

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 307 950**

⑮ Int. Cl.:

C07D 493/14 (2006.01)	A61K 31/352 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)	A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)	A61P 37/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)	A61K 8/60 (2006.01)
A61Q 5/02 (2006.01)	A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)	A23L 1/30 (2006.01)
A23L 2/00 (2006.01)	
A61K 8/18 (2006.01)	

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03738665 .3**

⑯ Fecha de presentación : **03.07.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1533313**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

⑭ Título: **Nuevos derivados de C-glicósido de flavona y composiciones que contienen estos derivados.**

⑩ Prioridad: **03.07.2002 JP 2002-194828**

⑬ Titular/es: **SUNTORY LIMITED**
1-40, Dojimahama 2-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

⑰ Inventor/es: **Ishikura, Yoshiyuki;**
Tsuji, Kuniro y
Nukaya, Haruo

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

⑰ Agente: **Ungría López, Javier**

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

Nuevos derivados de C-glicósido de flavona y composiciones que contienen estos derivados.

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de C-glicósido de flavona o sales de los mismos, especialmente los que tienen efectos anti-alérgicos, así como a composiciones que los contienen.

10 Recientemente, diversos estudios epidemiológicos han mostrado el incremento de enfermedades alérgicas. Los casos de polenosis y dermatitis atópica, en particular, han aumentado en tal grado que han llegado a constituir un problema social. Los alergenos incrementados y los cambios en nuestro entorno tales como la contaminación del aire, los aditivos de los alimentos y los cambios en los hábitos dietéticos se creen causas del incremento en enfermedades alérgicas (Itoh, Sōgō rinsyō 41::3099 (1992)). Las terapias actuales para enfermedades alérgicas suponen básicamente la separación o eliminación de los alergenos causales en combinación con terapia de fármacos, basada en la gravedad de los síntomas o en el mecanismo patogénico de cada enfermedad. Las reacciones alérgicas se clasifican en cuatro 15 tipos, tipo I a IV, basándose en la inmunoglobulina causal y células inmunes implicadas. Las alergias tipo I a III, las llamadas alergias inmediatas debido a la reacción alérgica inmediata del paciente, son inmunoreacciones en que intervienen anticuerpos humorales, mientras que la alergia tipo IV, que se conoce como alergia retardada, es una reacción inmune mediada por células en la que intervienen linfocitos sensibilizados pero no anticuerpos (Tomio, 20 Sōgō rinsyō 41::3103 (1992)).

20 Se cree que, entre estas reacciones alérgicas, las reacciones alérgicas tipo I y tipo IV intervienen en polenosis y dermatitis atópica que se tratan con antihistaminas, agentes antialérgicos básicos o esteroides.

25 Por otra parte, se han registrado solicitudes de patente que se refieren a agentes anti-alérgicos que utilizan extractos de té oolong o galato de epigalocatequina de té verde (Patente japonesa JP A HEI 10-077231, JPA HEI 10-175874, Patente japonesa No. 3023962, etc.). Se ha informado de que las flavonas y sus glicósidos tienen el efecto de inhibir la liberación de histamina desde células cebadoras o tienen un efecto inmunosupresor, y es de esperar su posible utilización en terapias alérgicas. (Kubo M. y col.. *Chem. Farm. Bull.* 32: 5051 (1984)). Sin embargo, la mayor parte de las flavonas, exhiben sus efectos solo cuando están a grandes dosis, por lo que es muy deseable encontrar compuestos 30 eficaces a dosis más bajas.

35 Un objeto de la presente invención es aislar/identificar compuestos que tengan un efecto anti-alérgico y proporcionar nuevos componentes capaces de tratar enfermedades alérgicas a dosis bajas y composiciones que contienen tales componentes.

40 Para resolver los problemas anteriores, los autores de la presente invención han puesto el énfasis en el efecto anti-alérgico del té oolong, han examinado atentamente sus componentes anti-alérgicos, y han encontrado que nuevos derivados de C-glicósido de flavona o sales de los mismos tienen el efecto de inhibir la formación de edemas en la oreja inducidos por 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) y el efecto de inhibir la liberación de histamina desde las células cebadoras peritoneales. Los autores de la presente invención han encontrado también que pueden aplicarse como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas, composiciones alimenticias o cosméticos. De esta forma 45 han llegado a la presente invención.

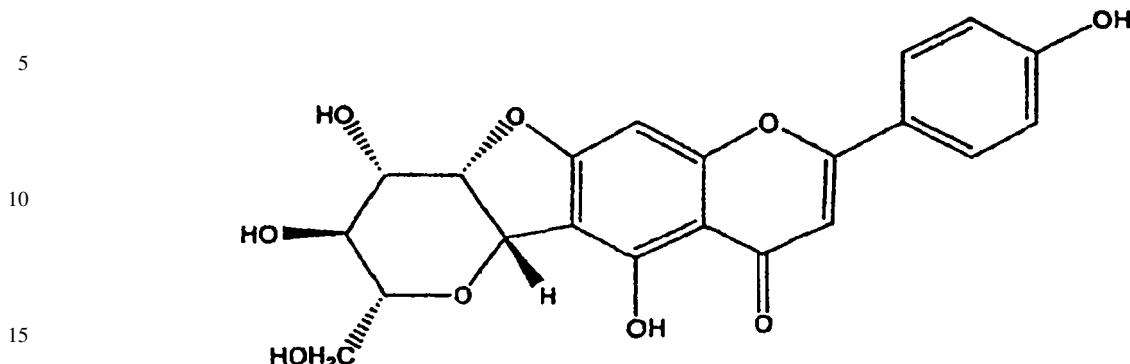
50 La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo experimental 1. Se muestran los efectos inhibidores del compuesto (1) de la presente invención a tres concentraciones que corresponden a las dosis orales de 0,2, 1,0 y 5,0 µg/kg en dermatitis de contacto en oreja de ratón comparando con un grupo de control tratado con carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N.

55 La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo experimental 2. Se muestran los efectos inhibidores del compuesto (2) de la presente invención a tres concentraciones que corresponden a las dosis orales de 1,0, 10 y 100 µg/kg en dermatitis de contacto de oreja de ratón comparado con un grupo de control tratado con carboximetilcelulosa sódica/ácido clorhídrico 0,01N.

