



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 362 065**

⑫ Número de solicitud: 200931169

⑤① Int. Cl.:
A61K 31/7024 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **15.12.2009**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2011**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.06.2011

⑦① Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦② Inventor/es: **Morales Sánchez, Juan Carlos;**
Espín de Gea, Juan Carlos y
Medina Méndez, Isabel

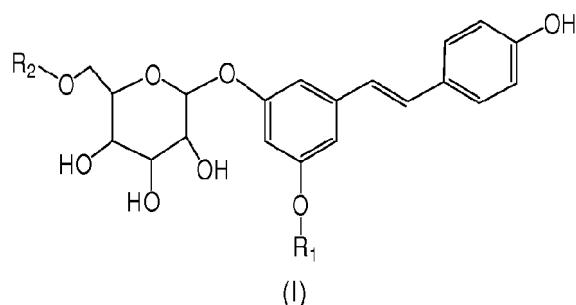
⑦④ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Compuestos con actividad antiinflamatoria.**

⑤⑦ Resumen:

Compuestos con actividad antiinflamatoria.

Compuestos de fórmula general (I) para el tratamiento de procesos inflamatorios que intervienen en numerosas enfermedades tales como las enfermedades inflamatorias intestinales. La invención también se refiere a compuestos incluidos en esta fórmula general, y a su procedimiento de obtención.

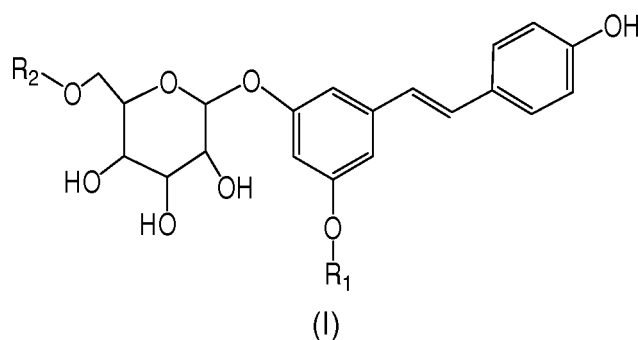


ES 2 362 065 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos con actividad antiinflamatoria.

La presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula general (I) para el tratamiento de procesos inflamatorios que intervienen en numerosas enfermedades tales como las enfermedades inflamatorias intestinales. La invención también se refiere a unos compuestos concretos incluidos en esta fórmula general, a su procedimiento de obtención y su actividad antioxidante en alimentos.



Estado de la técnica anterior

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Así, la inflamación surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. Sin embargo, el mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos.

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por cinco signos cardinales: calor, rubor, tumor, dolor y pérdida o disminución de la función (función laesa).

El tipo de tratamiento que se debe aplicar ante una inflamación está supeditado a las características de la zona afectada y a las causas que la hayan provocado.

La inflamación desempeña un papel fundamental en la patogenia de numerosas enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide, asma, diabetes tipo 2, la psoriasis, la esclerosis múltiple, la aterosclerosis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer.

Por ejemplo, la inflamación está implicada en la aterosclerosis tanto en la génesis, desarrollo y ruptura de la placa aterosclerótica como también en su estabilidad y reparación. Por tanto, la aterosclerosis debe considerarse una enfermedad inflamatoria a todos los efectos que está estrechamente relacionada en su evolución con la trombosis. La evidencia demuestra que los niveles circulantes de marcadores inflamatorios/antiinflamatorios pueden predecir una respuesta cardiovascular desfavorable tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad coronaria establecida. Los desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis son los factores de riesgo llamados "clásicos" tales como el tabaquismo, la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, obesidad y diabetes. Estos factores tienen como órgano diana el endotelio, donde las citoquinas, que son capaces de abandonar el torrente sanguíneo, actúan estimulando dicho endotelio y también a los leucocitos con inducción de múltiples moléculas de adhesión en la superficie de las células. La inflamación también contribuye en la fase final que provoca la fisura o erosión de la placa aterosclerótica. En la estabilidad/inestabilidad de placa, el factor de transcripción nuclear NF- κ B juega un papel fundamental en la síntesis de productos implicados en la inestabilidad de la placa. Por último, el macrófago y la numerosa familia enzimática de las metaloproteinasas inducen la rotura de la matriz fibrosa y la aparición del síndrome coronario agudo tras la activación de la coagulación. Este proceso trombótico que aparece como respuesta a la rotura de la placa lleva consigo la formación de un trombo sobre ésta con la consiguiente oclusión de la luz del vaso sobreviniendo el síndrome coronario agudo.

