

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 947**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19	(2006.01) A61P 35/02	(2006.01)
A61K 31/194	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)	
A61K 31/353	(2006.01)	
A61K 31/375	(2006.01)	
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 9/08	(2006.01)	
A61K 47/18	(2007.01)	
A61P 19/02	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014** **PCT/EP2014/059781**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014** **WO14184198**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014** **E 14727731 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2996686**

54 Título: **Composición oral a base de (+)-catequina**

30 Prioridad:

17.05.2013 BE 201300350

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

13.11.2019

73 Titular/es:

**VALORE (100.0%)
Rue Jules Bordet ZI C
7180 Seneffe, BE**

72 Inventor/es:

**NIEBES, PAUL;
MAY, BRONISLAV, HENRIC;
RACHIDI, SAÏD;
ESTAGER, JULIEN y
SCHOENTJES, BRUNO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 730 947 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición oral a base de (+)-catequina

- 5 La presente invención se refiere a una composición gastroentérica para administración oral que comprende un compuesto de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico, destinado a los mamíferos, y en particular al ser humano.
- 10 Los polifenoles constituyen una familia de moléculas orgánicas muy presente en el reino vegetal. Se caracterizan, como indica el nombre, por la presencia de varios grupos fenólicos asociados en estructuras generalmente de alto peso molecular. Estos compuestos son los productos del metabolismo secundario de las plantas.
- En particular, la (+)-catequina en su forma monomérica se obtiene directamente a partir del extracto de *Uncaria Gambir*.
- 15 Una composición de ese tipo ya se conoce por ejemplo a partir del documento US 4 285 964 en el contexto del tratamiento de enfermedades crónicas de tipo degenerativas de tejidos conjuntivo. Entre estas enfermedades degenerativas, entre las cuales las más conocidas y las más extendidas en el ser humano son por ejemplo la artrosis, la condromalacia y la parodontosis.
- 20 De acuerdo con el documento US 4 285 964, la composición que comprende un compuesto de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico es un medicamento en el que la sustancia activa es la (+)-catequina monomérica.
- 25 Este documento desvela además que, para poder tratar estas enfermedades, il es importante poder administrar este compuesto en el sitio en el que debe actuar la sustancia activa, es decir, en las articulaciones afectadas por la enfermedad.
- 30 El documento de patente US 4 285 964 tiene por lo tanto como objeto principal formar una composición inyectable que se pueda inyectar directamente en el cuerpo, por ejemplo en las articulaciones.
- Este objeto se alcanza mediante la formación de una sal doble de (+)-catequina monomérica que, además, No se caracteriza exactamente ya que se trata de una mezcla equimolecular de (+)-catequina, lisina y ácido clorhídrico, Con el fin de obtener una solubilización de la (+)-catequina en medio acuoso, a pH fisiológico con el objeto de disponer de una forma inyectable, la adición del ácido permitiendo modular la solubilidad de esta sal doble y ajustar el pH de esta última al valor fisiológico (pH = 7,2 - 7,4).
- 35 De hecho, este documento pone en evidencia que la solubilidad en una solución acuosa (tal como agua al pH fisiológico) de la (+)-catequina es elevada, hasta 400 g/l, cuando esta última forma una sal doble en presencia de un aminoácido básico tal como L-arginina o L-lisina y un ácido, por ejemplo tal como HCl.
- 40 Esta solubilidad mejorada en medio acuoso es más interesante para una administración de tipo parenteral que el uso de la (+)-catequina monomérica pura que presenta una solubilidad en agua que se limita a 1 g/l.
- 45 El documento US 4 285 964 extrapola el paso de la composición inyectable que se ha mencionado anteriormente para obtener una formulación oral mediante secado de la composición inyectable.
- Sin embargo, este documento no proporciona indicación con respecto a la estabilidad y a las capacidades de asimilación por el organismo *in vivo* de la composición oral que se ha descrito anteriormente.
- 50 El documento CH 665 634 desvela compuestos complejos de (+)-catequina y de la sal de doble adición de L-lisina y de un ácido mineral y/u orgánico con el fin de obtener un compuesto más estable y más soluble, y métodos para su preparación. Este documento no proporciona indicación con respecto a la biodisponibilidad de la (+)-catequina por vía oral. Los compuestos del documento CH 665 634 presentan una proporción de equivalencia molar de 1:1 entre la (+)-catequina monomérica con respecto al menos un aminoácido básico.
- 55 A partir de ese momento, en vista del estado de la técnica actual, existe una necesidad de disponer de una composición gastroentérica para administración oral a base de (+)-catequina monomérica que se pueda asimilar por vía oral y que permanezca estable una vez ingerida.
- 60 Con este objeto, la presente invención prevé una composición caracterizada por que dicho compuesto está en forma de complejo y presenta una proporción de equivalencia molar de dicha (+)-catequina monomérica con respecto a dicho al menos un aminoácido básico comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2,5 (denominado en lo sucesivo un complejo [C :AA/1 : 1,5 - 1 : 2,5], C para (+)-catequina monomérica y AA para aminoácido básico).
- 65 De hecho, en el contexto de la presente invención, se ha observado de forma totalmente sorprendente que el

complejo de (+)-catequina monomérica con al menos un aminoácido básico en una proporción de equivalencia molar específica comprendida entre 1,5: 1 y 1 : 2,5 es estable una vez ingerido y presenta una biodisponibilidad por vía oral elevada. Esta biodisponibilidad elevada por vía oral se hace posible por la estabilidad *in vivo* del complejo de acuerdo con la invención.

5 De hecho se piensa que la presencia de dicho al menos un aminoácido básico relacionada con la (+)-catequina monomérica permite al complejo atravesar fácilmente la pared intestinal, y por lo tanto da como resultado una proporción de (+)-catequina monomérica libre en la sangre más elevada.

10 A partir de los resultados presentados en el contexto de la presente invención, se observa que la biodisponibilidad elevada por vía oral de un gramo de (+)-catequina monomérica en forma de un complejo alcanza un valor de al menos 900 ng h/ml (54000 ng min/ml) en el ser humano. En vista de los resultados de la presente invención, por lo tanto por biodisponibilidad elevada en el ser humano, se hace referencia a una biodisponibilidad al menos igual a 900 ng h/ml (54000 ng min/ml) para una administración oral de un gramo.

15 Los resultados obtenidos por los inventores de la presente solicitud de patentes muestran que la biodisponibilidad medida en el ser humano para un gramo de (+)-catequina ingerida en forma de complejo de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico en una proporción de equivalencia molar comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2,5, es de al menos 900 ng h/ml (54000 ng min/ml).

20 A modo ilustrativo, en el contexto de la presente invención se observa que la biodisponibilidad por vía oral en el ser humano de la (+)-catequina ingerida en forma de complejo de (+)-catequina monomérica es muy superior [1263 ± 88 ng h/ml (75780 ng min/ml) para 0,920 g de (+)-catequina monomérica ingerida en forma de 1,5 g de complejo] a la de la (+)-catequina monomérica ingerida sola [832 ± 150 ng h/ml (49920 ng min/ml) para una cantidad equivalente de 0,920 g de una toma oral de (+)-catequina monomérica pura], es decir un aumento de
25 biodisponibilidad de +52 % gracias al complejo.

Esta característica es especialmente inesperada porque ha demostrado como en el contexto de la presente invención, que la (+)-catequina monomérica pura presenta una solubilidad en agua 400 veces menos elevada que la
30 medida cuando se solubiliza en una forma de complejo formado con al menos un aminoácido básico.

De hecho, la solubilidad de las sales de lisina de la (+)-catequina alcanzada a 20 °C es de 400 g por litro de agua mientras que la propia (+)-catequina presenta en las mismas condiciones una solubilidad de 0,9 g por litro.

35 En el momento que la composición de acuerdo con la invención presenta una biodisponibilidad elevada por vía oral, esta última permite entonces una asimilación a dosis reducidas, lo que constituye, por una parte, una perspectiva de aumento en términos de costes del tratamiento, en el momento en el que se debe absorber una dosis menor, y, por otra parte, una disminución de los efectos secundarios relacionados con este tratamiento, en particular en el contexto de un tratamiento de larga duración, en el momento en el que se sabe que la (+)-catequina monomérica,
40 incluso si generalmente se tolera bien en el organismo.

Además, se ha observado que:

- el uso de (+)-catequina administrada por vía oral en forma de un complejo [C: AA/1 : 1,5 - 1 : 2,5] proporciona
45 una concentración plasmática máxima de (+)-catequina monomérica libre c (máx) más que duplicará con respecto a la obtenida con la misma dosificación de (+)-catequina monomérica una ingerida en las mismas condiciones: c (máx) de 571 ng/ml por 1 g de (+)-catequina ingerida en forma de un complejo contra 280 ng/ml para 1 g de (+)-catequina monomérica ingerida como tal, es decir un aumento de + 103 %; y que
- las concentraciones plasmáticas máximas más que duplicadas se alcanzan [T (máx)] más de dos veces más
50 rápidamente cuando la (+)-catequina se ingiere en forma de un complejo [C: AA/1 : 1,5 - 1 : 2,5] más bien que en forma de (+)-catequina monomérica sola: T (máx) de 30 min contra 80 min, es decir un aumento de + 166 %.

Por lo tanto, además de la biodisponibilidad elevada por vía oral del complejo de acuerdo con la invención, en la presente solicitud también se ha demostrado que, en el caso de una absorción por vía oral, una proporción de (+)-
55 catequina monomérica libre en la sangre se mantiene de manera diferida en el tiempo, lo que permite prever una acción curativa y/o preventiva mejorada u de la (+)-catequina monomérica cuando se administra por vía oral.

De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es inferior o igual a la 1 : 2,5.

60 En particular dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2,5, más particularmente inferior o igual a 1 : 2.

De manera preferente, dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2.

Como alternativa, la proporción de equivalencia molar está comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2

65 De forma ventajosa, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a

1,00: 2,50.

De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,00.

5 De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,50.

De preferencia, dicho al menos un aminoácido básico es lisina.

10 En una forma particular de realización de la presente invención, dicho complejo es un complejo que comprende dos moléculas de lisina por una molécula de (+)-catequina monomérica.

El complejo de (+)-catequina con dos lisinas es, de lejos, en todos los experimentos, la mejor combinación para mejorar la biodisponibilidad de la (+)-catequina monomérica por vía oral

15 En otra forma particular de realización de la presente invención, dicho complejo es un complejo que comprende dos moléculas de arginina por una molécula de (+)-catequina monomérica.

20 En otra forma preferente, dicho complejo es un complejo que comprende una molécula de lisina y una molécula de arginina por una molécula de (+)-catequina monomérica.

De preferencia, la composición de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho complejo está en forma de sal de dicho complejo, dicha sal comprendiendo dicho complejo, dicho complejo comprendiendo al menos un protón obtenido a partir de al menos un ácido y al menos un anión obtenido a partir de dicho al menos un ácido, dicha sal presentando dicho protón en cantidad equimolar con respecto a la del aminoácido básico.

25 De este modo, la sal de complejo se define por las siguientes fórmulas:

- $[C: AA: H^+: A^-: x: x: x]$, en el caso de un ácido monofuncional tal como HCl; o
- $[C: xAA: xH^+: x/yA^y]$, en el caso de un ácido,

30 H^+ representando el protón del ácido,
 A^- representando el anión del ácido,
 x representando el número de equivalentes molares de AA,
 y representando la carga portada por el anión.

35 De forma ventajosa, dicha sal es el clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica.

De forma ventajosa, dicho al menos un ácido se elige de preferencia entre ácido ascórbico, ácido acético, ácido cítrico y ácido clorhídrico. De forma muy ventajosa, dicho ácido es ácido ascórbico.

40 El papel del ácido ascórbico es el de un complemento vitamínico. Además, este ácido al ser también un antioxidante, desempeña por lo tanto un papel antioxidante sinérgico con respecto al de la (+)-catequina.

45 Esta adición de un ácido permite además mejorar la biodisponibilidad de la (+)-catequina por vía oral. Esta observación se explica por el estado más estable de la (+)-catequina en medio ácido.

En un modo particular de realización, dicha composición se caracteriza por que comprende además uno o varios excipientes biocompatibles.

50 De preferencia, el contenido de complejo de (+)-catequina con dicho aminoácido básico está comprendido entre un 15 y un 95 % en peso con respecto al peso total de dicha composición, de preferencia entre un 60 y un 90 %, de forma ventajosa de un 65 a un 85 %.

55 De preferencia, la composición en forma líquida o en forma sólida, de preferencia en forma sólida hidrosoluble, en particular en forma de polvo, de comprimido, o de tableta.

De forma ventajosa, la composición en forma líquida presenta, en una solución 0,01 molar a 25 °C, un pH igual o superior a 3 (pH teórico de una sal C:L en una proporción de 1:0,5), de preferencia comprendido entre 4 y 11, de manera ventajosa entre 4,5 y 9.

60 Opcionalmente, la composición de acuerdo con la invención es una composición sólida, de pH igual o superior a 3, de preferencia comprendido entre 4 y 11, de manera ventajosa entre 4,5 y 9, cuando se pone en solución a 0,01 M a 25 °C, comprendiendo (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico, y opcionalmente al menos un ácido, como precursores de dicho complejo o de dicha sal del complejo, como preparación combinada para un uso por vía oral de forma simultánea, dicho complejo formándose después de la administración oral.

65

La composición sólida de acuerdo con la invención comprende la (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico en una proporción de equivalencia molar comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2,5.

Dicha proporción de equivalencia molar es inferior o igual al 1 : 2,5.

5 En particular dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2,5, más particularmente inferior o igual a 1 : 2.

De manera preferente, dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2.

10 Como alternativa, la proporción de equivalencia molar está comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2.

De forma ventajosa, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,50.

15 De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,00.

De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,50.

20 La (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico son precursores que participan, en medio acuoso, en una reacción de formación de complejos para formar el complejo de acuerdo con la invención.

En este caso con el complejo se forma *in vivo* en el tracto gastrointestinal en contacto con el agua de la saliva o el agua contenida en el bolo estomacal.

