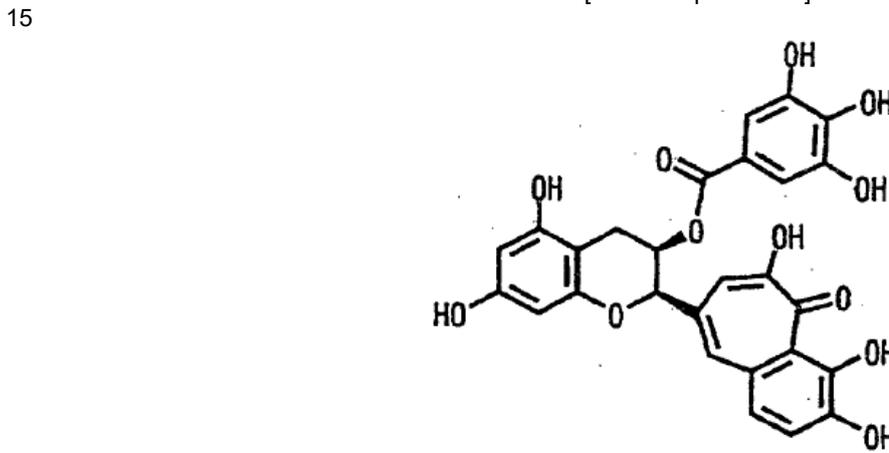
5 F3rmula (13):

[F3rmula qu3mica 13]



10 F3rmula (13)  
F3rmula (15):

[F3rmula qu3mica 15]

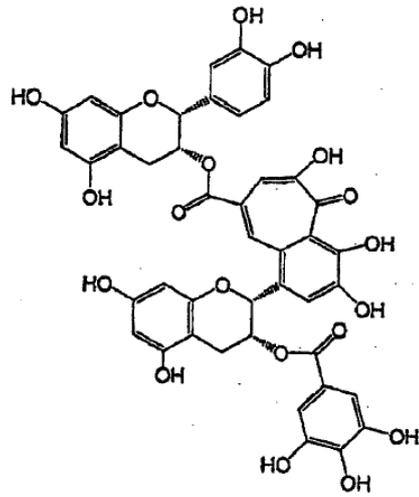


F3rmula (15)

F3rmula (16):

20

[Fórmula química 16]

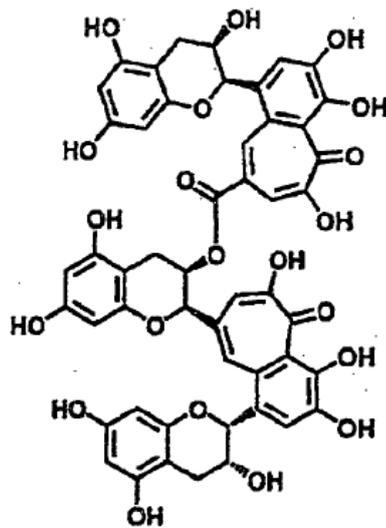


Fórmula (16)

Fórmula (17):

5

[Fórmula química 17]

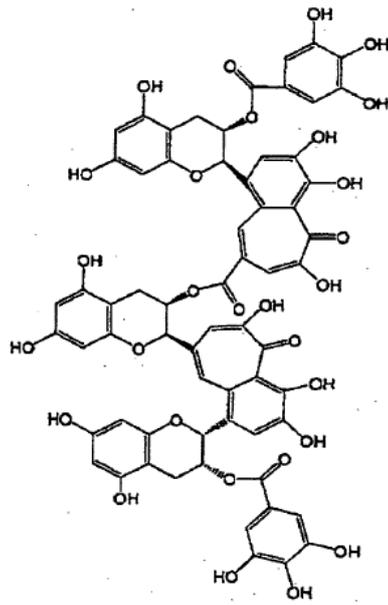


Fórmula (17)

Fórmula (18):

10

[Fórmula química 18]

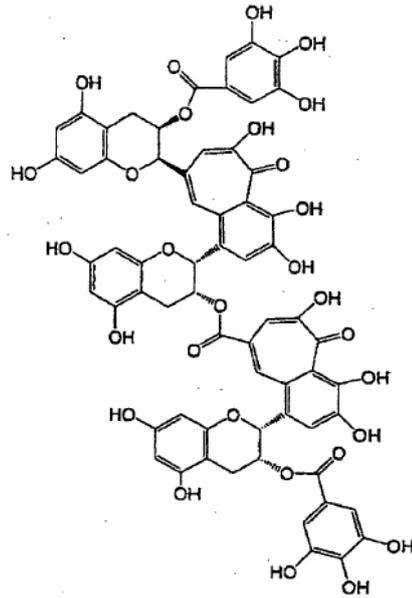


Fórmula (18)

Fórmula (19):

5

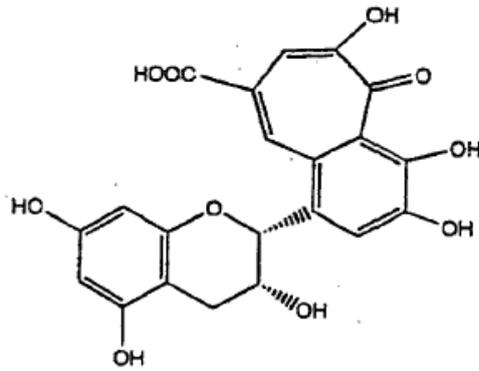
[Fórmula química 19]



Fórmula (19)

10 Fórmula (20):

[Fórmula química 20]