La Figura 3 muestra las estructuras de flavonoides.

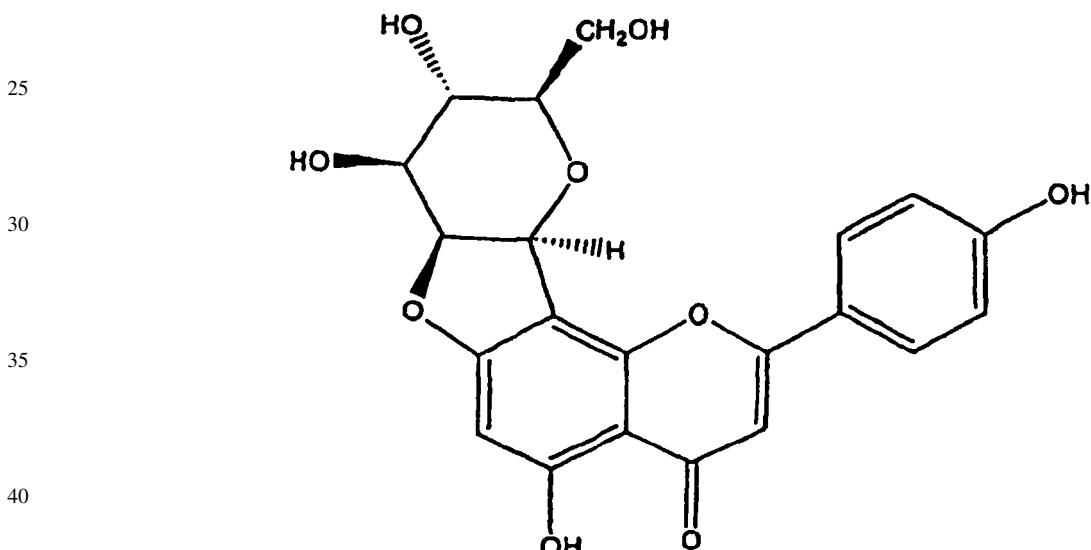
60 Tal como se ha descrito antes, los autores de la presente invención han puesto el énfasis en el efecto alérgico del té oolong y han examinado atentamente los componentes anti-alérgicos del té oolong para resolver los problemas anteriores, y han encontrado que nuevos derivados de C-glicósidos de flavona o sales de los mismos tienen el efecto de inhibir la formación de edema en la oreja inducido por 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) y el efecto de inhibir la liberación de histamina desde las células cebadoras peritoneales. Los autores de la presente invención han encontrado que pueden aplicarse como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas, composiciones alimenticias o cosméticas. De esta forma se ha llegado a la presente invención.

Según esto, la presente invención se refiere a un derivado de C-glicósido de flavona de fórmula (1):



o una sal del mismo.

20 La presente invención se refiere también a un derivado de C-glicósido de flavona de fórmula (2):



45 o una sal del mismo.

50 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad alérgica que contiene al menos uno de los citados derivados de C-glicósido de flavona o una sal del mismo. Se refiere también a la citada composición farmacéutica donde la citada enfermedad alérgica es al menos una entre dermatitis atópica, dermatitis de contacto o polenosis.

55 La presente invención se refiere a una composición alimenticia que contiene al menos uno de los citados derivados de C-glicósido de flavona (1) ó (2) o una sal de los mismos. La presente invención se refiere también a la citada composición alimenticia en la forma de cualquiera de los suplementos de la dieta o bebidas nutritivas, bebidas para la salud, té para la salud u otras bebidas. También se refiere a la citada composición alimenticia en la forma de cualquier tipo de dulces, panecillos, pastas, productos de soja procesados, productos lácteos, productos de huevo procesados, pasteles de pescado, grasas, aceites o condimentos.

60 La presente invención se refiere también a un cosmético que contiene al menos uno de los citados derivados de C-glicósido de flavona (1) ó (2) o una sal de los mismos. La presente invención se refiere al citado cosmético en la forma de cualquiera de los productos de cuidado de la piel, productos de maquillaje, cosméticos para el cabello o productos de baño.

65 Los derivados de C-glicósido de flavona de fórmula (1) y/o de fórmula (2) o sales de los mismos según la presente invención se pueden obtener a partir de hojas de té, por ejemplo, por extracción con un disolvente con calentamiento, concentración y purificación utilizando medios convencionales de separación/purificación química (por ejemplo fraccionamiento o cromatografía).

ES 2 307 950 T3

Las hojas de té que pueden utilizarse para la preparación incluyen hojas de *Camellia sinensis* y/u hojas procesadas d la misma. Se prefiere especialmente el té oolong. El té oolong es un té semifermentado que se produce principalmente en la provincia de Fujian o Guandong de China continental o Taiwan.

5 El disolvente utilizado para elución puede ser un disolvente acuoso o un disolvente orgánico, pero preferiblemente es un disolvente acuoso. El disolvente acuoso es, deseablemente, agua, etanol o metanol. Puede ser agua sola o cualquier solución mixta de agua y un alcohol inferior tal como metanol o etanol.

10 La relación de hojas de té oolong a disolvente en el proceso de extracción no está específicamente limitada, pero, preferiblemente, la relación en peso de las hojas de té oolong a disolvente es de 2-1000, más preferiblemente, 5-100 en términos de operación de extracción y rendimiento.

15 La temperatura en el proceso de elución no está específicamente limitada siempre que sea más alta que el punto de fusión del disolvente y más baja que su punto de ebullición, pero deseablemente es de 10°C a 100°C para el agua o 10° a 40°C para el etanol y el metanol. El período de extracción está, preferiblemente, entre 10 segundos y 24 horas.

20 Se pueden utilizar medios químicos de separación/purificación convencionales tales como distribución líquido-líquido, cromatografía en capa fina, cromatografía de columna de adsorción, cromatografía de columna de reparto, cromatografía en columna de filtración con gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, electroforesis y 25 cromatografía en columna de líquido de alta velocidad. Si se desea, se pueden combinar estos medios de separación/purificación para purificar los derivados de C-glicósido de flavona de fórmula (1) y fórmula (2) o sales de los mismos hasta obtener alta pureza.