25 De manera alternativa, la composición de acuerdo con la invención es una composición sólida que comprende (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico, y opcionalmente al menos un ácido, como precursores de dicho complejo o de dicha sal del complejo, como preparación combinada para un uso por vía oral de forma simultánea solución en una fase acuosa, dicho complejo formándose antes de la administración oral, dicha (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico estando presentes en una proporción de
30 equivalencia molar comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2,5.

Dicha proporción de equivalencia molar es inferior o igual a 1 : 2,5.

En particular dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2,5, más particularmente inferior o igual a 1 : 2.

35 De manera preferente, dicha proporción de equivalencia molar es inferior a 1 : 2.

Como alternativa, la proporción de equivalencia molar está comprendida entre 1 : 1,5 y 1 : 2.

40 De forma ventajosa, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,50.

De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,00.

45 De preferencia, dicha proporción de equivalencia molar es superior o igual a 1,00: 1,50 e inferior o igual a 1,00: 2,50.

De este modo, el complejo se forma en el momento en el que la composición se pone en solución acuosa, es decir, antes de la administración oral.

50 En particular, la es el de invención se refiere a una composición alimentaria o terapéutica, curativa o profiláctica.

Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

55 La presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso para el tratamiento por vía oral, preventivo y/o curativo, del cáncer, de preferencia cáncer hepatocelular.

De forma ventajosa, la presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso para el tratamiento por vía oral, preventivo y/o curativo de las leucemias.

60 De forma muy ventajosa, la presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral para el tratamiento preventivo y/o curativo de los mielomas.

65 Opcionalmente, la presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral para el tratamiento preventivo y/o curativo de los linfomas.

Opcionalmente, la presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso en el contexto del tratamiento preventivo y/o curativo de los cánceres de hígado, próstata, mama, útero, testículos, vejiga, riñones, pulmones, bronquios, huesos, boca, esófago, estómago, páncreas, colorrectal.

- 5 Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención para el tratamiento por vía oral, preventivo y/o curativo, del cáncer se indican en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral en el contexto del tratamiento preventivo y/o curativo de las enfermedades inflamatorias y/o degenerativas, en particular de la artrosis.

Este uso se hace posible gracias a la acción antiinflamatoria reconocida de la (+)-catequina monomérica.

- 15 Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención para el tratamiento por vía oral, preventivo y curativo, de las enfermedades inflamatorias se indican en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral en el contexto del tratamiento preventivo y/o curativo del envejecimiento celular.

- 20 Este uso se hace posible gracias a la acción antioxidante reconocida de la (+)-catequina monomérica.

Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención para el tratamiento por vía oral, preventivo y/o curativo, del envejecimiento celular se indican en las reivindicaciones adjuntas.

- 25 La presente invención se refiere además a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral en el contexto del tratamiento preventivo y/o curativo de deficiencias de colágeno.

Este uso se hace posible gracias a la acción de estimulación de producción de colágeno y de protección de estas fibras por la (+)-catequina monomérica y sus sales tal como se muestra en la presente solicitud.

- 30 En particular, la presente composición de acuerdo con la invención tiene como objeto de tratamiento preventivo y/o curativo de las enfermedades genéticas del tejido conjuntivo tales como osteogénesis imperfecta, enfermedades de Marfan, de Ehlers-Danlos, enfermedades de Cutis Laxa, esclerodermia sistémica, y otras enfermedades del tejido conjuntivo en las que el colágeno y/o la elastina que normalmente parecen ser solubles tal como es el caso también en la parodontosis-parodontitis, esclerodermia, estrías, problemas de reparación tisular o lesiones del tejido conjuntivo provocadas por irradiación, radioterapia por exposición prolongada a los rayos del sol.

- 40 Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención para el tratamiento por vía oral, preventivo y/o curativo, de carencias de colágeno se indican en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención también se refiere a la composición de acuerdo con la invención, para un uso por vía oral en el contexto del tratamiento preventivo y/o curativo de úlcera péptica y alergias gastrointestinales.

- 45 Este uso se hace posible gracias a la acción protectora de la composición de acuerdo con la invención contra la úlcera gástrica y su efecto en la disminución de las tasas de histamina a nivel de la mucosa gástrica, tal como se demuestra en la presente solicitud.

Otras formas de realización de la composición de acuerdo con la invención para el tratamiento preventivo y/o curativo de la úlcera péptica y alergias gastrointestinales se indican en las reivindicaciones adjuntas.

- 50 Otras características y ventajas de la invención aparecerán con la descripción que se proporciona a continuación, a modo no limitante y haciendo referencia a los ejemplos (y en particular a los ejemplos comparativos) que se describen a continuación.

- 55 La figura 1 ilustra los espectros de RMN del complejo de (+)-catequina monomérica y de lisina para una proporción de equivalencia molar 1:2 (a) y una proporción de equivalencia molar 1:1 (b).

La figura 2 ilustra los espectros de RMN del complejo de (+)-catequina monomérica y de arginina para una proporción de equivalencia molar 1:2 (a) y una proporción de equivalencia molar 1:1 (b).

- 60 La figura 3 ilustra la evolución de las concentraciones plasmáticas (cc) en (+)-catequina libre medida en el ser humano en ng/ml en el transcurso del tiempo T (hora) después de la asimilación de clorhidrolisinato de (+)-catequina (rico en (+)-catequina monomérica por un máximo de un 61 % en peso, grupo A) y de un gramo de (+)-catequina monomérica pura (grupo B).

La figura 4 ilustra el espectro de difracción de Rayos X (método de polvo) del complejo de (+)-catequina monomérica y de lisina para una proporción de equivalencia molar 1:2.

- 65 La figura 5 ilustra la evolución de la concentración de (+)-catequina monomérica libre en el plasma en función de la proporción de equivalencia molar entre la (+)-catequina monomérica y la Lisina: 1: 0; 1: 1, 1: 2, 1: 2,5, 1: 3, y

1: 5, para una sal de complejo [C: Lys: HCl] (véase la tabla 14).

En la descripción, los ejemplos 1 a 6 así como los ejemplos comparativos 1 a 5 se refieren a los resultados de biodisponibilidad por vía oral y de actividad anticancerosa obtenidos en mamíferos (rata y ser humano) para una composición a base de un complejo [C: AA/1 : 1 - 1 : 2,5].

Los ejemplos comparativos 6 a 10 describen los resultados de biodisponibilidad por vía oral obtenidos en ratas para la composición a base de la mezcla de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico o un derivado de un aminoácido básico en una proporción de equivalencia molar comprendida entre 1: 1 y 1 : 2,5, de preferencia entre 1 : 1 y 1 : 2.

En el contexto de la presente invención, además se ha demostrado la equivalencia entre los resultados de los ensayos obtenidos en ratas y en el ser humano. Por lo tanto se ha demostrado que los resultados obtenidos en ratas se reproducen de forma eficaz en el ser humano.

En los experimentos que siguen a continuación, con excepción de los resultados de la tabla 7b, los contenidos de (+)-catequinas en la sangre corresponden a los contenidos de (+)-catequina libre monomérica.

Material y método: medición de la biodisponibilidad

La biodisponibilidad corresponde a la proporción de (+)-catequina monomérica libre que se encuentra en el organismo con respecto a la cantidad administrada inicialmente.

En el contexto de la presente invención, y amononó limitante, la (+)-catequina se puede absorber en forma del complejo [C: AA] o en forma de (+)-catequina monomérica pura, es decir, que no se asocia con al menos un aminoácido básico.

En el contexto de la presente invención, en primer lugar hay que distinguir, la (+)-catequina que se ha absorbido, la presencia en la sangre de (+)-catequina monomérica libre, es decir, en una forma no conjugada, de la (+)-catequina conjugada, es decir, que ha sido derivatizada por el metabolismo del mamífero.

La (+)-catequina monomérica derivatizada resulta del ciclo de eliminación de la (+)-catequina monomérica libre en la sangre por el metabolismo (por ejemplo y de manera no limitante, por el ciclo entero-hepático).

La eliminación de sustancias (o moléculas) activas extrañas para el organismo resulta de la acción conjunta de varios procesos. Esta comprende la capacidad metabólica de diferentes órganos, en primer lugar del hígado, y la excreción en todas sus formas, en particular renal (purina) y también hepática (bilis).

Este metabolismo de eliminación prevé la desviación de la (+)-catequina monomérica mediante un ciclo de biotransformación bien conocido que implica 2 fases de metabolismo de acuerdo con los procesos de transformación enzimática. Por lo tanto se distinguen las reacciones de fase I y las reacciones de fase II:

- las reacciones de fase I comprenden las reacciones de oxidación que se localizan principalmente en los microsomas hepáticos; las reacciones de reducción que son mucho menos frecuentes y menos bien exploradas; y las reacciones de hidrólisis que constituyen una vía metabólica común, que intervienen en el hígado, en diferentes tejidos e incluso en el plasma; y a continuación
- los derivados obtenidos a partir de las reacciones de fase I se conjugan a continuación. Esta conjugación es la que constituye las reacciones de fase II, entre las cuales está comprendida la glucuroconjugación que hace intervenir la conjugación de estos derivados con el ácido glucurónico.

En este contexto, a una proporción (o un contenido) determinado de (+)-catequina monomérica libre en la sangre después de la administración por vía oral de (+)-catequina monomérica, corresponde una biodisponibilidad determinada.

- Modo de operación:

Los resultados experimentales que se describen a continuación se obtuvieron basándose en un estudio realizado en seres humanos y en ratas Wistar sanas que pesaba aproximadamente 250 gramos.

Con respecto a los estudios realizados en rata, los individuos se alojaron en grupos de 4 individuos como máximo en una jaula con un lecho de serrín a una temperatura ambiente comprendida entre 20 °C y 25 °C, con una iluminación de 12 h con respecto a 24 h. Un periodo de aclimatación se respetó antes de comenzar los experimentos.

Durante el estudio experimental, las ratas tuvieron acceso a una alimentación estándar comercial y agua a voluntad. Las ratas Se pusieron en ayuno completo durante la noche que precedía a la administración de la fuente de producto activo, entendiéndose que el producto activo es la (+)-catequina monomérica (u otros

polifenoles: quercetina y EGCG).

Las ratas recibieron una administración por vía oral de un volumen de 5 ml de una solución de producto activo.

5 Con respecto a la formación de muestras de las extracciones previas de sangre entra también ser humano, la sangre se recogió en tubos de revestimiento interno con EDTA para su centrifugación a continuación a 3000 rpm (revoluciones por minuto) a temperatura ambiente durante 45 min, y a continuación durante 15 min a una temperatura de 4 °C. A continuación del plasma se recogió y se almacenó a -70 °C antes de su análisis.

10 La técnica analítica (LC-MS/MS para *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*) para la medición de sustancia activa en la sangre se inspira en el método descrito por Mata-Bilbao y col. Publicado en 2007 en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, volumen 55, página 8857.

15 Con respecto al desarrollo metodológico, los plasmas de referencia se recogieron de forma interna, a partir de ratas y vacas no tratadas con la sustancia activa, y a continuación se almacenaron a -20 °C.

20 La (+)-catequina libre se extrajo del plasma con una solución de ácido fosfórico, EDTA y ácido ascórbico para su purificación a continuación por SPE (para *solid phase extraction*) en particular, se trata de una extracción *Oasis™ HLB* y se analizó mediante LC-MS/MS. La cuantificación se realizó de acuerdo con un procedimiento de calibración estándar teniendo como patrón interno (SI) la (+/-)-catequina-2,3,4-¹³C3.

25 En este contexto, el contenido de (+)-catequina libre extrae no solamente el contenido de (+)-catequina libre monomérica aislada del plasma, sino también sus formas isoméricas que resultan de la isomerización de la (+)-catequina libre monomérica correspondiente a las condiciones de extracción de la (+)-catequina libre de dicho plasma.

El procedimiento es idéntico con respecto a la extracción y la cuantificación de la quercetina o del EGCG libre en la sangre.

30 Con respecto a la extracción y la cuantificación de la (+)-catequina total, el modo de operación es el mismo que el aplicado para la (+)-catequina libre, con excepción del hecho de que se realiza una etapa suplementaria y previa a la purificación por SPE. Esta etapa suplementaria consiste en tratar la muestra de ensayo con una solución de digestión de arilsulfatasa y glucoronidasa, con el fin de extraer la sustancia activa de las células plasmáticas.

35 La concentración total (ct) de (+)-catequina (libre o derivatizada) se calcula midiendo, por ejemplo con el método de trapecios, el área bajo la curva de evolución de las concentraciones plasmáticas (cc) medidas en ng/ml A lo largo del tiempo después de la administración oral de la fuente de (+)-catequina monomérica.

- Patrones

40 Una solución de patrón interno de 1 mg/ml (metanol) de (+)-catequina se preparó a partir de (+)-catequina de reserva para su almacenamiento a continuación a -20 °C.

45 La catequina-C13 (referencia: 719579, de pureza de un 99,3 % en peso) producida por *Sigma Aldrich*, se usó como SI.

La solución de SI para la cuantificación de la (+)-catequina (libre y total) se preparó diluyendo 5 ml de la solución de reserva en metanol en un volumen final de 10 ml. Esta solución de SI a continuación se almacenó a -20 °C.