Otra implicación importante de los procesos inflamatorios se refiere a la asociación de la neuroinflamación con la enfermedad de Alzheimer, lo cual viene avalado por estudios neuropatológicos y epidemiológicos. Estudios clínico-

patológicos y de neuroimagen muestran que la inflamación y activación microglial preceden al daño neuronal, y que el estrés oxidativo ocurre previo a la citopatología de la enfermedad de Alzheimer. La IL-1 β , el TGF- β y la COX-2 cerebrales están elevadas en la enfermedad de Alzheimer. La evidencia epidemiológica y diversos modelos experimentales muestran que las condiciones pro-inflamatorias promueven el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, mientras que el tratamiento anti-inflamatorio crónico modifica la incidencia de esta enfermedad. Por tanto, una hipótesis que se maneja actualmente es que el daño producido por la acumulación del péptido β -amiloide quizá fuera incluso menor que el producido por la respuesta inflamatoria ante su acumulación.

La relación entre inflamación y cáncer es evidente. Se ha descrito que el 20% de los cánceres se desarrollan en un estatus pro-inflamatorio crónico. Los mediadores y efectores celulares en inflamación son constituyentes importantes del microambiente de los tumores. En algunos tipos de cáncer, las condiciones inflamatorias preceden a la transformación maligna de las células. Por otro lado, en otros tipos de cáncer, lo que ocurren son cambios oncogénicos que inducen un microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo tumoral. Actualmente, la relación inflamación-cáncer está sólidamente establecida y la identificación de nuevas moléculas diana relacionadas con la inflamación podría mejorar el diagnóstico y tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Cuando la inflamación afecta al tracto gastrointestinal, hablamos de enfermedades intestinales inflamatorias, cuya expresión se aplica generalmente a dos entidades clínicas independientes, a saber, la colitis ulcerosa, y la enfermedad de Crohn. También existe la colitis indeterminada, aunque aún no se considera como entidad independiente.

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta de forma difusa y continua en diferente extensión a la mucosa del colon. La mayoría de los pacientes con colitis ulcerosa son tratados médicamente en vez de quirúrgicamente.

La enfermedad de Crohn es también una enfermedad inflamatoria crónica pero, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. Aun cuando las lesiones pueden empezar superficialmente, el proceso inflamatorio se prolonga a través de la pared intestinal hacia los nódulos linfáticos de drenaje. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn recurren en algún momento a la cirugía, pero es habitual el tratamiento médico continuo.

La colitis indeterminada se refiere a la enfermedad intestinal crónica que afecta exclusivamente al colon tras excluir la colitis infecciosa y otras causas de colitis. Las características clínicas, anatomopatológicas y endoscópicas no permiten clasificarla dentro de la colitis ulcerosa, ni de la enfermedad de Crohn.

Dentro de los trastornos funcionales digestivos más frecuentes merece ser destacado el síndrome del intestino irritable (SII), que conlleva un gran impacto socioeconómico. Actualmente se plantea que el SII sea la antesala de una enfermedad inflamatoria intestinal como la colitis ulcerosa. Se ha descrito un estatus inflamado en mucosa intestinal en sujetos con SII con alta producción de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 y una baja de la anti-inflamatoria IL-10. La mieloperoxidasa también está aumentada en leucocitos de pacientes con SII respecto a sujetos sanos. El SII afecta a todas las edades, más a mujeres que a hombres y en cualquier raza humana. La prevalencia de SII en España se sitúa en torno al 10% de la población cuando se consideran más de dos criterios de los descritos por Manning, y del 3,3% de acuerdo a los criterios de Roma II. Aún no existen datos sobre cual es la prevalencia del SII de acuerdo a los nuevos criterios de Roma III.