25 Los derivados de C-glicósido de flavona de fórmula (1) y fórmula (2) o sales de los mismos según la presente invención presentan un efecto anti-alérgico de manera que pueden utilizarse para diversas aplicaciones tales como productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos. Para productos farmacéuticos, los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2), o sales de los mismos, se pueden emplear como agentes antialérgicos, especialmente con el propósito de tratar la dermatitis atópica, dermatitis de contacto, y polenosis, ya que muestran el efecto de inhibir la formación 30 de edema en la oreja inducido por DNFB y el efecto de inhibir la liberación de histamina. En los alimentos, se pueden añadir como aditivos de alimentos en suplementos de la dieta o alimentos para la salud para el propósito de aliviar o evitar síntomas de dermatitis atópica, dermatitis de contacto y polenosis. Se pueden añadir a diversos alimentos. Se pueden añadir a bebidas en suplementos de dieta u otras bebidas nutritivas, bebidas para la salud, té para la salud u otras bebidas. Pueden añadirse también a otros alimentos tales como dulces, panecillos, pastas se sopa, 35 productos de soja procesados, productos lácteos, productos de huevo procesados, pasteles de pescado, grasas y aceites o condimentos. Los compuestos de fórmula (1) y fórmula (2) y sales de los mismos se pueden añadir a cosméticos tales como a productos de cuidado de la piel, productos de base o de maquillaje con el propósito de aliviar o prevenir los síntomas de dermatitis atópica, dermatitis de contacto y polenosis.

40 Lo mismo que para los productos farmacéuticos, los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) o sales de los mismos se pueden administrar por vía oral directamente o después de diluir con agua o similar. Alternativamente, pueden 45 formularse con vehículos farmacéuticos conocidos. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (1) y/o fórmula (2) o sales de los mismos se pueden administrar como formulaciones líquidas orales, tales como jarabes, o como formulaciones sólidas tales como tabletas, cápsulas, gránulos y polvos que contienen sus extractos o polvos en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen varios materiales vehículo farmacéuticos orgánicos o inorgánicos convencionales y se añaden como excipientes, lubricantes, aglutinantes o disgregantes en formulaciones sólidas, o disolventes, excipientes, agentes de suspensión, o aglutinantes en formulaciones líquidas. Si se desea, se pueden añadir también aditivos farmacéuticos tales como conservantes, antioxidantes, colorantes y edulcorantes.

50 Los ejemplos de excipientes preferidos incluyen lactosa, sacarosa, D-manita, almidón, celulosa cristalina y anhidrido silícico claro. Ejemplos preferidos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, talco y sílice coloidal. Ejemplos preferidos de aglutinantes incluyen celulosa combinada, sacarosa, D-manita, dextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxi-propilmetylcelulosa y polivinilpirrolidona. Entre los ejemplos preferidos de disgregantes 55 se incluyen polietilen glicol, propilen glicol, D-manita, benzoato de bencilo, etanol, tris-aminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio y citrato de sodio. Entre los ejemplos preferidos de disolventes se incluyen agua purificada, alcoholes y propilenglicol. Ejemplos preferidos de agentes de suspensión incluyen agentes tensioactivos tales como estearato de etanolamina, laurilsulfato de sodio, ácido lauril aminopropiónico, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y monoestearato de glicerina, y polímeros hidrófilos tales como poli alcohol vinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxi-etylcelulosa e hidroxi-propilcelulosa. Entre los ejemplos preferidos de conservantes se incluyen ésteres del ácido paraoxibenzoico, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, ácido dehidroacético y ácido sóblico. Entre los ejemplos preferidos de 60 antioxidantes se incluyen sulfitos y ácido ascórbico.

65 Las formas de dosificación son las adecuadas para administración oral, parenteral o nasal, tales como tabletas o tabletas recubiertas con azúcar, tabletas sublinguales, cápsulas de gelatina, pastillas, supositorios, cremas, pomadas, y geles para la piel, dependiendo del tipo o gravedad de la enfermedad. La dosis eficaz depende de la edad y peso corporal del paciente, el tipo o gravedad de la enfermedad y la vía de administración. La dosis unidad está por lo general en el intervalo de 0,0001 a 100 mg/kg, que se administra de una a tres veces en 24 horas.

ES 2 307 950 T3

En el caso de ser para alimentos, los compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2) o sales de los mismos se pueden administrar como tales o en la forma de alimentos o bebidas que contienen sus extractos o polvos. Pueden proporcionarse también como bebidas, dulces, panecillos, pastas de sopa, productos de soja procesados, productos lácteos, productos de huevo procesados, pasteles de pescado, grasas y aceites o condimentos, en combinación con materiales convencionales para alimentos y bebidas y vehículos aceptables para ingredientes de alimentos y bebidas,

10 Tal como aquí se utiliza, el término bebida incluye bebidas de té oolong, bebidas de té mezcladas con otras bebidas de té, bebidas carbonatadas, bebidas de frutas, bebidas con bacterias de ácido láctico, bebidas isotónicas, leche de soja y licores tales como vino, licores destilados, whisky y sake mezclados con bebidas de té oolong u otras bebidas de té.

10 Tal como aquí se utiliza el término dulces incluye galletas, chocolates, caramelos, chicles, cosas de picar y fritos, pasteles frescos occidentales, pasteles japoneses tradicionales, helados y gominolas.

15 Los productos de soja procesados incluyen flan de habas de soja, y los productos lácteos incluyen yogur y mantequilla. Los productos de huevo procesados incluyen tortilla y revuelto hecho al vapor en la olla, y los pasteles de pescado incluyen salchichas de pescado. Los condimentos incluyen salsas, guarniciones, mayonesa y varios copos de pescado y verduras. Se pueden preparar por los procedimientos convencionales.