50 - Métodos

a) Protocolo de extracción para el análisis de la (+)-catequina monomérica libre en el plasma

- una transferencia de 500 µl de plasma homogeneizado en un frasco de 15 ml;
- 55 - una adición de 50 µl de SI (10 ppm);
- una adición de 180 µl de una solución antioxidante (20 mg/ml de ácido ascórbico y 1 mg/ml de EDTA) y 10 µl de ácido orto-fosfórico;
- una mezcla con agitación vorticial durante 2 min;
- una adición de 1,5 ml de agua para dilución para obtener una mezcla de extracción;
- 60 - una extracción aplicada a la mezcla de extracción por fase sólida con *Water Oasis™ HLB* de acuerdo con el protocolo convencional bien conocido por el experto en la materia y que se puede adaptar al presente procedimiento;
- un secado de la fracción eluida por evaporación a 45 °C en atmósfera inerte;
- una solubilización del extracto seco en acetonitrilo, seguida por una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min; y
- 65 - un análisis de HPLC (para *high performance liquid chromatography*).

b) Protocolo de extracción para el análisis de la (+)-catequina monomérica total en el plasma

- una transferencia de 500 µl de plasma homogeneizado en un frasco de 15 ml;
- una adición de 50 µl de SI (10 ppm);
- 5 - una adición de 180 µl de una solución antioxidante (20 mg/ml de ácido ascórbico y 1 mg/ml de EDTA) y 10 µl de ácido orto-fosfórico;
- una mezcla con agitación vorticial durante 2 min;
- una adición de 750 µl de una solución tampón de acetato 0,2 M (pH de 4,8);
- una adición de 5 µl de una mezcla de *Helix pomatia* que va seguida por una etapa de digestión de la solución durante 2 horas a 55 °C;
- 10 - una centrifugación a 4000 rpm durante 10 min para obtener una mezcla de extracción;
- una extracción aplicada a la mezcla de extracción por fase sólida con *Water Oasis™ HLB* de acuerdo con el protocolo convencional bien conocido por el experto en la materia y que se puede adaptar al presente procedimiento;
- 15 - un secado de la fracción eluida por evaporación a 45 °C en atmósfera inerte;
- una solubilización del extracto seco en acetonitrilo, seguida por una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min; y
- un análisis de HPLC (para *high performance liquid chromatography*).

c) Extracción - *Water Oasis™ HLB*

- 20 - Solución de activación:
 - 1 ml de metanol;
 - 1 ml de agua; y
 - 25 ◦ 1 ml de una solución de DMF (70 % en volumen) que contiene un 0,1 % (en volumen) de ácido fórmico.
- Solución de lavado:
 - E ml de agua;
 - 30 ◦ 1 ml de una solución de metanol (30 % en volumen);
 - 1 ml de acetato de etilo.
- Solución de elución
 - 5 ml de una mezcla de acetato de etilo y metanol en una proporción de equivalencia molar de 1 : 2.
 - 35

d) Análisis por LC-MS/MS**• Cromatografía líquida (LC)**

- 40 - columna: *Alltima C18 5u*;
- fase móvil acuosa A HPLC: ácido fórmico (concentrado hasta un máximo de un 0,1 % en volumen);
- fase móvil B HPLC: solución de acetonitrilo que contiene ácido fórmico hasta un máximo de un 0,1 % en volumen;
- velocidad de flujo: 0,6 ml/min;
- 45 - temperatura del horno: 30 °C; et
- volumen de inyección: 50 µl;
- programa de elución:

Tiempo (min)	A (% en volumen)	B (% en volumen)
0,00	95	5
0,50	95	5
4,00	100	0
4,50	100	0
5,50	95	5
8,00	95	5

50 • Espectroscopía de masas (MS)

- ionización ESI en modo negativo con una temperatura de desolvatación de 400 °C;
- temperatura de la fuente: 120 °C;
- flujo del gas de cono: 150 l/h;

- flujo de gas de desolvatación: 1000 l/h.

Síntesis de un complejo

- 5 El complejo corresponde a una estructura molecular en la que la (+)-catequina monomérica está unida a dicho al menos un aminoácido, o a dicho al menos uno de los derivados de aminoácido básico, mediante enlaces de tipo puente de hidrógeno.

Esto significa que, que el complejo no se disocia en solución acuosa.

- 10 La (+)-catequina monomérica corresponde a un polifenol presente en forma de un monómero.

El aminoácido básico presenta un radical que tiene carga positiva a pH neutro.

- 15 El propio derivado de aminoácido básico se define como una molécula que proviene de un aminoácido básico, y que resulta de una o varias transformaciones químicas realizadas sobre este aminoácido.

- 20 De manera preferente, el complejo (en forma de sal o no) comprende (+)-catequina monomérica y al menos un precursor de aminoácido que es una molécula destinada a su transformación en aminoácido o en derivado de aminoácido después de la administración oral.

- 25 Por ejemplo, y a modo una limitante, el precursor de aminoácido puede ser un glucurónido o un glucuronósido de aminoácido, que, una vez absorbido, es transformado por el organismo en aminoácido, debido a la acción de las enzimas β -glucuronidasas.

Ejemplo 1: preparación de un complejo de (+)-catequina monomérica y lisina

1a. Complejo de (+)-catequina monomérica y lisina en una proporción de equivalencia molar 1 : 2

- 30 La (+)-catequina monomérica, extraída de *Uncaria Gambir* de acuerdo con uno de los métodos bien conocidos por el experto en la materia, se tritura y a continuación se seca a 50 °C a vacío durante 30 minutos.

Después de esta etapa de secado, la (+)-catequina extraída comprende agua al menos en trazas.

- 35 A continuación se añaden dos equivalentes de lisina de forma sucesiva a la (+)-catequina con agitación hasta su disolución en agua destilada en la que hay un burbujeo de helio. A continuación la solución se calienta a una temperatura comprendida entre 40 °C y 45 °C y se agita durante aproximadamente una hora hasta la disolución completa de los dos equivalentes de lisina y a continuación se introduce en el frigorífico durante 16 h.

- 40 De manera alternativa, la (+)-catequina se puede añadir a una solución de dos equivalentes de lisina llevada a una temperatura comprendida entre 40 °C y 45 °C con agitación.

- 45 La solución se filtra a continuación en embudo Buchner y se lava con 50 ml de agua destilada para se seque a continuación con evaporación del agua en primer lugar en el rotavapor y a continuación en la rampa de vacío (durante 4 h a una temperatura de 50 °C).

El producto obtenido no es soluble en metanol deuterado pero sí en agua deuterada (D₂O, disolvente usado para el análisis de RMN). El espectro de RMN obtenido se ilustra en la figura 1a.

- 50 Con la lectura del espectro de RMN, se observa que el complejo está formado por dos moles de lisina con respecto a un mol de (+)-catequina monomérica.

- 55 Además, la presencia de los tres picos A, B y C en el espectro muestra que la lisina está bien unida a la catequina. De hecho se observa una fuerte modificación de los picos aromáticos de la (+)-catequina con una desaparición de los picos hacia 5,95-5,87 ppm y una mala integración de los picos al nivel de 6,50-7,00 ppm. Esto indica que hay una interacción entre la lisina y los ciclos aromáticos de la (+)-catequina, a nivel de los grupos fenólicos, estas interacciones implicando enlaces de tipo puente de hidrógeno.

- 60 Los espectros de difracción de Rayos X recogidos usando un difractómetro con el método de polvo *Siemens D5000* con una radiación de Cu K α (λ = 1,542 Å) se adquirieron para los siguientes compuestos: la (+)-catequina monomérica (JE143), una mezcla (JECatLysH) de clorhidrato de lisina, de (+)-catequina monomérica, y de lisina protonada (mezcla de C: Lys: HCl/ 1 : 2 : 2), y tres mezclas de (+)-catequina monomérica y de lisina no protonada (JE149b, JE150, JE151). Los datos se registraron en un intervalo comprendido entre 5° y 60° por paso de 0,0167°.

- 65 Los espectros se ilustran en la figura 4. Como se muestra en la figura 4a, a la muestra de ensayo JECatLysH Se le asocia un espectro DRX que no parece ser una superposición de los espectros de la (+)-catequina monomérica y del

clorhidrato de lisina, mostrando de ese modo la formación de un complejo y no de una mezcla de los dos componentes. En particular se observa entre otros la desaparición de los picos en los ángulos de 31,5 y 36 grados de la lisina en el espectro del complejo

Los espectros para las tres mezclas de (+)-catequina monomérica y de lisina no protonada (JE149b, JE150, JE151) no muestra ningún índice de cristalinidad para estas composiciones, lo que indica que, para estas referencias JE149b, JE150, JE151, hay formación de una composición en estado cristalino amorfo, a diferencia de lo que se observa para la mezcla JECatLysH para la cual se hay identificado una red cristalina que no corresponde a la superposición de los espectros del clorhidrato de lisina y de la (+)-catequina monomérica.

1b. Complejo de (+)-catequina monomérica y de lisina en una proporción de equivalencia molar 1 : 1

El complejo de (+)-catequina monomérica con la lisina en una proporción de equivalencia molar 1 : 1 se sintetizó de acuerdo con el mismo protocolo que el usado para la síntesis del complejo de lisina del ejemplo 1a pero disminuyendo en un factor 2 la cantidad de lisina de un modo tal que existe un exceso de (+)-catequina que favorece la formación de dicho complejo bajo una proporción de equivalencia molar 1 : 1 debido al déficit de lisina.

El espectro de RMN trazado el agua deuterada se ilustra en la figura 1b. Con la lectura del espectro RMN, se observa que el complejo está formado por un mol de lisina por un mol de (+)-catequina monomérica.

Ejemplo 2: preparación de un complejo de (+)-catequina monomérica y de arginina

2a. Complejo de (+)-catequina monomérica y de arginina en una proporción de equivalencia molar 1 : 2

El complejo de (+)-catequina monomérica con la arginina se sintetizó de acuerdo con el mismo protocolo que el usado para la síntesis del complejo de lisina del ejemplo 1a.

Con la lectura del espectro de RMN que se ilustra en la figura 2a, se observa que el complejo está formado por dos moléculas de arginina unidas por enlaces de tipo puente de hidrógeno a una molécula de (+)-catequina monomérica.

2b. Complejo de (+)-catequina monomérica y de arginina en una proporción de equivalencia molar 1 : 1

El complejo de (+)-catequina monomérica con la arginina se sintetizó de acuerdo con el mismo protocolo que el usado para la síntesis del complejo de lisina del ejemplo 1b.

Con la lectura del espectro de RMN de dicho complejo ilustrado en la figura 2b, se observa que el complejo está formado por una molécula de arginina unida mediante enlaces de tipo puente de hidrógeno a una molécula de (+)-catequina monomérica.

Biodisponibilidad por vía oral del complejo

Ejemplo 3: medición de la biodisponibilidad por vía oral del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica (o sal de complejo [C: Lys: HCl] en el ser humano

1,5 g de un complejo de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico: clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica. A partir del complejo [C: Lys] obtenido de acuerdo con el protocolo 1b, la (+)-catequina monomérica se presenta a razón de un 61 % en masa con respecto al peso total de dicho complejo (es decir, 0,92 g para 1,5 g), el clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica (sal de complejo [C: Lys: HCl]) se sintetiza mediante neutralización de dicho complejo [C: Lys] con el HCl añadido en cantidad equimolar a la de dicho complejo.

De este modo, una sal de complejo en la que la lisina está unida al protón (Lys-H^+) obtenido a partir del HCl y en la que el cloruro (anión Cl^-) está libre en solución y no interactúa con el complejo [C: Lys-H^+].

Esta sal de complejo se administra a un grupo A de 5 voluntarios sanos.

El contenido de (+)-catequina monomérica libre en la sangre se midió para el grupo A de voluntarios en el transcurso del tiempo después de la ingesta de 1,5 g de clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica que contenían 0,92 g de (+)-catequina monomérica (tabla 1).

Tabla 1: concentración plasmática (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para el grupo A en función del tiempo T (hora)

	Grupo
T (h)	A
	cc (ng/ml)
0,5	524 ± 30
1	487 ± 47
2	328 ± 35
3	173 ± 38
4	78 ± 24
6	16 ± 2

Tabla 2: parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para el grupo A en función del tiempo T (hora)

	Grupo
	A
T (máx) (h)	0,5
ct (ng h/ml) (ng min/ml)	1263 ± 88 (75780)
c (máx) (ng/ml)	525

La figura 3 ilustra la evolución de las concentraciones plasmáticas (cc) medidas en ng/ml en el transcurso del tiempo T (hora) después de la administración oral de clorhidrolisinato de (+)-catequina (curva A), esta curva se extrapola a partir del listado de datos que aparecen en la tabla 1.

El área medida, por ejemplo con el método de los trapecios bien conocido en la bibliografía, bajo la curva indica la concentración total (ct) de (+)-catequina monomérica libre asimilada en el plasma medida durante un periodo de tiempo de seis horas a partir de la ingesta de la (+)-catequina en forma de un complejo formada con el clorhidrolisinato. Este parámetro ct permite calcular, a partir de los datos de la tabla 1, la biodisponibilidad de la (+)-catequina expresada en ng h/ml. La ct es de 1263 ± 88 ng h/ml para el clorhidrolisinato de (+)-catequina.

En la figura 3, la concentración máxima c (máx) corresponde al pico de la curva. Para el grupo que ha recibido la sal de complejo [C: Lys: HCl], la c (máx) alcanza 525 ng/ml. Esta concentración máxima se alcanza en un tiempo T (máx) de 0,5 h para el grupo A que ha recibido el complejo de (+)-catequina monomérica.

Ejemplo comparativo 1: medición de la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina monomérica pura en el ser humano

Una dosis de 1 g de (+)-catequina monomérica pura se administra a un grupo B de 5 voluntarios sanos.

El contenido de (+)-catequina monomérica libre en la sangre se midió para el grupo de voluntarios B en el transcurso del tiempo después de la ingesta de (+)-catequina. Los resultados se indican en la tabla 3.

Tabla 3: concentración plasmática (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para el grupo B en función del tiempo T (hora)

	Grupo
T (h)	B
	cc (ng/ml)
0,5	59 ± 61
1	266 ± 147
2	230 ± 87
3	226 ± 38
4	128 ± 51
6	27 ± 13

Tabla 4: parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para el grupo B en función del tiempo T (hora)

	Grupo
	A
T (máx) (h)	1,20
ct (ng h/ml) (ng min/ml)	904 ± 163 (54240)
c (máx) (ng/ml)	280

- 5 La figura 3 ilustra la evolución de las concentraciones plasmáticas (cc) medidas en ng/ml en el transcurso del tiempo T (hora) después de la administración oral de (+)-catequina pura (curva B). Esta curva se extrapola a partir del listado de datos que aparecen en la tabla 3.

- 10 El área medida bajo la curva indica la concentración total (ct) de (+)-catequina monomérica libre asimilada en el plasma medida durante un periodo de tiempo de seis horas a partir de la ingesta de la (+)-catequina pura. Este parámetro ct permite calcular, a partir de los datos de las tablas 1 y 3, la biodisponibilidad de la (+)-catequina expresada en ng h/ml. La ct se calcula a 1263 ± 88 ng h/ml para 1,5 g de clorhidrolisinato de (+)-catequina que contiene 0,92 g de (+)-catequina pura. Se calcula a 904 ± 163 ng h/ml para 1 g de (+)-catequina pura, es decir, a 832 ± 150 ng h/ml para 0,92 g de (+)-catequina pura, que corresponde a la dosis ingerida con la sal de complejo [C :Lys :HCl] (véase el ejemplo 2), es decir, una mejora de la biodisponibilidad de al menos un 52 %.