Las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (EII) cursan con períodos de actividad (brotes), de variable intensidad y gravedad, con períodos de inactividad (remisión) y cuyo tratamiento vendrá determinado fundamentalmente por la gravedad de las manifestaciones clínicas y su extensión anatómica. El principal objetivo es mantener un equilibrio entre la mayor eficacia y los menores efectos secundarios. El tratamiento farmacológico actual de las EII comprende la utilización de anti-inflamatorios (aminosalicilatos y corticoides) e inmunomoduladores.

Para el tratamiento de los ataques agudos de colitis ulcerosa se utilizan casi invariablemente glucocorticosteroides tales como acetato de prednisona o acetato de prednisolona. Una vez conseguida la remisión, la sulfasalazina es el tratamiento de mantenimiento de elección para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Sin embargo, este fármaco posee un número importante de efectos secundarios debidos principalmente a absorción del resto de sulfapiridina desde el colon. Recientemente han sido desarrollados compuestos que contienen solamente ácido 5-aminosalicílico; estos compuestos son tan eficaces como la sulfasalazina y no tienen los efectos secundarios de la sulfapiridina, pero tienen efectos secundarios propios, en especial la diarrea.

Para la enfermedad de Crohn activa, grave, los glucocorticosteroides son el tratamiento de elección, pero idealmente solo para conseguir remisión, después de lo cual debe cesar el tratamiento. Sin embargo, con demasiada frecuencia la enfermedad no remite satisfactoriamente, y pueden ser necesarios glucocorticosteroides para mantener el control de los síntomas. La sulfasalazina es también útil en casos menos graves, en particular para la enfermedad que afecta al colon. Con mucha frecuencia en la enfermedad de Crohn, sin embargo, el tratamiento médico primario del proceso de la enfermedad es ineficaz, y solo tiene valor el tratamiento sintomático, es decir, analgésicos para el dolor y opiáceos para la diarrea. Los inmunomoduladores como la azatioprina también son comúnmente usados en el Crohn con objeto de disminuir la proliferación de linfocitos B y T y la respuesta inmune primaria, así como en la función de los linfocitos y células "natural killer". Un tratamiento cada vez más habitual en el Crohn y colitis ulcerosa, a pesar de su coste extremadamente alto, consiste en la administración de anticuerpos monoclonales especialmente dirigidos al

factor de necrosis tumoral tipo alfa ($\text{TNF}\alpha$). Se trata de agentes terapéuticos de acción anti-inflamatoria selectiva. El efecto básico viene dado por un bloqueo del $\text{TNF}\alpha$ y una disminución de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6, así como la migración de leucocitos dentro del intestino.

La colitis indeterminada (CI) aguda se maneja como una colitis ulcerosa grave, aunque la evolución clínica puede finalmente clasificar al paciente como sujeto con Crohn. Actualmente el diagnóstico CI es provisional y se considera únicamente cuando la enfermedad inflamatoria está localizada en el colon y no se puede realizar una distinción concluyente respecto a colitis ulcerosa y Crohn.

El tratamiento actual de las colitis y del Crohn conlleva lamentablemente graves y frecuentes efectos secundarios.

El 50% de los pacientes tratados con aminosalicilatos (dosis usadas de 500 mg a 1 g) presentan efectos secundarios dosis-dependientes (cefáleas, náuseas, dolor abdominal, alteraciones hematológicas, toxicidad hepática y/o renal, etc.

Los corticoides (prednisona, prednisolona, budesonida) son los fármacos de elección en los brotes de las EII. Estos corticoides tienen una biodisponibilidad alta (50-80%) que favorece la aparición de efectos secundarios. Actualmente se buscan estrategias para incrementar sus efectos lumenales en el intestino y reducir su toxicidad. Los efectos secundarios pueden derivarse de una retirada brusca de los corticoides y los derivados de su uso prolongado. La complicación aguda, más grave, derivada de la retirada brusca de esteroides es la insuficiencia suprarrenal aguda. Otros efectos secundarios agudos son la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la retención de líquidos, el aumento de peso, la intolerancia a la glucosa, la leucocitosis, el insomnio, la labilidad emocional, cuadros psicóticos, osteoporosis, glaucoma, crecimiento lento en niños, etc. Aunque la gran mayoría de efectos suelen revertir al retirar los corticoides, lamentablemente suelen ser efectos frecuentes, graves y duraderos.