20 Los vehículos aceptables para ingredientes de alimentos y bebidas incluyen edulcorantes tales como azúcar, glucosa, fructosa, azúcar líquido isomerizado, fructooligosacáridos, aspártamo, sorbita y estevia, colorantes tales como colorante de col roja, colorante de la piel de uva, colorante de baya de saúco, caramelo, colorante de gardenia, colorante del maíz, colorante de azafrán, y caroteno; conservantes tales como hidrolizado de pectina, ácido benzoico, ácido sóblico, ésteres de ácido paraoxibenzoico y sorbato de potasio; agentes gelificantes tales como alginato de sodio, éster alginato de propilenglicol, caseinato de sodio, glicolato de celulosa calcio, y glicolato de celulosa sodio; antioxidantes tales como ácido L-ascórbico, tocoferol, ácido eritórbico y rutina; agentes de fijación del color tales como sulfato ferroso, nitrito de sodio, y nitrato de potasio; agentes de blanqueo tales como bisulfito de sodio y metabisulfito de potasio; agentes de mantenimiento de la calidad tales como propileglicol; agentes mejoradores de la calidad tales como hidrocloruro de L-cisteína y estearil lactato de calcio; agentes de fermentación tales como cloruro de amonio, hidrogeno d-tartrato de potasio, carbonato de amonio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio y alumbre; emulsificantes tales como lecitina, esfingolípidos, esterol vegetal, saponina de soja, alginato sódico, éster alginato de propilen glicol, caseínato de sodio, éster de ácido graso y glicerina, éster de ácido graso y sacarosa y éster de ácido graso y sorbitano; estabilizante de emulsiones tal como condroitin sulfato de sodio, saborizantes tales como aceite de limón, aceite de eucaliptus, aceite de menta, extracto de vainilla, aceite de naranja, aceite de ajo, acetacetato de etilo, anisaldehido, etil vanillina, ácido cinámico, acetato de citronelilo, citral, vanillina, butirato de butilo y ésteres; productos para la salud tales como ácido L-ascórbico y, L-asparagina, L-alanina, inosita, L-glutamina, caroteno, tocoferol, vitamina A, ácido fólico, citrato de hierro, hemo hierro, y calcio sin calcinar; mejoradores de la harina tales como peróxido de benzoilo, persulfato de amonio, y dióxido de cloro, bactericidas tales como cloruro de cal, peróxido de hidrógeno, y ácido hipocloroso, bases de chicles tales como ricinoleato de metil acetilo, goma de éster, resina de acetato de vinilo, poliisobutileno y polibuteno, agentes anti-apelmazamiento tales como D-manita; aglutinantes tales como pirofosfato de sodio ácido, pirofosfato de potasio y pirofosfato de sodio; acidulantes tales como ácido adípico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido d-tartárico, ácido láctico, y ácido dl-málico; y condimentos tales como extractos de mariscos, extractos de levadura, extractos de algas marinas, salsa de soja, puré de tomate, extractos de carne, vino de arroz dulce japonés para cocinar, purés de frutas, carne de bonito hervida y desecada, L-aspartato de sodio, DL-alanina, L-arginina, L-glutamatos, 5'-inosinato disódico, citrato trisódico, ácido L-glutámico, L-glutamato de sodio, ácido succínico, ácido L-tartárico y lactato de sodio.

55 Los compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2) o sales de ellos según la presente invención se pueden utilizar directamente o después de diluir con agua o similar o después de concentración o desintegración o granulación en combinación con vehículos conocidos, en la forma de aerosoles, soluciones, extractos, suspensiones, emulsiones, pomadas, cataplasmas, linimentos y lociones. Alternativamente, se preparan por selección apropiada de componentes acuosos, agentes tensioactivos, componentes oleosos, solubilizantes, humectantes, componentes de polvo, alcoholes, modificadores del pH, conservantes, antioxidantes, espesantes, tintes, pigmentos, y perfumes, utilizados en cosméticos conocidos, productos de para-farmacia y pomadas.

55 Tal como aquí se utiliza, el término productos de cuidado de la piel incluye lociones para la piel tales como loción emoliente y loción astringente, cremas tales como crema emoliente, crema hidratante y crema de masaje, y emulsiones tales como emulsión emoliente, emulsión nutritiva y emulsión limpiadora.

60 Los cosméticos para maquillaje incluyen limpiadoras para la cara, limpiadoras de la piel, bases, color de ojos, colorete para las mejillas y color para los labios.

65 Los cosméticos para el cabello incluyen champús, enjuagadores, agentes de tratamiento del cabello, cremas para el cabello, agentes de marcado del cabello, tónicos para el cabello, agentes para crecimiento del cabello y promotores del crecimiento del cabello. Los productos para baño incluyen aceites de baño, sales de baño y espumas de baño.

65 La concentración en alimentos y cosméticos no está limitada específicamente, pero es preferiblemente de 0,0001-100% en peso, especialmente 0,001-50% en peso expresada como sólidos secos.

Ejemplos**Ejemplo 1****5 Ejemplo de preparación**

Se extrajeron 5,0 kg de hojas de té oolong, producido en la provincia de Fujian de la China continental, con 100 litros de agua caliente, se dejaron enfriar los extractos y se aplicaron luego a una columna rellena con 30 litros de un adsorbente sintético (DIAION HP-21, Mitsubishi Chemical). Las fracciones sin adsorber se aplicaron a una columna con relleno de 30 litros de un adsorbente sintético (DIAION HP-20, Mitsubishi Chemical) y se eluyeron con concentraciones en serie creciente de etanol en agua (60 litros cada una) para dar 4 fracciones [concentraciones de etanol igual a 0% (OHF3N), 20% (OHF4N), 40% (OHF5N), 99,5% (OHF6N)].

Entre estas 4 fracciones, la fracción OHF3N mostraba el efecto inhibidor más fuerte sobre el edema de oreja inducido por DNFB. La formación se concentró y se secó por congelación (517 g) y se sometió a distribución en contracorriente en un sistema agua-n-butanol ($n=7$) y, al cabo de 7 transferencias, la fracción se concentró a presión reducida (2,1 g). Se aplicó entonces lo resultante a una columna rellena con Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech) y se eluyó con metanol, y se recogieron las fracciones del intervalo 1,9-2,2 Kd. Se concentraron las fracciones a presión reducida y se separaron por cromatografía HPLC en una columna SENSUH PAK DIOL-1251 (SENSUH Scientific, 4,6 x 250 mm) utilizando un disolvente hexano : metanol : tetrahidrofurano = 50 : 35 : 15 como fase móvil, a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto (30°C) y se recogió un pico (detectado por UV 280 nm) eluido a un tiempo de retención de 5,8 minutos. Después de concentración a presión reducida se purificó por HPLC utilizando YMC-Pack ODS-A (YMC, 4,6 x 150 mm). El producto purificado se recogió y se concentró a presión reducida para dar 980 μ g de un polvo amarillo pálido.