- 15 En la figura 3, las concentraciones máximas c (máx) corresponden a los picos de las curvas. Para el grupo que ha recibido 1 g de (+)-catequina monomérica pura, la c (máx) se calcula a 280 ng/ml, es decir, 258 ng/ml para 0,92 g de (+)-catequina pura que corresponde a la dosis de (+)-catequina ingerida con la sal de complejo [C :Lys :HCl]. Para el grupo que ha recibido la sal de complejo [C: Lys: HCl], la c (máx) alcanza 525 ng/ml, lo que corresponde a un aumento de un 103 % con respecto a la (+)-catequina pura. Estas concentraciones máximas se alcanzan respectivamente a un tiempo T (máx) de 1,20 h para el grupo B y de 0,5 h para el grupo que se ha tratado con el complejo de (+)-catequina monomérica.

- 20 En este primer ejemplo comparativo, se muestra que el complejo de (+)-catequina, y en particular el clorhidrolisinato de (+)-catequina mejora de forma significativa (+52 %) la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina monomérica con respecto a su ingesta en forma pura. La rapidez del paso de la (+)-catequina monomérica a la sangre (y presente a continuación en forma libre en el plasma), medida con el parámetro T (máx), así como la concentración máxima, c (máx), también aumentan de forma muy significativa: respectivamente en +166 % y en +103 %, con respecto a la ingesta de (+)-catequina monomérica en su forma pura.

Ejemplo comparativo 2: medición de la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina monomérica pura y del complejo de (+)-catequina y lisina en ratas

- 35 Una dosis de 100 mg (por kg de peso corporal) de (+)-catequina monomérica pura (CP) o una dosis de lisinato de (+)-catequina equivalente a 100 mg de (+)-catequina se administró en cada individuo de una muestra de ensayo de 5 ratas Wistar.

- 40 Los parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral se proporcionan en la tabla 5 para diferentes fuentes de (+)-catequina: CP, o diferentes complejos de lisina.

Tabla 5: parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica			
	CP	[C: Lys/1 : 1]	[C: Lys: HCl/1 : 1 : 1]	[C: Lys/1 : 2]
T (máx) (min)	60	60	60	120
c (máx) (ng/ml)	716	1127	955	1547
ct (ng min/ml)	96238	112422	132349	186348
Δ ct (en %)	0	+17	+36	+94

- 45 En esta tabla, la Δ ct (expresada en %) corresponde a la medición de la diferencia entre la ct obtenida con cada uno de los complejos y la ct medida para la (+)-catequina monomérica pura, simplificada al valor de biodisponibilidad

para la CP. A modo ilustrativo, la Δct calculada para el complejo [C: Lys /1 : 1] se obtiene como sigue a continuación:

$$100 \times [(112422 - 96238) / 96238] = 17 \%$$

- 5 Los mejores valores de parámetro se alcanzan para el complejo [C: Lys /1 : 2] para el cual se alcanza un valor de biodisponibilidad por vía oral de aproximadamente $1,9 \cdot 10^5$ ng min/ml, lo que corresponde a un aumento de un 94 % con respecto a la (+)-catequina ingerida en forma pura.

10 Además la concentración máxima [C(máx)] de catequina que pasa a la sangre aumenta en un 116 %, con el pico que da esta $C_{máx}$ situado a 120 min [T (máx)] contra 60 min para las otras fuentes, lo que también tiene como efecto un aumento favorable de las tasas sanguíneas en (+)-catequina libre monomérica en el tiempo, lo que confirma la acción diferida de la sustancia activa y por lo tanto una acción anti cancerosa mejorada.

15 Estos datos corresponden a lo que los investigadores habían encontrado en el ser humano al comparar la ingesta oral de (+)-catequina pura (tabla 4) con la de casa al de complejo [C :Lys :HCl, 1 : 1 : 1] (tabla 2). Las biodisponibilidades de hecho aumentan en las mismas proporciones, +52 % en el ser humano, + 36 % en la rata.

20 En el presente ejemplo, en ratas, los investigadores muestran que el complejo [C :Lys/1 : 2] aumenta incluso más significativamente la biodisponibilidad de la (+)-catequina por vía oral.

Ejemplo comparativo 3: medición de la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina monomérica pura, del complejo de (+)-catequina y de arginina, y del complejo de (+)-catequina y lisina, en ratas

25 Una dosis de 100 mg (por kg de peso corporal) de (+)-catequina monomérica pura (CP) o una dosis de complejo de (+)-catequina equivalente a 100 mg de (+)-catequina se administró en cada individuo de una muestra de ensayo de 5 ratas Wistar.

30 Los parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral se proporcionan en la tabla 6 para diferentes fuentes de (+)-catequina: CP, o diferentes complejos de lisina o de arginina.

Tabla 6: parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica		
	CP	[C: Lys/1 : 1]	[C: Arg/1 : 1]
T (máx) (min)	60	60	60
c (máx) (ng/ml)	716	1127	1292
ct (ng min/ml)	96238	112422	116351
Δct (en %)	0	+17	+21

35 A partir de estos resultados, se deduce que todo aminoácido básico (es decir, elegido entre lisina, arginina, e histidina) se une a la (+)-catequina, y por lo tanto neutralizada acidez de los grupos orto-difenoles situados sobre el núcleo de la (+)-catequina, podría tener el mismo efecto beneficioso en la biodisponibilidad por vía oral de la misma.

40 **Ejemplo comparativo 4: medición de la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina monomérica pura, del complejo de (+)-catequina y de lisina, a una proporción de equivalencia molar de 1 : 1 y 1 : 5, en ratas**

Una dosis de 25 mg (por kg de peso corporal) de (+)-catequina monomérica pura (CP) o una dosis de lisinato de (+)-catequina equivalente a 25 mg de (+)-catequina se administró en cada individuo de una muestra de ensayo de 3 ratas Wistar.

45 Los parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral se proporcionan en la tabla 7a para diferentes fuentes de (+)-catequina: CP, o diferentes complejos de lisina.

50 Los parámetros de T (máx), c (máx) y de ct en (+)-catequina total presente en la sangre se proporcionan en la tabla 7b. La (+)-catequina total modifica la (+)-catequina monomérica libre y la (+)-catequina monomérica que ha sido conjugada por el organismo de la rata.

Tabla 7a: parámetros de evaluación de la biodisponibilidad por vía oral calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica		
	CP	[C: Lys/1 : 2]	[C: Lys/1 : 5]
T (máx) (min)	30	60	60
c (máx) (ng/ml)	154	173	74
ct (ng min/ml)	21145	24845	13770
Δct (en %)	0	+17	-35

5 Tabla 7b: parámetros de T (máx), c (máx) y ct en (+)-catequina total presente en la sangre calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina *monomérica* total (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica		
	CP	[C: Lys/1 : 2]	[C: Lys/1 : 5]
T (máx) (min)	30	60	60
c (máx) (ng/ml)	2200	2366	1100
ct (ng min/ml)	273875	339245	163080
Δct (en %)	0	+24	-40

10 El complejo [C :Lys/ 1 : 2] permite a la vez un aumento de los contenidos de (+)-catequina plasmática libre y total mientras que el complejo [C :Lys/ 1 : 5] disminuye claramente estos contenidos con respecto a la (+)-catequina pura, es decir, ingerida sin lisina.

15 Los resultados de este ejemplo comparados con los resultados que se ilustran en la tabla 5 muestran que el valor óptimo en términos de biodisponibilidad por vía oral se alcanza de forma eficaz para el complejo [C :AA/1 : 2], en presencia o no de HCl. Se debe observar que la presencia de un ácido influye de manera favorable en los parámetros de biodisponibilidad por vía oral (véase la tabla 5), sin embargo, la presencia de este ácido no es esencial para obtener una biodisponibilidad por vía oral aumentada.

Acción anticancerosa

Ejemplo 4: medición de la acción del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica y del ascorbolisinato de (+)-catequina monomérica en la incorporación total y en el colágeno de la 3H-prolina al nivel de la piel

25 La estabilización de las membranas de los lisosomas impide la liberación de las enzimas proteolíticas responsables de la degradación de la matriz conjuntiva, en particular del colágeno. Esta degradación está en el origen de la propagación de las células cancerosas metastásicas sea cual sea el tipo de cáncer (Cell Communication and Signaling 2010, 8: 22).

30 La piel es un tejido particularmente rico en matriz conjuntiva y en fibras de colágeno, lo que le proporciona toda su elasticidad.

Aquí se demuestra la eficacia del clorhidrolisinato de (+)-catequina y del ascorbolisinato de (+)-catequina monomérica administrados por vía oral, por una parte en la incorporación total (sobre toda la piel) y por otra parte en el colágeno de la misma, de la 3H-prolina.

35 Para hacer esto, se realizó un estudio *in vivo* sobre un lote de 24 ratas Wistar hembras que pesan de 95 a 115 g, divididos en dos grupos C y D, cada uno de 12 ratas. Para cada grupo, la 3H-hidroxiprolina radiactiva, cuya actividad específica es de 13,6 Ci/10⁻³ moles, se administró al conjunto de los animales mediante inyección intraperitoneal de prolina-L-(5-3H) a una dosis con respecto al peso de los individuos de 1 mCi/kg, lo que representa una actividad de 40 3H-prolina radiactiva de 100 μCi/individuo.

45 6 ratas de cada grupo recibieron un tratamiento a base de (+)-catequina monomérica mediante sonda a razón de 100 mg/kg durante 5 días antes del sacrificio. Las otras 6 ratas que no recibieron tratamiento a base de (+)-catequina monomérica es un subgrupo de control (ctrl). El grupo C recibió clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica mientras que el grupo D recibió ascorbolisinato de (+)-catequina monomérica.

Tabla 8: acción de la (+)-catequina monomérica en sus formas de complejos (100 mg/kg) con respecto a la tasa (en dpm/mg) de incorporación total (IT) y en el colágeno (IC) de 3H-hidroxiprolina en la piel de la rata

	Grupo			
	C		D	
Tasa	ctrl	tratado	ctrl	tratado
IT	5620 ± 186	6248 ± 124	4864 ± 231	5112 ± 259
IC	1178 ± 39	1343 ± 48	963 ± 42	1117 ± 49

En la tabla 8, la tasa de incorporación se mide mediante el índice de desintegración de la 3H-hidroxiprolina radiactiva por minuto (dpm) por mg de masa seca. Cuanto más elevado es este índice, mayor es la concentración de 3H-hidroxiprolina.

Los resultados de la tabla 8 muestran que la catequina y el complejo de clorhidrolisinato de (+)-catequina estimulan la biosíntesis del tejido conjuntivo y en particular la del colágeno.

Además, este ejemplo confirma la protección de la base conjuntiva *in vivo* mediante la absorción oral de los complejos de (+)-catequina monomérica por vía oral y durante la protección de esta base en particular contra la intrusión de células cancerosas.

Ejemplo comparativo 5: medición de la acción de la (+)-catequina monomérica pura en la incorporación total y en el colágeno de la 3H-prolina al nivel de la piel

En este ejemplo comparativo, un grupo E de 12 ratas Wistar que pesan de 95 a 115 g a las cuales se les administró 3H-hidroxiprolina radiactiva, cuya actividad específica es de 13,6 Ci/10⁻³ moles, se administró al conjunto de los individuos mediante inyección intraperitoneal de prolina-L-(5-3H) a una dosis con respecto al peso de los individuos de 1 mCi/kg, lo que representa una actividad de 3H-prolina radiactiva de 100 µCi/individuo.

6 ratas de cada grupo recibieron un tratamiento a base de (+)-catequina monomérica pura mediante sonda a razón de 100 mg/kg durante 5 días antes del sacrificio. Las otras 6 ratas que no recibieron tratamiento a base de (+)-catequina monomérica es un subgrupo de control (ctrl).

Tabla 9: acción de la (+)-catequina monomérica pura (100 mg/kg) con respecto a la tasa (en dpm/mg) de incorporación total (IT) y en el colágeno (IC) de 3H-hidroxiprolina en la piel de la rata

	Grupo	
	E	
Tasa	ctrl	tratado
IT	4864 ± 231	5689 ± 410
IC	963 ± 42	1124 ± 51

En la tabla 9, la tasa de incorporación se mide mediante el índice de desintegración de la 3H-hidroxiprolina radiactiva por minuto (dpm) por mg de masa seca. Cuanto más elevado es este índice, mayor es la concentración de 3H-hidroxiprolina.

Los resultados de las tablas 8 y 9 muestran que el aumento de la tasa de incorporación para los complejos de clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica (+15 %) y de ascorbolisinato de (+)-catequina monomérica (+14 %) es equivalente al medido cuando a las ratas se les pone sonda con la (+)-catequina monomérica pura (+16 %).

Este ejemplo comparativo confirma la protección de la base conjuntiva *in vivo* mediante la absorción oral de los complejos de (+)-catequina monomérica por vía oral y durante la protección de esta base en particular contra la intrusión de células cancerosas, y esto, para contenidos de (+)-catequina monomérica de hecho más bajos (61 mg de (+)-catequina para 100 mg de complejo) que los encontrados durante la ingesta de (+)-catequina pura (100 mg de (+)-catequina).

Ejemplo 5: medición de la acción del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica (sal de complejo [C: Lys : HCl] sobre el índice de úlceras gástricas y sobre la tasa de histamina en la mucosa gástrica en ratas Mastomys

En este ejemplo, la eficacia del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica *in vivo* en una rata africana, la rata

Mastomys que se conoce porque produce espontáneamente lesiones gástricas y en particular carcinomas gástricos uso en evidencia.

La rata Mastomys tiene, en efecto, un sistema especial de células que reservan histamina a nivel de la mucosa gástrica, estas células pueden dar origen a tumores carcinoides.