Los inmunomoduladores (azatioprina, mercaptopurina) provocan efectos adversos que obligan a la retirada del tratamiento en el 15-30% de los pacientes. Los efectos adversos más comunes son náuseas y vómitos, pancreatitis, fiebre, hepatotoxicidad y leucopenia. Otros efectos a largo plazo son el aumento de infecciones víricas, herpes zóster, hepatitis A/B, neumonías, etc. Otro inmunomodulador usado es el metotrexato, que inhibe la proliferación de linfocitos y puede modular el perfil de citoquinas. El principal efecto secundario es la toxicidad hepática, mucositis, aplasia medular, osteopatía, infecciones oportunistas, etc.

La ciclosporina es otro inmunomodulador que actúa inhibiendo las citoquinas proinflamatorias IL-2 y IFN- γ , $\text{TNF}\alpha$ e IL-4. El efecto secundario más importante es la nefrotoxicidad, náuseas, temblor, cefalea e hiperplasia gingival.

El infliximab es el anticuerpo monoclonal anti- $\text{TNF}\alpha$ con mayor experiencia clínica. Dentro de los efectos secundarios, se encuentran reacciones alérgicas durante la infusión (intravenosa durante varias horas), cefalea, náuseas, urticaria, dolor torácico y complicaciones infecciosas. A pesar de su efectividad especialmente en la enfermedad de Crohn fistulizante, sin embargo, también se han descrito complicaciones, empeorando cuadros de estenosis a nivel de íleon terminal y pre-terminal.

Los alimentos funcionales (AF) son aquellos alimentos elaborados no sólo por sus características nutricionales sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Entre los logros más mencionados en la literatura científica y en el marketing de los productos alimenticios se encuentra la mejora de las funciones gastrointestinales, el aporte de sistemas redox y antioxidante, así como la modificación del metabolismo de macronutrientes.

Los alimentos funcionales se elaboran aumentando mediante distintas técnicas los componentes activos de real interés para la salud. Uno de los compuestos de más interés en la actualidad es el resveratrol.

El resveratrol es un compuesto fenólico. La estructura química de los compuestos fenólicos consta de al menos un anillo aromático y un grupo hidroxilo. Y dentro de los compuestos fenólicos el resveratrol es un estilbeno, caracterizado porque este grupo de compuestos fenólicos poseen una estructura de 2 anillos fenólicos unidos mediante dos átomos de carbono ($\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$). El resveratrol está presente en las uvas y en productos derivados como vino, y en otros alimentos, aunque en cantidades mucho menores, como los cacahuetes y algunas bayas. En estos alimentos, se encuentra libre o como piceído (resveratrol-3-*O*-glucósido). Este compuesto posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales que prolongan la longevidad de las células. Por tanto, los alimentos y bebidas que contienen esta sustancia se consideran como saludables o recomendables para la salud.

En la solicitud de patente WO2007020673 se describe el uso de unos compuestos para el tratamiento de patologías oftalmológicas, y dentro de estos compuestos se encuentra el *trans*-resveratrol-3,5,-*O*-diglucósido.