Como resultado del análisis estructural por técnicas espectrométricas tales como RMN y EM (MS) y análisis por rayos-X (véase Tabla 1 y Tabla 2), el presente compuesto se identificó como un compuesto de fórmula (1) [compuesto (1)] producido por condensación de deshidratación intramolecular entre el OH en 7 de isovitexina (véase Figura 3) y el OH en 1 sobre la cadena de azúcar.

30

TABLA 1

Determinación estructural del compuesto (1) por 1H -RMN y ^{13}C -RMN

35	Muestra	Aglucón		Azúcar	
		C	H	C	H
40	2	168,1		1"	74,6
	3	102,9	6,58,s	2"	89,0
45	4	184,8		3"	73,9
	5	168,7		4"	69,8
50	6	112,6		5"	80,6
	7	166,5		6"	63,5
	8	91,8	6,64 s		3,62 m. 3,83 m
55	9	161,2			
	10	107,9			
60	1'	119,3			
	2'	130,2	7,80 d		
	3'	119,3	6,80 d		
	4'	168,1			
	5'	119,3	6,80 d		
65	6'	130,2	7,80 d		
	<i>Determinación estructural del compuesto (1) por 1H-RMN y ^{13}C-RMN (ppm en CD₃OD)</i>				

ES 2 307 950 T3

TABLA 2

Determinación estructural de compuesto (1) por análisis de rayos X

5	Dimensions del cristal	0,10 x 0,05 x 0,20 mm
10	Parámetros del retículo	$a = 18,811(6) \text{ \AA}$ $b = 26,270(6) \text{ \AA}$ $c = 6,905(1) \text{ \AA}$ $V = 1961,0 \text{ \AA}^3$
15	Grupo espacial	$P2_12_12_1$
20	valor Z	4
25	D_{calc}	1,403 g/cm ³
30	Valor R	0,078

Durante el proceso de purificación del compuesto (1) se sometió la fracción OHF3N (517 g) a distribución en contracorriente en un sistema agua-n-butanol (n=7) y, después de 7 transferencias, se concentró la fracción a presión reducida (2,1 g). Se aplicó entonces lo resultante a una columna rellena con Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech), se eluyó con metanol y se recogieron las fracciones del intervalo 1,6-1,9 Kd. Se concentraron las fracciones a presión reducida y se separaron por cromatografía HPLC sobre una columna SENSU PAK DIOL-1251 (SENSU Scientific, 46 x 250 mm) utilizando un disolvente hexano : metanol: tetrahidrofurano = 50 : 35 : 15 como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto (30°C) y se recogió un pico (detectado por UV 280 nm) eluido a un tiempo de retención de 5,8 minutos. Después de concentrar a presión reducida, la fracción se purificó por cromatografía HPLC utilizando YMC-Pack ODS-A (YMC, 4,6 x 150 mm). El producto purificado se recogió y se concentró a presión reducida para dar 147 μ g de un polvo amarillo pálido.

Como resultado de análisis estructural por técnicas espectrométricas tales como RMN y EM (SM) y análisis de rayos X (véase Tabla 3 y Tabla 4) el presente compuesto se identificó como compuesto de fórmula (2) [compuesto (2) producido por condensación de deshidratación intramolecular entre el OH en 7 de la Vitexina (véase Figura 3) y el OH en 1 sobre la cadena de azúcar.

50

55

60

65

ES 2 307 950 T3

TABLA 3

Determinación estructural de compuesto (2) por ¹H-RMN y ¹³C-RMN

5	Muestra	Aglucón		Azúcar	
		C	H	C	H
10	2	166,8		1"	75,1
	3	104,3	6,66 s	2"	89,1
	4	184,4		3"	73,8
15	5	166,2		4"	69,8
	6	96,3	6,39 s	5"	80,5
	7	168,9		6"	63,4
20	8	108,5			3,65 m. 3,87 m
	9	155,1			
	10	106,7			
25	1'	125,0			
	2'	130,2	7,90 d		
	3'	118,0	6,93 d		
30	4'	164,9			
	5'	118,0	6,93 d		
	6'	130,2	7,90 d		
35	<i>Determinación estructural del compuesto (2) por ¹H-RMN y ¹³C-RMN (ppm en CD₃OD)</i>				

TABLA 4

Determinación estructural del compuesto (2) por análisis de rayos X

45	Dimensiones del cristal	0,03 x 0,10 x 0,30 mm
50	Parámetros del retículo	$a = 9,785(2) \text{ \AA}$ $b = 19,700(5) \text{ \AA}$ $c = 4,9357(8) \text{ \AA}$ $V = 950,1(3) \text{ \AA}^3$
55	Grupo espacial	$P2_1$
60	valor Z	2
65	D_{calc}	1,560 g/cm ³
	Valor R	0,058

ES 2 307 950 T3

Ejemplo experimental 1

Efecto inhibidor sobre dermatitis de contacto en oreja de ratón

5 Se adquirieron en CLEA, Japón, ratones de cepa ICR de 7 semanas de edad y se utilizaron para los experimentos después de pre-acondicionamiento durante 1 semana. El polvo amarillo obtenido en el Ejemplo 1 [compuesto (1)] se suspendió en carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N para preparar formulaciones de muestra a tres concentraciones correspondientes a las dosis de 0,2, 1,0 y 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un volumen de dosis de 10 ml/kg. Se estableció una infección en 6 ratones por grupo en 5 días por inyección subcutánea de 100 μl de una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) al 1% en etanol sobre la parte trasera. Al sexto día se aplicó sobre la oreja derecha una solución al 1% de DNFB en aceite de oliva para inducir dermatitis de contacto en la oreja. Al cabo de 24 horas se punzaron ambas orejas en un diámetro de 8 mm y se pesó lo punzado. El compuesto (1) se administró oralmente de forma continua durante 7 días desde el día antes del reto primero hasta el día en el que se indujo el edema. Se trató un grupo de control con carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N. Los resultados experimentales 10 se expresaron como porcentaje medio de edema de la oreja derecha en relación a la izquierda con la desviación típica, utilizando el ensayo t de Student para evaluar la significación entre grupos. Los resultados se muestran en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, el edema inducido por DNFB era inhibido significativamente en los grupos tratados con 1,0 y 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto (1) en comparación con el grupo control tratado con carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N.