En este ejemplo, una muestra de ensayo de $n = 48$ ratas Mastomys se sensibilizan una primera vez mediante una inyección intraperitoneal de $3 \mu\text{g}$ de ovoalbúmina disuelta en $0,2 \text{ ml}$ de solución salina que contiene 1 mg de hidróxido de aluminio ovoalbúmina lo que provoca anticuerpos anti-inmunoglobulinas E(IgE) y G(IgG). Después de 7 días, una segunda inyección de 1 mg de ovoalbúmina en $0,01 \text{ ml}$ de solución salina se realiza en la mucosa gástrica al nivel del corpus de los animales anestesiados, lo que provoca una lesión ulcerosa al mismo nivel de la inyección.

Las 48 ratas se dividen en tres grupos: un o de 24 y dos de 12 individuos. El primer grupo de 24 individuos (G1) recibió un placebo (solución de NaCl concentrada a $0,15 \text{ M}$).

El segundo grupo (G2) de 12 individuos se trató con clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica administrado por vía oral a razón de dos veces al día ($2 \times 300 \text{ mg}$), dos días antes de la inyección y tres días después de la inyección. El tercer grupo (G3) de 12 individuos recibieron, en las mismas condiciones que las del grupo G2, el clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica a razón de 100 mg pero por vía intra peritoneal.

Como muestran los resultados de la tabla 10, la administración del clorhidrolisinato de (+)-catequina por vía oral proporciona una disminución muy significativa (-72%) del número de animales que presentan una úlcera gástrica (NU) así como una disminución significativa (-18%) de la tasa de histamina (TH), esta tasa asciende expresada en 10^{-6} mg/kg de proteína, en la mucosa gástrica. La tasa de histamina se mide para los grupos G1, G2 y G3 basándose en una muestra de ensayo de $n = 12$ individuos.

La disminución de la casa de histamina acumulada al nivel de la mucosa gástrica resulta directamente de la acción de la (+)-catequina monomérica sobre la pared de las células que almacenan histamina. Al contribuir al refuerzo de la pared de estas células, la (+)-catequina monomérica permite disminuir la tasa de histamina asimilada al nivel de la mucosa gástrica y por lo tanto reducir el número de úlceras.

Con respecto a este experimento es interesante observar que en particular en numerosos tipos de leucemias, crónicas o agudas, se encuentra un aumento de los mastocitos con aumento simultáneo de las tasas de histamina así como un aumento de las tasas de inmunoglobulinas (Blood Cells Mol. Dis. 35 (3), 370-383, 2005).

Tabla 10: acción del clorhidrolisinato de (+)-catequina sobre la incidencia de úlceras gástricas y sobre la tasa de histamina en la mucosa gástrica en ratas Mastomys

Grupo	n	NU	TH (n = 12)
G1	24	23	$46,17 \pm 2,30$
G2	12	5	$37,91 \pm 3,73$
G3	12	6	$34,98 \pm 3,52$

Ejemplo 6: medición de la acción del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica (sal de complejo [C : Lys : HCl] en el tratamiento de pacientes afectados con cáncer

En este ejemplo, se presentan los resultados relativos al ensayo del efecto del clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica en dos pacientes con cáncer tratados durante más de un año a razón de un comprimido de 500 mg de sal de complejo [C : Lys : HCl] al día.

En el primer paciente, un hombre de 67 años, un linfoma linfoplasmocítico (de tipo macroglobulinemia de Waldenstöm) se detectó durante un análisis de sangre postoperatorio el día J₀. El diagnóstico se basa en la detección con electroforesis de un pico monoclonal de inmunoglobulinas (IgM). Este diagnóstico se volvió a confirmar y el pico se midió durante un segundo análisis usando la misma detección mediante electroforesis.

Las inmunoglobulinas desempeñan un papel esencial en la defensa del organismo contra las agresiones y normalmente son secretadas por los linfocitos B.

En el mieloma múltiple o por ejemplo en el caso de la enfermedad de Waldenstöm, se observó una secreción de un solo tipo de inmunoglobulina o inmunoglobulina monoclonal por plasmocitos presentes en la médula ósea y que proliferan de una manera incontrolada.

Estas inmunoglobulinas se encuentran a una concentración elevada en la sangre y en las orinas. Por lo tanto constituyen verdaderos marcadores tumorales. Su dosificación informa del número de células enfermas, de la

extensión de la enfermedad y por consiguiente permite seguir su evolución bajo tratamiento.

Los controles sanguíneos sucesivos han proporcionado los siguientes datos para la dosificación de IgM (en mg para 100 ml de plasma):

5

Tabla 11: evolución de la tasa de IgM (en mg/100 ml) en la sangre en el transcurso del tiempo

Periodo de toma de muestra	IgM
J₀	1910
J ₀ + 1 mes	2010
J ₀ + 5 meses	1966
J ₀ + 8 meses	2467
J ₀ + 12 meses	2280
J ₀ + 15 meses	2748
J_T	2931
J _T + 4 meses	2417
J _T + 9 meses	2410
J _T + 15 meses	2412

10

Los resultados de la tabla 11 muestran que hay, desde la ingesta de clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica durante un año y medio, una estabilización por debajo del máximo detectada el día J_T a partir del cual se administró el tratamiento.

La tasa de infiltración permanece baja y a pesar de los valores de IgM superiores a 2000 mg/100 ml. Además el paciente no se ha sometido a tratamiento quimioterapéutico. Por lo tanto se considera que está estabilizado.

15

En el segundo paciente, en primer lugar se descubrió una adenopatía cervical sub-clavicular izquierda el día J₀. A continuación, 2 semanas más tarde, en este paciente se detectó un adenocarcinoma renal izquierdo, seguido por una nefrectomía del riñón izquierdo 3 días después de la detección del adenocarcinoma al nivel de este riñón.

20

A continuación, el día J₀ + 3 meses, se aplicó un raspado ganglionar cervical izquierdo al paciente. Después de esta intervención, se siguió una serie de 15 sesiones de radioterapia.

A partir del día J₀ + 15 meses (es decir, el día J_T), al paciente se le administró por vía oral un comprimido de 500 mg de clorhidrolisinato de (+)-catequina al día.

25

El día J_T + 15 meses, la aparición de una adenopatía mediastinal patológica (de un volumen de 45 cm³) se observó y fue necesario un raspado ganglionar mediastinal seguido por la exploración pulmonar el día J_T + 17 meses. Este examen puso en evidencia la involución de una pequeña opacidad micronodular de 5 mm en el pulmón izquierdo de la ausencia de lesión secundaria al nivel del parénquima pulmonar y del nivel abdominal.

30

A J_T + 19 meses, el informe de evaluación concluyó que el carcinoma renal de células transparentes estaba en remisión completa. Este diagnóstico se volvió a confirmar durante exámenes de control realizados a J_T + 23 meses. Claramente, parece que la ingesta de clorhidrolisinato de (+)-catequina durante un año había estabilizado el estado del paciente.

35

Síntesis de una composición de precursores de un complejo o de una sal de complejo

El método de fabricación de la composición que comprende la (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico como precursor del complejo comprende las siguientes etapas:

40

- una provisión de una primera cantidad de (+)-catequina monomérica;
- una provisión de una segunda cantidad de al menos un aminoácido básico, o de al menos un derivado de aminoácido básico, con el fin de obtener una proporción de equivalencia molar entre dicha (+)-catequina y dicho al menos un aminoácido básico o dicho o al menos un derivado de aminoácido básico, comprendida entre 1 : 1 y 1 : 2,5, de preferencia superior o igual a 1 : 1, en particular superior a 1 : 1, de preferencia inferior o igual a 1 : 2,5, en particular inferior a 2,5, más particularmente inferior o igual a 1 : 2, más particularmente inferior a 2; y
- una puesta en contacto de dicha (+)-catequina monomérica con dicho al menos un aminoácido básico, o con dicho derivado de aminoácido básico, con el fin de obtener dicha mezcla de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico o de al menos un derivado de un aminoácido básico.

45

De manera preferente con el método comprende una etapa suplementaria que consiste en una provisión de un ácido, de preferencia ácido ascórbico.

De manera alternativa, el método comprende la etapa suplementaria que consiste en una provisión de una fase acuosa y en una solubilización de dicha mezcla en dicha fase acuosa para formar un complejo de (+)-catequina y al menos un aminoácido básico, dicho complejo siendo solubilizadora en dicha fase acuosa.

Como alternativa, el método comprende además una etapa de adición de un excipiente biocompatible a dicha mezcla.

De preferencia, dicho al menos un aminoácido provisto se selecciona entre el grupo que consiste en lisina y arginina, de origen natural o de síntesis, y una mezcla de los mismos.

En los ejemplos comparativos 6 a 9 que siguen a continuación, la composición administrada por vía oral ase preparó a base de una mezcla de clorhidrolisinato (Lys: HCl) en forma pulverulenta con (+)-catequina pura monomérica a las proporciones del equivalente molar de 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 y 1 : 5.

Se obtiene una composición que comprende (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico como precursor de dicha sal de complejo [C : Lys : HCl].

Cada una de las mezclas a continuación se solubiliza en agua. Durante la solubilización de la mezcla, a formación del complejo de (+)-catequina y de clorhidrolisinato en fase acuosa. La solución obtenida de ese modo es una solución de clorhidrolisinato de (+)-catequina en forma de complejo: el complejo obtenido en esta solución es un complejo de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico (o su derivado) en una proporción de equivalencia molar idéntica a la de una mezcla como se ha descrito. Por lo tanto, una mezcla de (+)-catequina monomérica y de un aminoácido como máximo de una proporción de equivalencia molar 1 : 1 proporcionará, una vez solubilizada en la fase acuosa, una solución de complejo de de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico (o su derivado) en una proporción de equivalencia molar igual a 1 : 1.

Esta solución a continuación se administra por vía oral (PO) o por vía intravenosa (IV) a cada individuo de un grupo de 5 ratas Wistar, a razón de una dosis de 25 mg (por kg de peso corporal) de (+)-catequina monomérica pura o una dosis de lisinato de (+)-catequina equivalente a 25 mg de (+)-catequina.

Biodisponibilidad por vía oral de la composición de precursores del complejo o de la sal de complejo

Ejemplo comparativo 6: medición de la biodisponibilidad por vía oral y por vía inyectable del complejo de (+)-catequina y lisina, a una proporción de equivalencia molar de 1 : 1 y 1 : 2, en ratas

Tabla 12a: concentración plasmática (cc) de la (+)-catequina monomérica total (en ng/ml) en función del tiempo
T (min)

	IV		PO
T (min)	[C :Lys :HCl/1 : 2 : 2]	[C :Lys :HCl/1 : 1 : 1]	[C :Lys :HCl/1 :2 :2]
	cc (ng/ml)		
10	8066	6406	1839
30	2639	2259	3780
60	1191	963	3190
120	338	270	1990
240	0	0	475

Tabla 12b: concentración plasmática (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) en función del tiempo

T (min)		
	IV	PO
T (min)	[C :Lys :HCl/1 :2 :2]	[C :Lys :HCl/1 :2 :2]
	cc (ng/ml)	
10	3340	428
30	991	1027
60	291	1188
120	0	767
240	0	179

Tabla 12c: comparación de las concentraciones plasmáticas totales (ct) en ng min/ml de la (+)-catequina monomérica libre y de la (+)-catequina monomérica total después de administración intravenosa y oral de 25 mg/kg de C :Lys :HCl/ 1 : 2 :2 en ratas.

	IV	PO
Libre	87970	165325 (Δ ct* : +88 %)
Total	277040	479585 (Δ ct* : +73 %)
* Δ ct medida en que los datos IV y PO.		

Después de inyección intravenosa de la sal de complejo [C :Lys :HCl/ 1 : 2: 2], las tasas plasmáticas (cc) de (+)-catequina naturalmente muy elevadas en el momento de partida vuelven a disminuir muy rápidamente a valores muy bajos, 340 ng/ml después de 2 horas para la (+)-catequina total encontrada en el plasma y 0 ng/ml para la (+)-catequina libre, mientras que las tasas sanguíneas totales del mismo producto ingerido por vía oral en las mismas condiciones se mantienen después de 2 horas a 1990 ng/ml y la cantidad de (+)-catequina libre a 767 ng/ml, como se indican en los resultados recogidos en las tablas 12a y 12b.

Esta inyección intravenosa (que se hace posible gracias al clorhidrolisinato que hace que la (+)-catequina sea soluble) muestra, y que había una o dos moléculas de lisina asociadas a la (+)-catequina monomérica, que esta (+)-catequina se elimina rápidamente de la circulación sanguínea.

Por el contrario la ingesta por vía oral de la forma de complejo de la (+)-catequina monomérica, de una parte, aumenta las cantidades de (+)-catequina monomérica libre en la sangre, y por otra parte, prolonga el pico de concentración máxima.

Este es un resultado sorprendente. De hecho las tasas plasmáticas obtenidas después de inyección directa en la sangre proporcionan tasas sanguíneas claramente más elevadas en la primera hora después de administración que cuando el producto se proporciona por vía oral, lo que es inesperado. Por el contrario, cuando el complejo se administra por vía oral, se observan ct en (+)-catequina monomérica libre aumentadas en un 88 % con respecto a la (+)-catequina libre disponible en el plasma (ct de 165325 ng min /ml para una administración por vía oral contra solamente 87970 ng min /ml para una administración por IV), y sucede lo mismo para la catequina total encontrada en el plasma, la ct aumenta del mismo modo en un 73 % lo que es totalmente remarcable. Por lo tanto la vía oral se desvela de manera sorprendente superior a la vía intravenosa para la biodisponibilidad global, tanto si es libre como total, de la (+)-catequina en el plasma después de la administración de la sal de complejo [C :Lys :HCl/1 :2: 2].

Además, ahí donde, después de 120 min, no hay prácticamente más (+)-catequina en la sangre después de inyección IV, se observa, después de ingesta oral de la sal de complejo [C :Lys :HCl/ 1 : 2:2] en el mismo momento las tasas máximas de catequina en la sangre.

Por lo tanto se demuestra que la sal de complejo [C :Lys :HCl/ 1 : 2: 2] mejora la biodisponibilidad de la catequina de manera sorprendente, de hecho esta biodisponibilidad sanguínea de la (+)-catequina, tanto si es libre como conjugada, es sorprendentemente mejor por vía oral que mediante inyección intravenosa.