El resveratrol presenta actividad quimiopreventiva del cáncer en ensayos que representaban tres etapas principales de la carcinogénesis. Es decir, los autores han descubierto que el compuesto:

1. actúa como antioxidante y antimutágeno y que induce enzimas metabolizadores de fármacos;

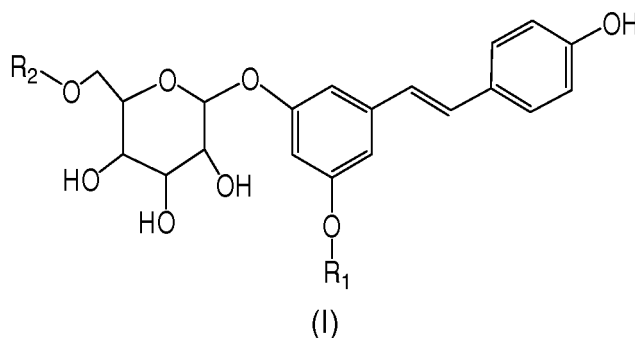
2. media en efectos antiinflamatorios e inhibe la ciclooxigenasa (COX) y la hidroperoxidasa; e
3. induce la diferenciación celular en la leucemia promielocítica humana. Además, tal como se ha indicado anteriormente, el resveratrol se ha estudiado extensivamente por su correlación con la utilidad cardiovascular del vino tinto.

Recientemente se ha demostrado que el resveratrol inhibe la transcripción de COX-2 (cfr. ES2266271), y también inhibe la actividad enzimática de COX-1. Entre los agentes quimiopreventivos del cáncer conocidos se incluyen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), tales como la indometacina, la aspirina, el piroxicam y el sulindac, todos los cuales inhiben la ciclooxigenasa. La actividad inhibidora de COX resulta importante en la quimioprevención del cáncer debido a que COX cataliza la conversión del ácido araquidónico en sustancias proinflamatorias, tales como las prostaglandinas, que pueden estimular el crecimiento de las células tumorales y suprimir la vigilancia inmunológica. Además, COX puede activar carcinógenos en formas que dañan el material genético. Algunos investigadores proponen nuevos agentes quimiopreventivos del cáncer mediante la evaluación de extractos vegetales para encontrar un potencial de inhibición de COX. Entre los cuales se encuentra un extracto derivado de *Cassia quinquangulata* Rich (*Leguminosae*) como potente inhibidor de COX, y se ha identificado el *trans*-resveratrol como el compuesto activo (cfr. Mannila *et al.*, *Phytochemistry* 33:813, 1998). También se han propuesto usos neurológicos para el resveratrol (cfr. Lee *et al.*, *Society for Neuroscience Abstracts* 20(1-2):1648, 1994).

Descripción de la invención

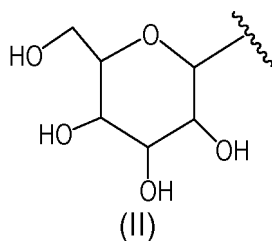
La presente invención proporciona compuestos que se pueden utilizar para la elaboración de una composición farmacéutica o alimenticia para el tratamiento o prevención de procesos inflamatorios.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica o alimenticia (incluyendo los calificados como alimentos funcionales) para el tratamiento y/o la prevención de procesos inflamatorios:



donde:

R₁ es hidrógeno ó el grupo de fórmula general (II):



R₂ es hidrógeno o formar junto con el oxígeno un grupo acilo (-OCO-R₃), R₃ es un grupo alquilo (C₁-C₂₂) o alquenilo (C₂-C₂₂), y

cuando R₂ es hidrógeno R₁ representa el grupo de fórmula general (II).

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 2 y 10 átomos de carbono, y más preferiblemente tiene entre 3 y 7 átomos de carbono.

El término “alquenilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 22 átomos de carbono, y que poseen entre una y seis insaturaciones, por ejemplo, vinilo, alilo, oleilo, linoleilo, etc.

Cuando R_3 es un grupo alquilo, R_2 formaría junto con el oxígeno al que se une un grupo éster y más preferiblemente un grupo éster de un ácido graso saturado, del tipo $(HO-CO-(CH)_n-CH_3)$, donde $n+1$ es el número de carbonos de la cadena alifática descrita anteriormente.

Cuando R_3 es un grupo alquenilo, R_2 formaría junto con el oxígeno al que se une un grupo éster y más preferiblemente un grupo éster de un ácido graso insaturado. Dependiendo del número de insaturaciones pueden ser ácidos grasos monoinsaturados, es decir, con un solo doble enlace o ácidos grasos poliinsaturados, con dos o más insaturaciones. Estos ácidos grasos insaturados también pueden tener configuración *cis* o *trans*.