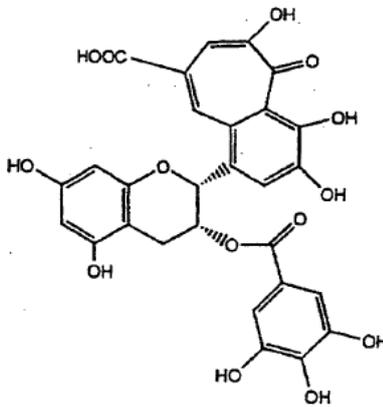


Fórmula (20)

Fórmula (22):

5

[Fórmula química 22]

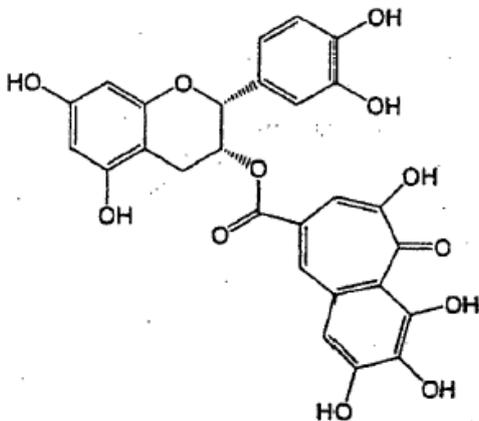


Fórmula (22)

o Fórmula (23):

10

[Fórmula química 23]



Fórmula (23)

15 2. El agente para su uso según la reivindicación 1, que es un inhibidor de la lipasa y/o un inhibidor de la alfa-

glucosidasa.

3. El agente para su uso según la reivindicación 1 o 2, que es para suprimir la absorción de la grasa y el azúcar derivados de la alimentación.

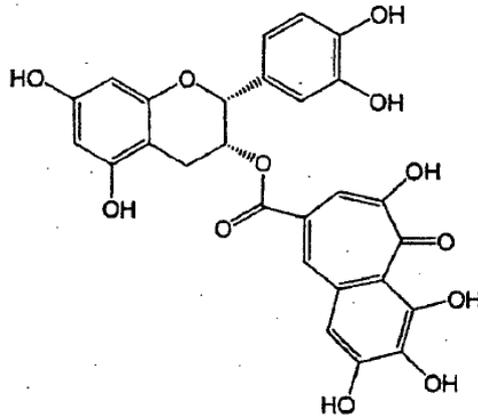
5 4. El agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de un alimento o una bebida.

10 5. El agente para su uso según la reivindicación 4, donde el alimento o bebida se selecciona del grupo que consiste en una bebida de té, un refresco y un alimento natural.

6. El agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de una composición farmacéutica.

15 7. Un compuesto de fórmula (23):

[Fórmula química 23]



Fórmula (23)

Fig.1

RMN de  $^{13}\text{C}$

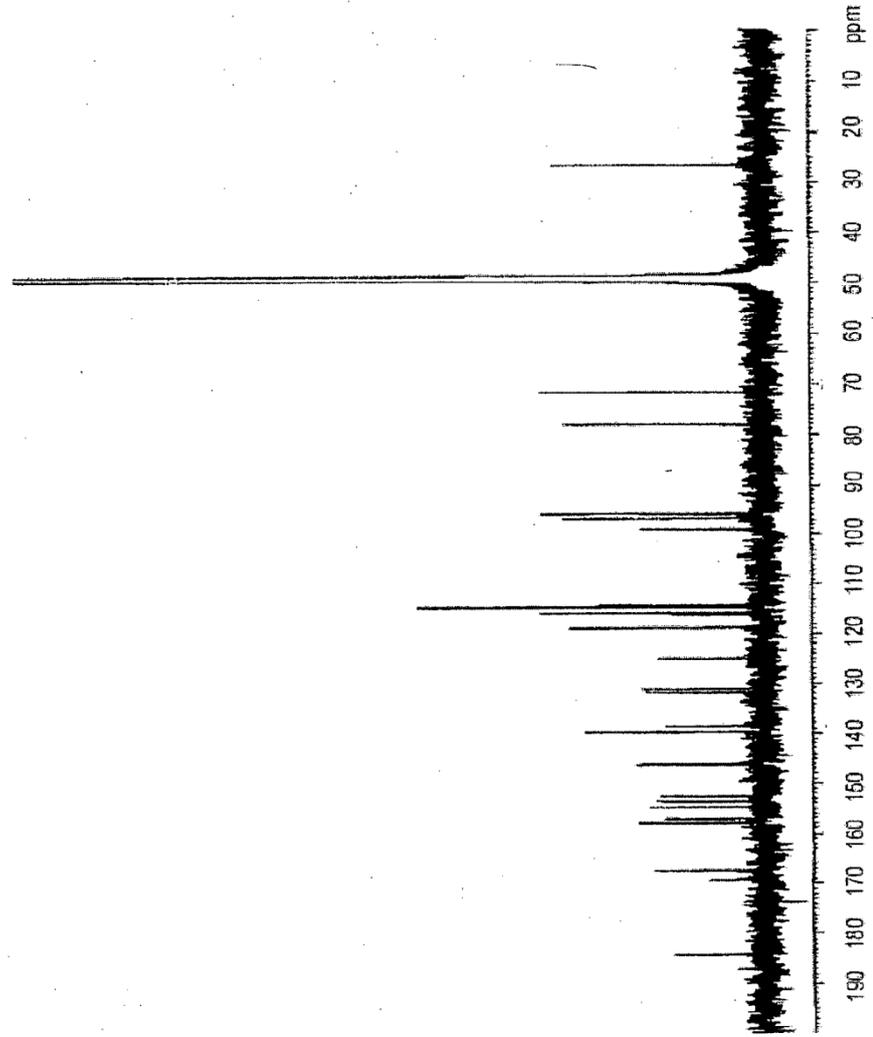


Fig. 2

RMN de  $^1\text{H}$