Esto muestra que las tasas y los datos de biodisponibilidad por vía intravenosa no se pueden extrapolar a la vía oral y que estos resultados se diferencian claramente del documento US 4 285 964 en el que no se ha usado a modo de ejemplo ningún ensayo de biodisponibilidad para una ingesta por vía oral.

Ejemplo comparativo 7: medición del efecto del ácido en la biodisponibilidad por vía oral del complejo de (+)-catequina y lisina en ratas

Con el fin de verificar el efecto uno de la adición de un ácido al complejo [C: Lys/ 1 : 2], los investigadores midieron las tasas de (+)-catequina monomérica libre en el plasma después de ingestión por vía oral de CP o de la sal de complejo [C: Lys: HCl/ 1 : 2: 2]. Los resultados se presentan en la tabla que sigue a continuación:

Tabla 13: parámetros de T (máx), c (máx) y ct en (+)-catequina libre presente en la sangre calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica	
	CP	[C : Lys : HCl/1 : 2 : 2]
T (máx) (min)	60	60
c (máx) (ng/ml)	580	1200
ct (ng min/ml)	91935	165325
Δct (en %)	0	+77

Se encuentra el efecto positivo de la 2 moléculas de lisina en la biodisponibilidad de la (+)-catequina monomérica y en su concentración máxima, la adición de 2 moléculas de HCl influye en el efecto de las 2 moléculas de lisina: Δct de + 77 % en presencia de HCl y de +17 % sin HCl (véase la tabla 7a).

Ejemplo comparativo 8: medición en rata del efecto de proporción de equivalencia molar entre la (+)-catequina y el aminoácido básico en la biodisponibilidad por vía oral del complejo de clorhidrolisinato de (+)-catequina

Tabla 14: parámetros de T (máx), c (máx) y ct en (+)-catequina libre presente en la sangre calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica					
	CP	ratio				
		1 : 2 : 2	1 : 2, 5 : 2,5	1 : 3 : 3	1 : 5 : 5	1 : 2 : 2 [§]
T (máx) (min)	60	60	-	60	60	60
c (máx) (ng/ml)	580	1200	-	280	265	226
ct (ng min/ml)	91935	165325	105500*	38000	31136	44095
Δct (en %)	0	+80	+15	-59	-66	-48
* valor de ct calculado a partir del perfil de la curva de evolución de la ct en función de la proporción de equivalencia molar (+)-catequina monomérica : Lisina (véase la figura 5). Los otros valores de ct calculados al principio de la figura 5 son los de la proporción 1 : 1,5 : 1,5. que es de 142000 ng min/ml y de la proporción 1 : 1 : 1 que es de 127000 ng min/ml.						
[§] tomada por vía oral separada del clorhidrolisinato y de la (+)-catequina pura.						

El valor del ct (ng min/ml) para las de complejo C :Lys :HCl / 1 : 1,5 : 1,5 informado en la curva figura 5 es de 142k ng min/ml, es decir mejor que para 1 : 1 : 1 (127k, valor informado) y mejor que para 1 : 2,5 : 2,5 (105k ng min/ml, valor informado) pero menos bueno que para 1 : 2 : 2 (165k, valor calculado).

Todos los valores de ct obtenidos para sales de (+)-catequina en proporciones iguales o inferiores a 1 : 2,5 : 2,5 son claramente mejores que los valores obtenidos para estas mismas áreas en proporciones superiores, 1 : 3 : 3 (38k, valor calculado) y 1 : 5 : 5 (26k, valor calculado).

Estos resultados confirman los resultados del ejemplo comparativo 4: la sal del complejo [C :Lys :HCl/ 1 : 2 : 2] es la única asociación de (+)-catequina - lisina que mejora claramente la biodisponibilidad por vía oral de la (+)-catequina.

Los datos de este ejemplo muestran que no solamente la sal del complejo [C :Lys :HCl/ 1 : 2 : 2] proporciona un óptimo de biodisponibilidad, sino que también, en el momento en el que se supera esta proporción, el efecto se invierte claramente, con una Δct de -59 % para la proporción de equivalencia molar de 1 : 3 : 3 y de -66 % para la proporción de equivalencia molar de 1 : 5 : 5.

Además, el hecho digerir por separado (en un intervalo de tiempo comprendido entre 5 y 10 min) la (+)-catequina monomérica y el clorhidrolisinato proporciona un efecto negativo (con una Δ ct de -48 %) con respecto a la cantidad de (+)-catequina monomérica libre en el plasma. Lo que demuestra que la catequina y la lisina se deben mezclar antes de su ingesta (en forma solubilizadora en agua uno), o al menos, se deben ingerir de manera simultánea.

Ejemplo comparativo 9: medición en rata de la naturaleza de la composición terapéutica en la biodisponibilidad por vía oral

Que la composición administrada por vía oral sea a base del complejo [C :AA/1: 1 - 1 : 2,5] preparado de acuerdo con el método que se describe en el ejemplo 1a (1b) o 2a (2b) (véanse los ejemplos 1 y 2), o bien que la composición administrada por vía oral sea una mezcla en proporción de equivalencia molar deseada de polvo de (+)-catequina y clorhidrato de lisina (denominado incluso con el nombre de clorhidrolisinato), los resultados a nivel de las biodisponibilidades por vía oral son similares (véase la tabla 15 que sigue a continuación).

Teniendo en cuenta los resultados del ejemplo comparativo 2 en el que el complejo [C :Lys/1 : 2] se preparó de acuerdo con el protocolo 1a (véase el ejemplo 1), y los resultados del ejemplo comparativo 8, en el que la sal de complejo [C :Lys: HCl/1 : 2 : 2] se preparó mediante una simple mezcla de un mol de (+)-catequina pulverulenta y de dos moles de clorhidrolisinato pulverulento y a continuación puesta en solución antes de su administración por vía oral, los resultados resumidos en la tabla 15 muestran que la mejora de la biodisponibilidad por vía oral para estos complejos permanece en el mismo orden de magnitud.

Tabla 15: parámetros de T (máx), c (máx) y ct en (+)-catequina libre presente en la sangre calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) de la (+)-catequina monomérica libre (en ng/ml) para cada fuente de (+)-catequina en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica	
	[C : Lys/1 : 2]	[C : Lys : HCl/1 : 2 : 2]
T (máx) (min)	120	60
c (máx) (ng/ml)	1547	1200
ct (ng min/ml)	186348	165325
Δ ct (en %)	+94	+80

El hecho de poder obtener parámetros óptimos de biodisponibilidad basándose en una mezcla pulverulenta de (+)-catequina y de aminoácido representa una ventaja en términos de costos de producción en el momento en el que la preparación de esta mezcla se realiza en una sola fase sólida y de manera muy fácil, lo que permite prever perspectivas de producción a gran escala.

Ejemplo comparativo 10: medición en rata de la biodisponibilidad por vía oral para quercetina y galato de epigallocatequina (EGCG)

En este ejemplo, se demuestra que el efecto de la lisina no es significativo, ni en la biodisponibilidad por vía oral de la quercetina, ni en la del galato de epigallocatequina (EGCG), como lo muestran los resultados de la tabla 16 que sigue a continuación:

Tabla 16: parámetros de T (máx), c (máx) y ct en polifenol libre presente en la sangre calculados a partir de las curvas de concentraciones plasmáticas (cc) del polifenol (en ng/ml) para cada fuente de polifenol en función del tiempo T (minuto)

	Fuente de (+)-catequina monomérica	
	QP	[Q : Lys : HCl/1 : 2 : 2] §
T (máx) (min)	60	60
c (máx) (ng/ml)	10430	8777
ct (ng min/ml)	1311645	1541945
Δ ct [¶] (en %)	0	+18

* QP: quercetina pura, es decir, sin formar complejo con al menos un aminoácido básico;

§ [Q :Lys :HCl/1 : 2 : 2]: complejo de quercetina con dos lisinas.

** Δ ct[¶]: medición de la diferencia entre la ct obtenida con el complejo y la ct medida para la QP, reducida al valor de biodisponibilidad para la QP.

En este ejemplo, la composición administrada por vía oral se preparó a base de una mezcla de clorhidrolisinato (Lys : HCl) en forma pulverulenta con quercetina o EGCG puro monomérico a las proporciones de equivalencia molar de 1 : 2 para la quercetina, y de 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 y 1 : 5, con respecto a EGCG.

- 5 Cada una de las mezclas se solubiliza en agua. Esta solución a continuación se administra por vía oral (PO) a cada individuo de un grupo de 5 ratas Wistar, a razón de una dosis de 25 mg (por kg de peso corporal) de quercetina o de EGCG monomérico puro o una dosis de lisinato de quercetina o de EGCG equivalente a 25 mg de polifenol.

- 10 Con respecto al EGCG, las tasas medidas permanecen inferiores a los límites fiables de detección (es decir, por debajo de 250 ng/ml) tanto si es para el EGCG puro o para sus formas de complejo, sea cual sea la proporción de clorhidrolisinato añadido al galato de epigallocatequina (en una proporción de equivalencia molar de 1 : 1 : 1, de 1 : 2 : 2, de 1 : 3 : 3, o incluso de 1 : 5 : 5).

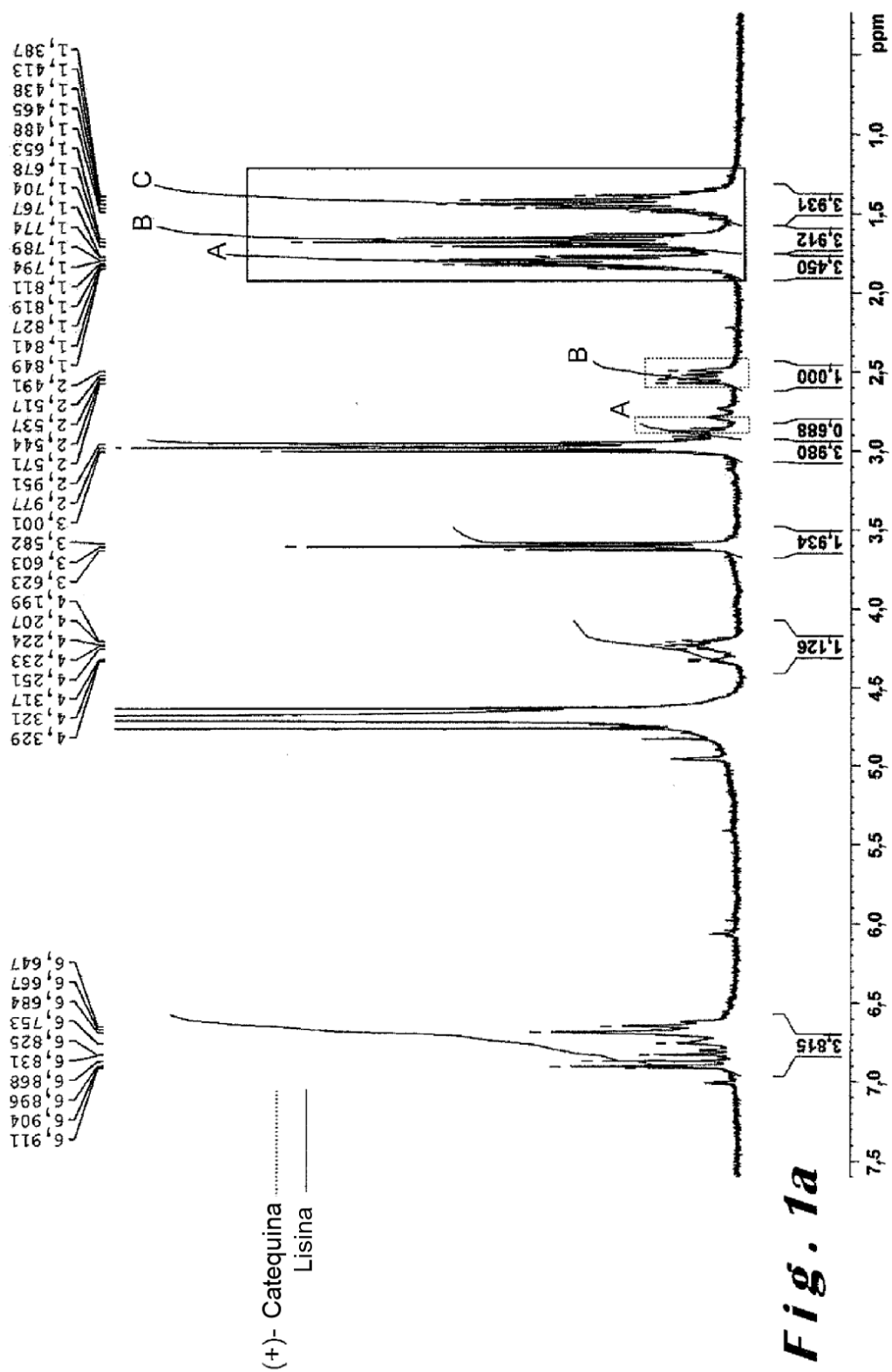
- 15 En conclusión, a la vista de los resultados de biodisponibilidad óptima obtenida para un complejo entre la (+)-catequina y el aminoácido básico a una proporción de equivalencia molar 1 : 2, y teniendo en cuenta el hecho de que los intentos de formación de complejos de polifenoles ácidos tales como la quercetina o el EGCG hayan terminado, se demuestra claramente que los complejos [C: AA/1 : 1 - 1 : 2,5] son complejos que presentan una actividad específica, con respecto a su paso a través del tracto gastrointestinal. Claramente, por lo tanto no se trata de una simple neutralización ácido-base, que en este último caso habría debido, favorecer también la
20 biodisponibilidad por vía oral de la quercetina y del EGCG.