Otra realización preferida de la presente invención, comprende el uso de un compuesto de fórmula general (I) donde R_2 es hidrógeno, R_1 representa al compuesto de fórmula general (II).

En otra realización preferida de la presente invención, los anillos de piranosa que forman parte de las estructuras (I) y (II), representan azúcares o monosacáridos que se pueden seleccionar, independientemente uno de otro, entre glucosa, galactosa, manosa o alosa, más preferiblemente los anillos son glucosa. Además, las uniones de estos monosacáridos, contenidos en las fórmulas general (I) y (II), al anillo fenólico correspondiente puede ser alfa o beta, más preferiblemente las uniones son beta.

En otra realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) utilizados se seleccionan de la lista que comprende *trans*-resveratrol-3,5-di-*O*- β -D-glucopiranosido, *trans*-resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-butanoil)- β -D-glucopiranosido (también denominado *trans*-piceido-butirato o BUT) y *trans*-resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-octanoil)- β -D-glucopiranosido (también denominado *trans*-piceido-octanoato u OCT).

En otra realización preferida de la presente invención, las enfermedades inflamatorias son intestinales.

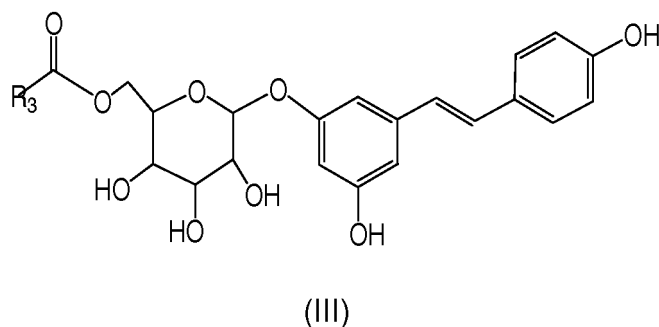
Por “enfermedades inflamatorias” se refiere a enfermedades que cursan con procesos inflamatorios agudos y/o crónicos, de intensidad elevada o leve, relacionados con cáncer, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y neurodegenerativas, intoxicaciones, infecciones (por microorganismos como hongos, bacterias, etc., o virus), así como otras conocidas por cualquier experto en la materia. Por ejemplo entre los procesos infecciosos bacterianos se podrían incluir los producidos por *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis* o *Listeria monocytogenes*. En particular por “enfermedades inflamatorias intestinales” se refiere en la presente invención a las que se producen en el tracto digestivo, especialmente en el intestino delgado y grueso, y que puede provocar una gran cantidad de síntomas en el individuo que lo padezca, como por ejemplo pérdidas de peso, sangre en heces y/o diarreas, entre otros, que conllevan a un deterioro considerable en su calidad de vida. Estas enfermedades se pueden seleccionar de la lista que comprende el síndrome de intestino irritable, colitis indeterminada, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Como se demuestra en la presente invención, mediante el uso de los compuestos de fórmula general (I) se pueden disminuir distintos efectos y marcadores asociados a la inflamación intestinal, como pérdida de peso, sangre oculta en heces, actividad mieloperoxidasa, acortamiento del colon, prostaglandinas, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1), proteínas de inflamación de macrófagos (MIP), citoquinas atrayentes de células T (MIG), interleuquina-6 (IL-6) o COX-2. Además, mediante el uso de los compuestos de fórmula general (I) también se describe la disminución de la inflamación sistémica representada por la disminución de los marcadores de inflamación de fase aguda haptoglobina y fibrinógeno, lo que también indica su acción en procesos inflamatorios distintos a los del tracto digestivo.

En la presente invención se entiende como “compuesto alimenticio” a un alimento o complemento alimenticio incluidos los llamados “nutracéuticos” o “alimentos funcionales”, que posee un efecto beneficioso sobre la salud. Del mismo modo, este término puede aplicarse a extractos o compuestos químicos obtenidos de alimentos comunes. Los alimentos funcionales son normalmente empleados en mezclas nutricionales y en la industria farmacéutica. Del mismo modo que algunos alimentos pueden ser clasificados como alimentos funcionales también se clasifican así a algunos suplementos nutricionales, como por ejemplo ácidos grasos como los omega-3 derivados del aceite de pescado y de algunos vegetales o los antioxidantes y vitaminas.