20 **Ejemplo experimental 2**

Efecto inhibidor sobre dermatitis de contacto de oreja de ratón

25 Se adquirieron en CLEA, Japón, ratones de cepa ICR de 7 semanas de edad y se utilizaron para los experimentos después de pre-acondicionamiento durante 1 semana. El polvo amarillo obtenido en el Ejemplo 1 [compuesto (2)] se suspendió en carboximetilcelulosa sodio al 5%/ácido clorhídrico 0,01N para preparar formulaciones de muestra a tres concentraciones correspondientes a las dosis de 1,0, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un volumen de dosis de 10 ml/kg. Se estableció una infección en 6 ratones por grupo en 5 días por inyección subcutánea de 100 μl de una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) al 1% en etanol sobre la parte trasera. Al sexto día se aplicó sobre la oreja derecha una solución al 1% de DNFB en aceite de oliva para inducir dermatitis de contacto. A las 24 horas se punzaron ambas orejas en un diámetro de 8 mm y se pesaron las partes sacadas. El compuesto (2) se administró oralmente de forma continua 30 durante 7 días desde el día anterior al reto primero hasta el día en el que se indujo el edema. Se trató un grupo de control con carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N. Los resultados experimentales se expresaron como porcentaje medio de edema de la oreja derecha en relación a la izquierda con la desviación típica, utilizando 35 el ensayo t de Student para evaluar la significación entre grupos. Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, el edema inducido por DNFB era inhibido significativamente en los grupos tratados con 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto (2) en comparación con el grupo control tratado con carboximetilcelulosa sodio al 0,5%/ácido clorhídrico 0,01N.

40 **Ejemplo experimental 3**

Efecto inhibidor sobre liberación de histamina desde las células cebadoras peritoneales

45 Se adquirieron ratas de cepa Wistar de 7 semanas de edad en CLEA, Japón, y se utilizaron para los experimentos después de pre-acondicionamiento durante 1 semana. Despues se decapitaron las ratas Wistar bajo anestesia con éter. Se inyectó intraperitonealmente solución Tyrode. Las células cebadoras se aislaron rutinariamente y se suspendieron a $1-3 \times 10^8$ células/ml en solución Tyrode que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% para preparar una suspensión de células cebadoras. La suspensión de células cebadoras se incubó con compuesto (1) o compuesto (2) 50 disuelto en metanol al 50% a 37°C durante 5 minutos. Se incubó entonces además la suspensión con compuesto 48/80 a 37°C durante 10 minutos, se enfrió sobre hielo y después se centrifugó. Se midió entonces el contenido de histamina libre en el sobrenadante resultante por cromatografía de líquidos de alta velocidad por el método de post-columna utilizando orto-ftalaldehido (OPA) según el método de Onda y col. [J. Med. Sci., 27, 93-97 (1978)]. Los resultados experimentales 55 se expresaron como porcentaje de liberación de histamina inhibido por el tratamiento de las muestras comparando con el tratamiento con el disolvente solo. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Resultados del ensayo de inhibición de la liberación de histamina

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibición de la liberación de histamina (%)
Compuesto (1)	5,0	62,3
Compuesto (2)	50,0	51,2

ES 2 307 950 T3

Ejemplo 2

Comparación con los efectos de un esteroide y otros flavonoides

5 Se utilizaron los mismos procedimientos que en los Ejemplos experimentales 1 y 2 para comparar los efectos inhibidores de un corticosteroide y varios flavonoides (Figura 3) sobre la formación de edema de oreja inducido por DNFB con los de compuesto (1) y compuesto (2). Los resultados experimentales se expresaron como la dosis que produce una inhibición del 50% de edema de oreja inducido por DNFB. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

10 La administración del compuesto (1) y compuesto (2) mostraba un efecto inhibidor sobre la formación de edema a dosis mucho más pequeñas que el corticosteroide u otros flavonoides.

TABLA 6

15 *Resultados de la evaluación del efecto inhibidor sobre la formación de edema en la oreja*

	Dosis que produce 50% de inhibición de edema de la oreja (mg/kg por boca)
Compuesto (1)	0,05
Compuesto (2)	0,17
Dexametazona	1,5
Apigenina	247
Vitexina	103
Ramnosil vitexina	146
Quercetina	265
Rutina	123

Ejemplo 3

Ejemplo de preparación de tabletas

40 Se prepararon tabletas que tenían un diámetro de 10 mm y un peso de 300 mg cada una por mezcla de 150 g de compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 con la misma cantidad de lactosa y 5 g de estearato de magnesio y comprimiendo esta mezcla utilizando una prensa de tabletas de un solo golpe.

Ejemplo 4

Ejemplo de preparación de gránulos

50 Se trituraron las tabletas obtenidas en el Ejemplo 3, se granularon y tamizaron para dar gránulos de 20-50 mallas.

Ejemplo 5

Ejemplo de preparación de caramelos

55 Se utilizaron los siguientes materiales para preparar caramelos según un procedimiento convencional:

Sorbita en polvo	99,7 g
Perfume	0,2 g
Compuesto (1)	0,05 g
Siembra de sorbita	0,05 g
Total	100 g

ES 2 307 950 T3

Ejemplo 6

Ejemplo de preparación de goma de mascar

5 Los siguientes materiales se utilizaron para preparar goma de mascar siguiendo un procedimiento convencional.

	Goma base	20	g
10	Carbonato de calcio	2	g
	Esteviosido	0,1	g
	Compuesto (1)	0,05	g
15	Lactosa	76,85	g
	Perfume	1	g
	Total	100	g