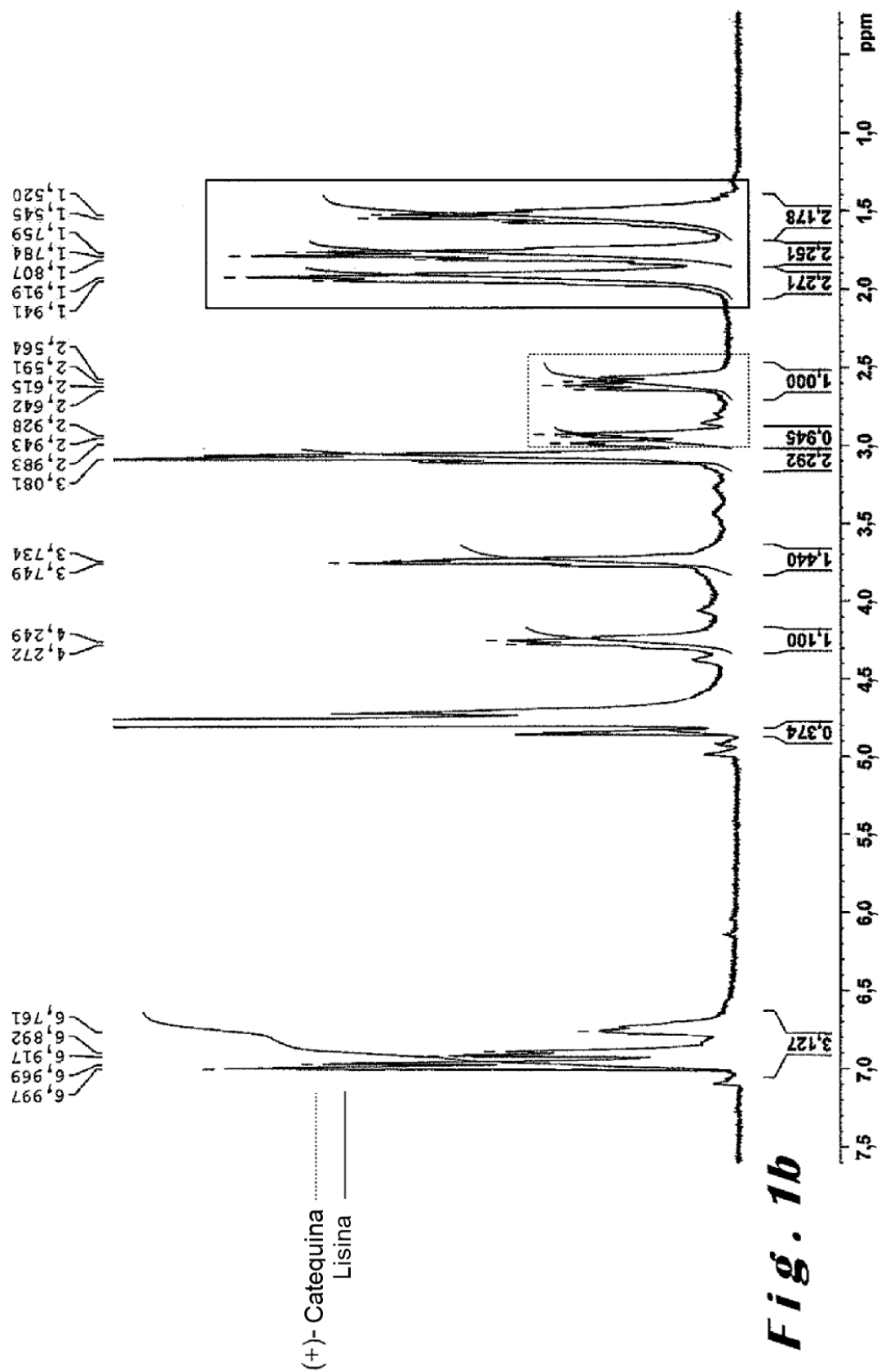
Además se entiende que la presente invención no está limitada en ningún caso a las formas particulares de realización que se han mencionado anteriormente y que se pueden proporcionar modificaciones a la misma sin apartarse del contexto de las reivindicaciones adjuntas.

25

REIVINDICACIONES

1. Composición gastroentérica para administración oral que comprende un compuesto en forma de complejo de (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico, dicha composición estando **caracterizada por que** dicho compuesto presenta una proporción de equivalencia molar entre dicha (+)-catequina monomérica con respecto a dicho al menos un aminoácido básico comprendida entre 1: 1,5 y 1 : 2,5.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proporción de equivalencia molar es igual a 1 : 2.
3. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho al menos un aminoácido básico es lisina o arginina de origen natural o de síntesis, o una mezcla de las dos, de forma ventajosa en la que dicho al menos un aminoácido básico es lisina.
4. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** dicho complejo está en forma de sal de dicho complejo, dicha sal comprendiendo dicho complejo, dicho complejo comprendiendo al menos un protón obtenido a partir de al menos un ácido y al menos un anión obtenido a partir de dicho al menos un ácido, dicha sal presentando dicho protón en cantidad equimolar con respecto a la de aminoácido básico.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho ácido se elige entre ácido ascórbico, ácido acético, ácido cítrico y ácido clorhídrico.
6. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que dicho ácido es ácido ascórbico.
7. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que dicha sal de dicho complejo es el clorhidrolisinato de (+)-catequina monomérica.
8. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** comprende además uno o varios excipientes biocompatibles.
9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el contenido de complejo de (+)-catequina con dicho al menos un aminoácido básico está comprendido entre un 15 y un 95 % en peso con respecto al peso total de dicha composición, de preferencia entre un 60 y un 90 %, de forma ventajosa de de un 65 a un 85 %.
10. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en forma sólida, en particular en forma de polvo, de comprimido, o de tableta.
11. Composición sólida gastroentérica para administración oral que comprende (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico, y opcionalmente al menos un ácido, como precursores de un complejo de dicha (+)-catequina monomérica y de dicho al menos un aminoácido básico o de una sal de dicho complejo, como preparación combinada para un uso simultáneo, dicho complejo formándose después de la administración oral, dicha (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico estando presentes en una proporción de equivalencia molar comprendida entre 1: 1,5 y 1 : 2,5, de preferencia igual a 1 : 2.
12. Composición sólida gastroentérica para administración oral que comprende (+)-catequina monomérica y al menos un aminoácido básico, y opcionalmente al menos un ácido, como precursores de un complejo de dicha (+)-catequina monomérica y de dicho al menos un aminoácido básico o de una sal de dicho complejo, como preparación combinada para un uso simultáneo en solución en una fase acuosa, dicho complejo formándose antes de la administración oral en el momento en el que la composición se pone en solución acuosa, dicha (+)-catequina monomérica y dicho al menos un aminoácido básico estando presentes en una proporción de equivalencia molar comprendida entre 1: 1,5 y 1 : 2,5, de preferencia igual a 1 : 2.
13. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en forma líquida.
14. Composición de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada, en solución 0,01 molar a 25 °C, por un pH igual o superior a 3, de preferencia comprendido entre 4 y 11, de manera ventajosa entre 4,5 y 9.
15. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para un uso en el tratamiento preventivo y/o curativo del cáncer, de preferencia cáncer hepatocelular, leucemias, mielomas, linfomas, cánceres de hígado, próstata, mama, útero, testículos, vejiga, riñones, pulmones, bronquios, huesos, boca, esófago, estómago, páncreas, colorrectal; de enfermedades inflamatorias; de la artrosis; de enfermedades genéticas del tejido conjuntivo tales como osteogénesis imperfecta, enfermedades de Marfan, enfermedades de Ehlers-Danlos, enfermedades de Cutis Laxa, esclerodermia sistémica y otras enfermedades del tejido conjuntivo donde el colágeno y/o la elastina; de deficiencias de colágeno; de úlceras pépticas así como de alergias gastrointestinales; o del envejecimiento celular.