En la presente invención, los compuestos descritos anteriormente se pueden utilizar en alimentos (incluidos los etiquetados como funcionales) o nutracéuticos no solo para prevenir la aparición de procesos inflamatorios sino también para mejorar las defensas del organismo como parte del sistema inmune (IL-3).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (III), que consiste en el compuesto de fórmula general (I) cuando R_1 es hidrógeno y R_2 es un grupo acilo ($-\text{OCO}-R_3$):



donde:

R_3 está descrito anteriormente.

En una realización preferida de los compuestos de fórmula general (III), R_3 es un grupo alquilo (C_2-C_{10}), y más preferiblemente R_3 es un grupo alquilo (C_3-C_7).

En otra realización preferida de la presente invención, el anillo de piranosa que forman parte de la estructura (III), representa un azúcar o monosacárido que se puede seleccionar de entre glucosa, galactosa, manosa o alosa, más preferiblemente el anillo es glucosa. Además, la unión de este monosacárido, contenido en la fórmula general (III), al anillo fenólico puede ser alfa o beta, más preferiblemente la unión es beta.

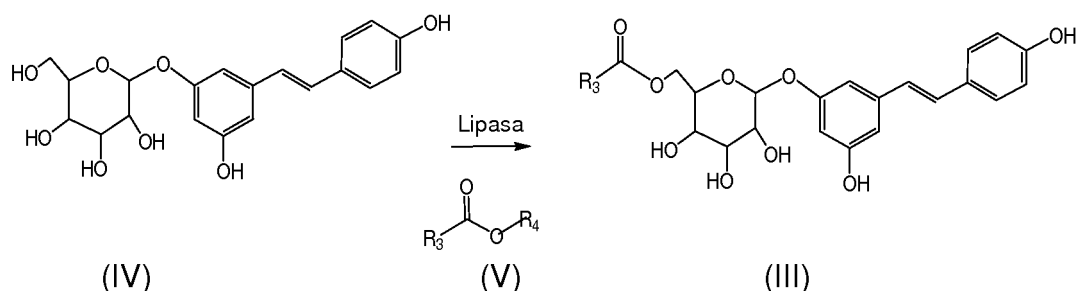
En otra realización preferida los compuestos de fórmula general (III) de la invención son trans-resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-butanoil)- β -D-glucopiranosido o resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-octanoil)- β -D-glucopiranosido.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula general (III) de la invención, que comprende:

- a. mezclar un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V): $R_3\text{-COO}-R_4$, en presencia de una lipasa.

donde: R_3 se describe anteriormente y R_4 es hidrógeno o un grupo activador de la formación de enlace éster.

El procedimiento de la invención se puede observar en el siguiente esquema:



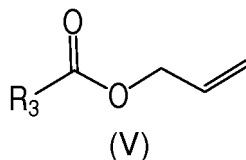
En una realización preferida, el compuesto (IV) es un derivado glucósido, manósido, alósido o galactósido, más preferiblemente el compuesto es trans-resveratrol-3-*O*- β -D-glucopiranosido.

La lipasa utilizada como biocatalizador en el procedimiento descrito puede ser la lipasa de *Candida Antarctica*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei*, y preferiblemente la lipasa de *Thermomyces Lanuginosus*. Además preferiblemente ésta lipasa estaría inmovilizada, y preferiblemente en sílice.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la mezcla se realiza en un disolvente orgánico como por ejemplo pero sin limitarse a acetona, dietil-éter, diisopropil-éter, metil tert-butil éter, tert-butanol, alcohol tert-amílico o alcohol tert-pentílico o mezclas de alguno de éstos con hexano, pentano, ciclohexano, piridina o tolueno.