20

Ejemplo 7

Ejemplo de preparación de jugo de mandarina

25 Los siguientes materiales se utilizaron para preparar jugo de mandarina siguiendo un procedimiento convencional:

	Jugo de mandarina concentrado congelado	5	g
30	Jarabe de fructosa-glucosa	10	g
	Ácido cítrico	0,2	g
	Ácido L-ascórbico	0,02	g
35	Compuesto (1)	0,05	g
	Perfume	0,2	g
	Colorante	0,1	g
40	Agua	el resto	
	Total	100	g

45

Ejemplo 8

Ejemplo de preparación de gominolas

50 Los siguientes materiales se utilizaron para preparar gominolas:

	Azúcar	500	g
55	Jarabe de almidón	500	g
	Pectin	13	g
	Ácido cítrico	4	g
60	Citrato de sodio	1,5	g
	Perfume	1	g
	Color para alimento	0,2	g
65	Compuesto (1)	0,5	g

ES 2 307 950 T3

Se disolvió homogéneamente una mezcla de 13 g de pectina y 20 g de azúcar en 330 ml de agua. La solución mixta se combinó con ácido cítrico y citrato de sodio y se llevó a ebullición. La solución mixta se combinó con jarabe de almidón y se calentó a 100°C y luego se combinó con el resto de azúcar y se calentó a 109°C. Después de dejar reposar durante varios minutos, se agitó la mezcla con compuesto (1), perfume y colorante y se cargó en moldes de almidón y se secó a 50°C o menos durante dos horas o más para obtenerse las gominolas.

Ejemplo 9

Ejemplo de preparación de salchichas de pescado

Se utilizaron los siguientes materiales para preparar salchichas de pescado.

10	Bacalao desmigado	100 g
15	Sal	20 g
	Condimento	2 g
20	Clara de huevo	10 g
	Compuesto (1)	0,5 g

Se amasó con sal el bacalao desmigado, el condimento y el compuesto (1) y se dejó envejecer. Se le dio forma a la pasta y se hizo al vapor en una olla de vacío precalentada a aproximadamente 90-95°C, y se dejó enfriar entonces para obtener salchicha de pescado.

Ejemplo 10

Ejemplo de preparación de crema emoliente

Se utilizaron los siguientes materiales para preparar crema emoliente según un procedimiento convencional

35	Cera de abejas	2,0 g
	Alcohol estearílico	5,0 g
	Ácido esteárico	8,0 g
40	Escualano	10,0 g
	Monoestearato de propilenglicol auto-emulsionante	3,0 g
	Eter polioxietilen cetílico	1,0 g
45	Perfume	0,5 g
	Conservante	lo que se deseé
	Antioxidante	lo que se deseé
50	Propilen glicol	7,8 g
	Glicerina	4,0 g
55	Hialuronato de sodio	0,15 g
	Compuesto (1)	0,05 g
	Trietanolamina	1,0 g
60	Agua purificada	57,5 g

Ejemplo 11

Ejemplo de preparación de champú

5 Se utilizaron los siguientes materiales para preparar champú según un procedimiento convencional

Alquil éter sulfato de sodio	16,0 g
Laurato de dietanolamida	4,0 g
Propilen glicol	1,95 g
Conservante, colorante, perfume	lo que se desee
Antioxidante	lo que se desee
Compuesto (1)	0,05 g
Agua purificada	78,0 g

20 Según la presente invención, se ha encontrado que los nuevos derivados de C-glicósido de flavona contenidos en las hojas de té oolong o sales de los mismos tienen un notable efecto antialérgico y se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas, composiciones de alimentos o cosméticos que los contienen como ingredientes activos, como se ha descrito antes.

25

30

35

40

45

50

55

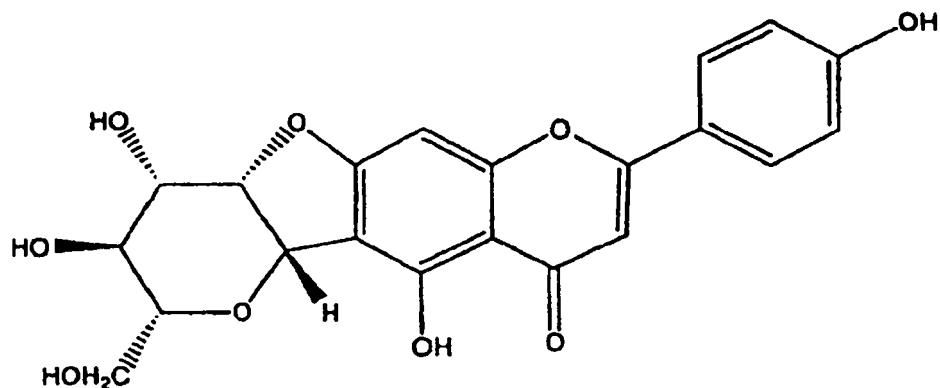
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de C-glicósido de flavona de fórmula (1)

5



10

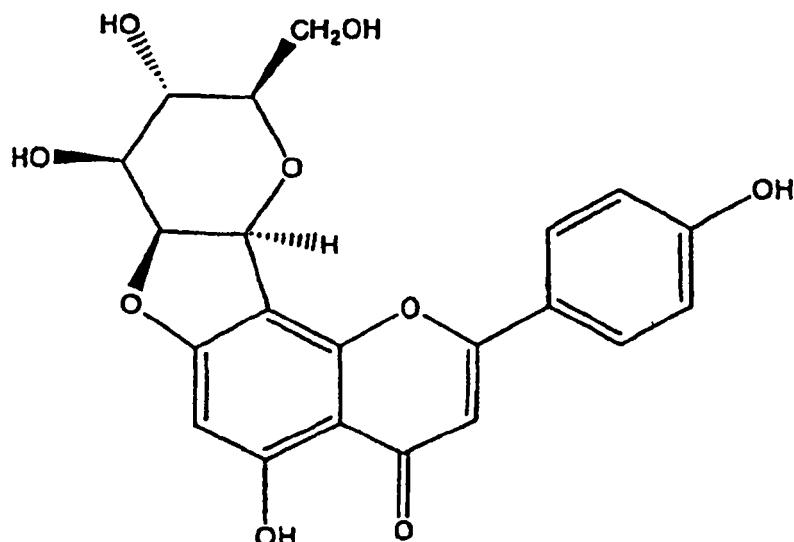
15

20

o sal del mismo.