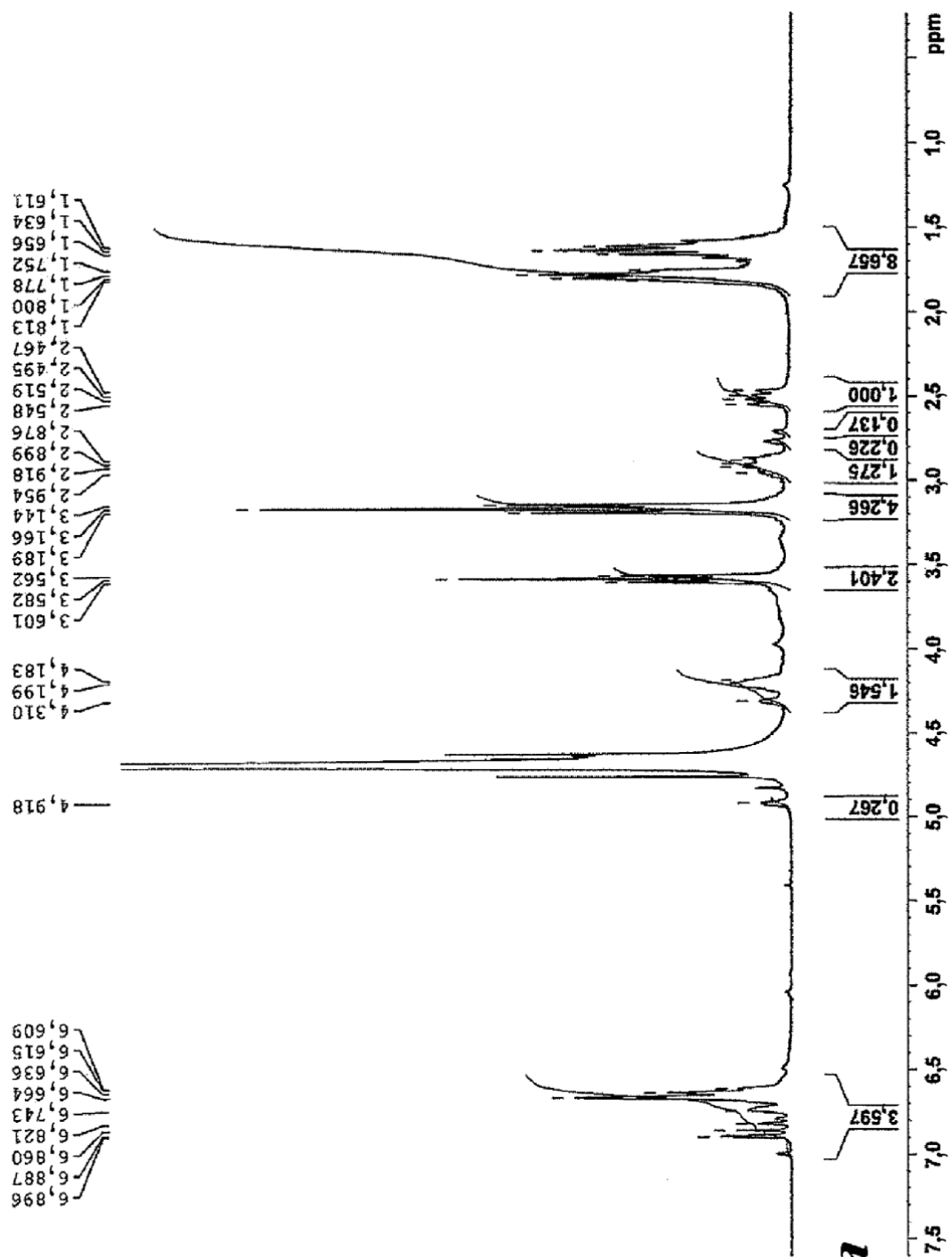


Fig. 2a

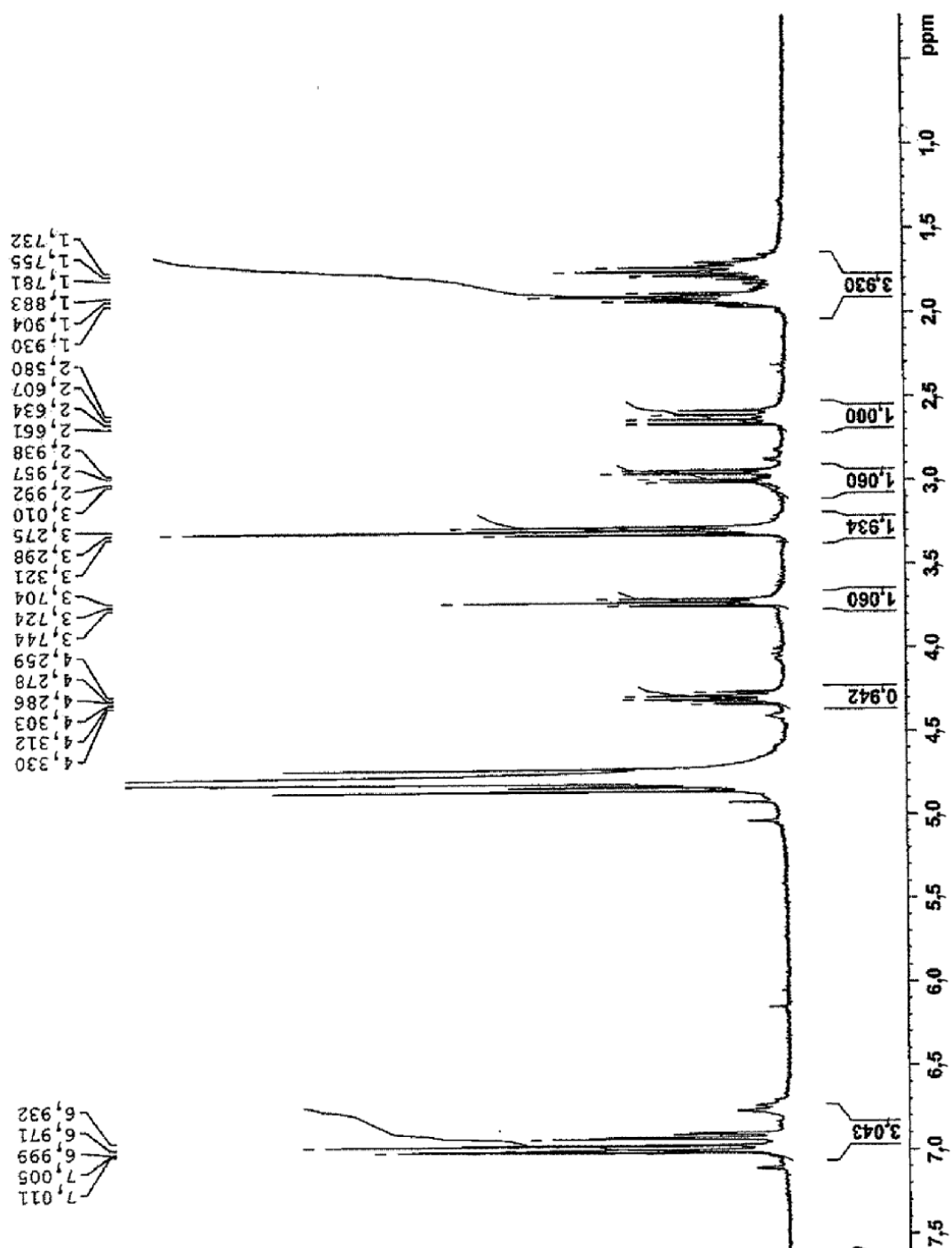


Fig. 2b

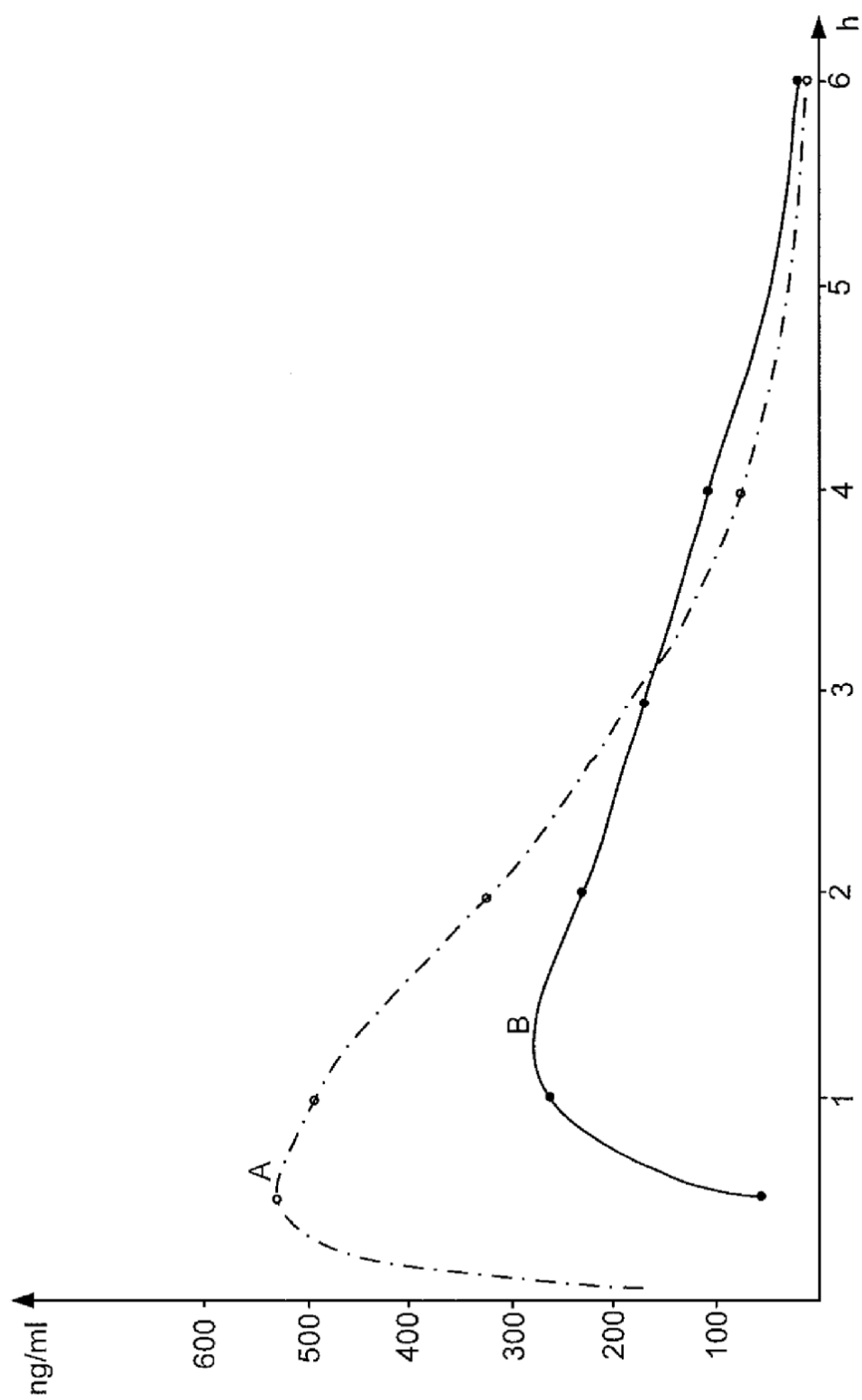


Fig. 3

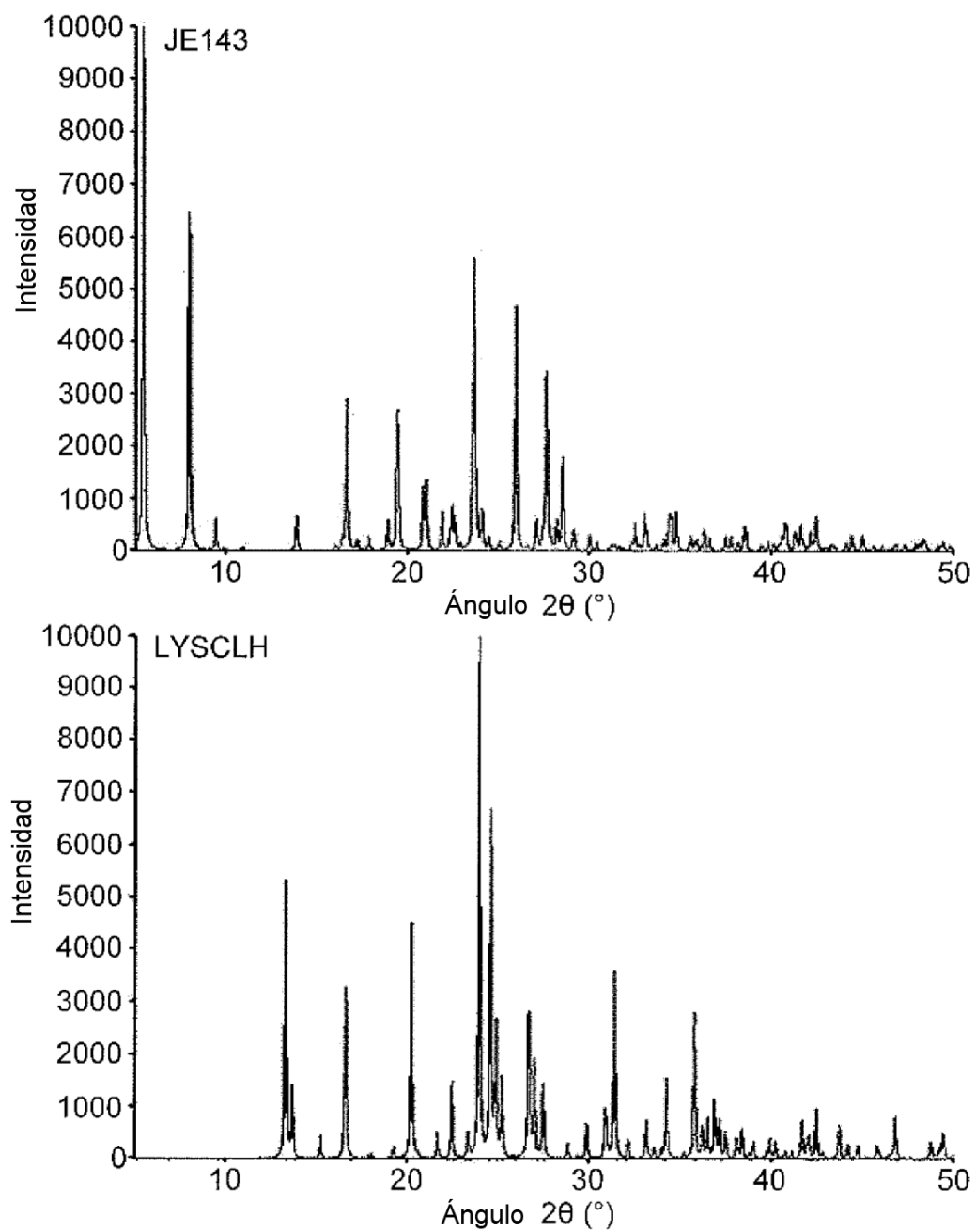


Fig. 4a

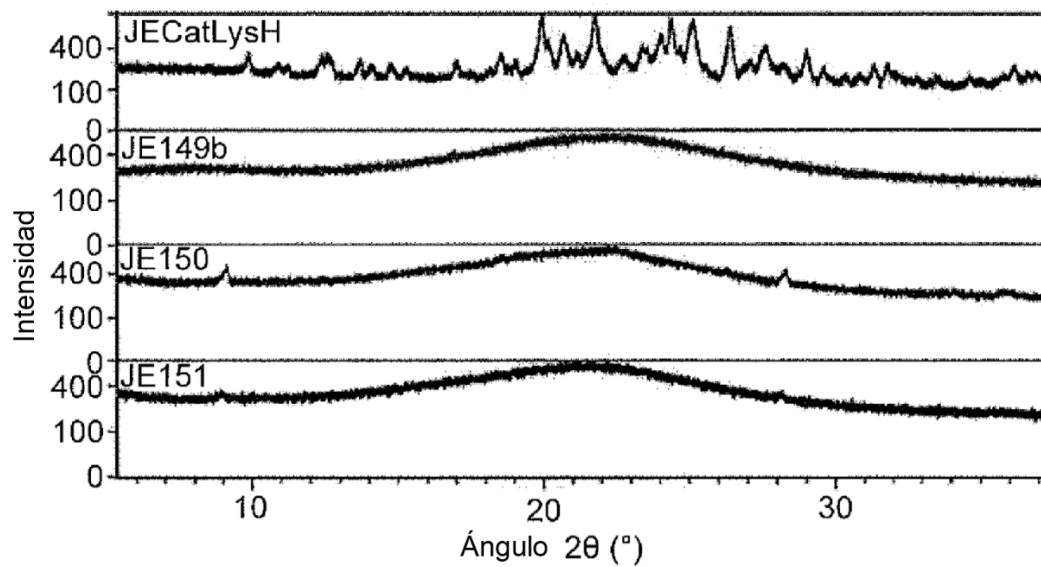


Fig. 4b

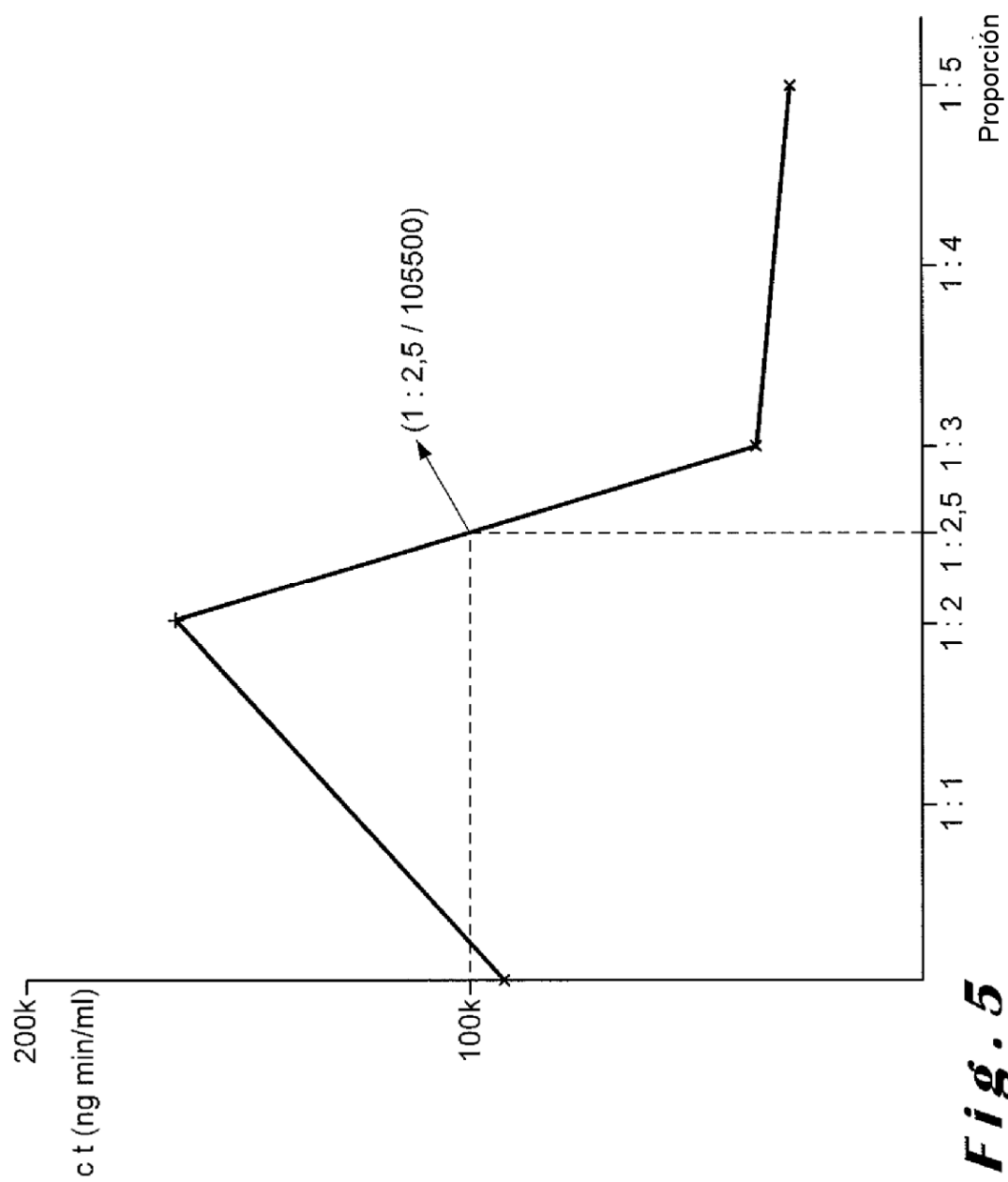


Fig. 5