2. Un derivado de C-glicósido de flavona de fórmula (2):

25



30

35

40

45

o una sal del mismo.

3. Una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad alérgica que contiene al menos uno de los derivados de C-glicósido de flavona o sal del mismo según la reivindicación 1 ó 2.

4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3 donde la citada enfermedad alérgica es al menos una seleccionada entre dermatitis atópica, dermatitis de contacto y polenosis.

5. Una composición alimenticia que contiene al menos uno de los derivados de C-glicósido de flavona o sal del mismo según la reivindicación 1 ó 2 como componente anti-alérgico.

6. La composición alimenticia según la reivindicación 5 en la forma de cualquiera de los suplementos de la dieta u otras bebidas nutritivas, bebidas para la salud, té para la salud u otras bebidas.

7. La composición alimenticia según la reivindicación 5 en la forma de cualquiera entre dulces, panecillos, pasta de sopa, productos de soja procesados, productos lácteos, productos de huevo procesados, pasteles de pescado, grasas y aceites o condimentos.

60

8. Un cosmético que contiene al menos un derivado de C-glucosido de flavona o sal del mismo según la reivindicación 1 o la 2 como componente antialérgico.

ES 2 307 950 T3

9. El cosmético según la reivindicación 8 en la forma de cualquiera entre productos para cuidado de la piel, productos para maquillaje, cosméticos para el cabello y productos de baño.

5 10. Utilización de al menos uno de los derivados de C-glicósido de flavona o sal del mismo según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de una composición farmacéutica, composición alimenticia o cosmética que tiene un efecto anti-alérgico.

10

15

20

25

30

35

40

45

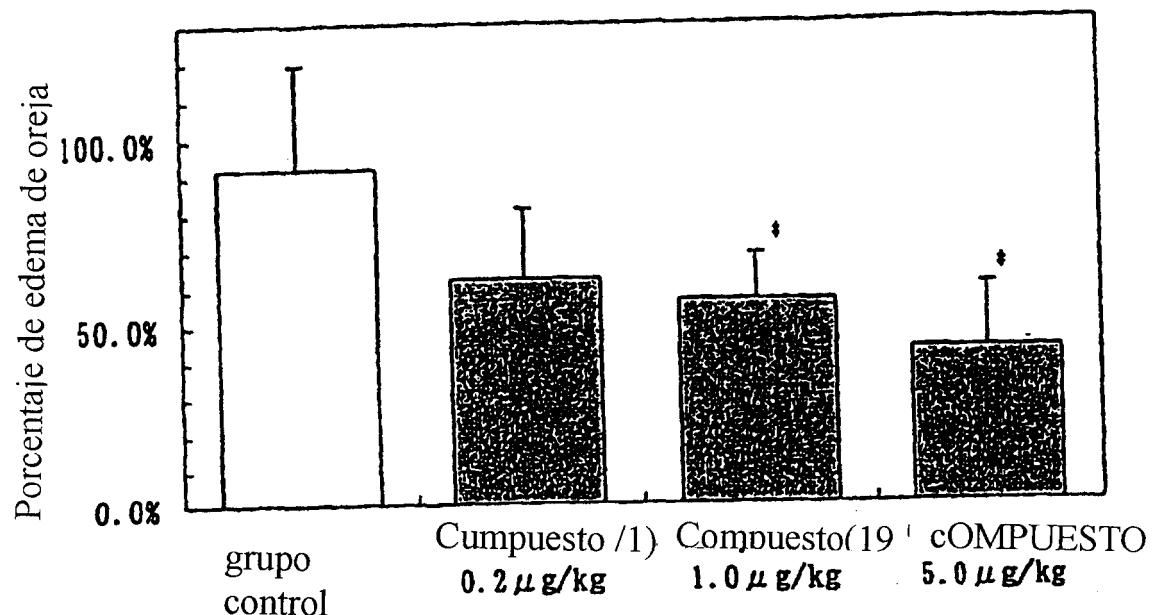
50

55

60

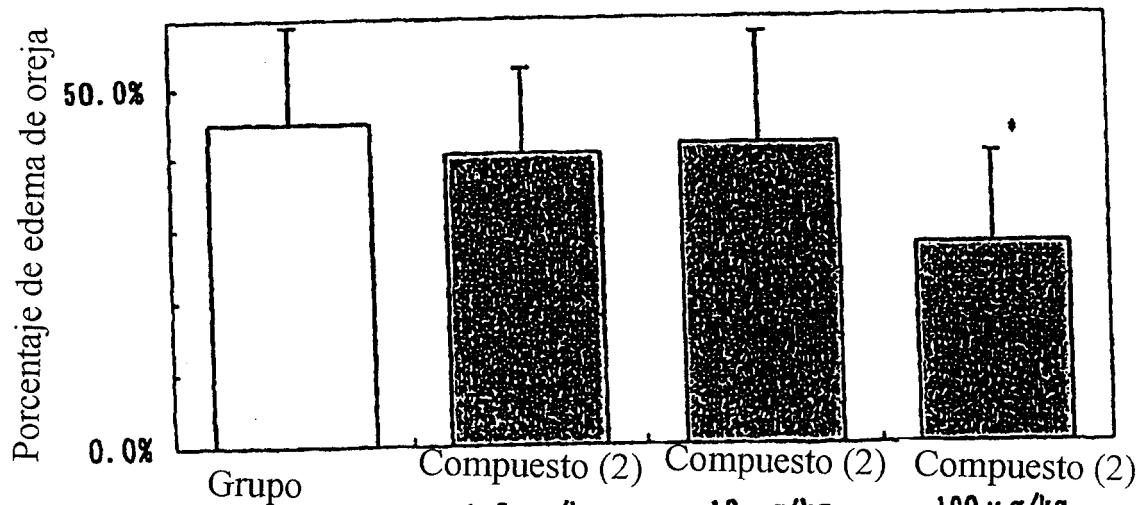
65

Fig. 1



(*: $p < 0.05$ vs. grupo control)

Fig. 2



(*: $p < 0.05$ vs. grupo control)

Fig. 3