Preferentemente, el disolvente será el tert-butanol, y la mezcla de reacción se puede calentar a una temperatura de entre 30 y 70°C, con preferencia entre 55 y 65°C y preferentemente a 60°C.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, el grupo R₄ activador de la formación de enlace éster, es el grupo etilo o, preferiblemente, el grupo vinilo, es decir, la fórmula (V) sería la siguiente, donde R₄ contiene un grupo vinilo:



Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (III) para la elaboración de un medicamento.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo.

Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

Como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones, geles, emulsiones, etc.) para administración oral, tópica o parenteral, preferiblemente la administración será oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de inflamaciones en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de fórmula general (I) según descrita anteriormente. Preferiblemente la administración de la composición se puede realizar por vía oral.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición (I), calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Preferiblemente, en dicho método de tratamiento el trastorno se selecciona entre trastornos o enfermedades relacionadas con el tracto intestinal y/o inflamatorias sistémicas y más preferiblemente entre inflamaciones intestinales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (III) como sistema para vehicular y hacer llegar mayor concentración de resveratrol al intestino grueso (“drug delivery system”). Un problema importante del resveratrol es su rápida absorción en partes anteriores del tracto intestinal y su extensiva conjugación por enzimas de Fase II (glucuronil-transferasas, sulfotransferasas, etc.) para dar lugar a sus correspondientes metabolitos resveratrol-glucuronidos y resveratrol-sulfatos, entre otros, que circulan en sangre. El resveratrol sufre un extensivo metabolismo enterohepático que previene su llegada a partes distales del intestino, incluyendo íleon y colon y por tanto dificultando su acción en procesos patológicos (incluidos inflamatorios) que tengan lugar en esas zonas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (III) para modular la microbiota intestinal, incrementando la población de bifidobacterias y lactobacilos así como disminuyendo el incremento de patógenos oportunistas como por ejemplo enterobacterias.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (III), para la elaboración de una composición alimenticia. Preferiblemente la composición alimenticia se puede seleccionar de entre un alimento, complemento alimenticio, alimento funcional o nutraceutico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición alimenticia que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), más preferiblemente al menos un compuesto de fórmula general (III).

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (III), como antioxidante. Más preferiblemente como antioxidante en alimentos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Efecto de la administración del resveratrol y sus derivados en la longitud del colon tras el tratamiento con 1% de DSS. Diferencia significativa sobre el grupo con DSS (* $P<0.05$; ** $P<0.01$). Se evaluó la longitud del colon tras 8 días de administración de DSS (barra oscura) y tras 6 días después de interrumpir el tratamiento con DSS (recuperación, barra clara). Dosis empleada equivalente a 10 mg en persona de 70 kg (Human Equivalent Dose, HED). C, grupo control; DSS, grupo control con inflamación inducida con DSS; OCT, *trans*-piceido-octanoato; BUT, *trans*-piceido-butirato; RES, *trans*-resveratrol; PIC, *trans*-piceido; DIGLUC, *trans*-resveratrol-3,5-*O*-diglucósido. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos. DSS es sulfato de dextrano sódico.

Fig. 2. Evolución del peso de los animales como respuesta al tratamiento con DSS y el efecto causado por los diferentes derivados de resveratrol (HED= 10 mg). Las flechas indican el comienzo de administración de DSS (día 20) y final (día 28). Del día 29 a 35, se monitorizó el efecto de los derivados en la recuperación de los animales tras suspender tratamiento con DSS. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 3. Efecto de los derivados del resveratrol en la evolución del DAI tras la administración del DSS. Se representa la evolución en 14 días (8 días con DSS, y 6 días posteriores de recuperación). Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 4. Actividad mieloperoxidasa en mucosa colónica tras administración de DSS en presencia y ausencia de los derivados de resveratrol (HED=10 mg). El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Se evaluó tras 8 días de administración de DSS (barra oscura) y tras 6 días después de interrumpir el tratamiento con DSS (recuperación, barra clara). Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 5. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en los niveles sanguíneos de haptoglobina. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Se evaluó tras 8 días de administración de DSS (barra oscura) y tras 6 días después de interrumpir el tratamiento con DSS (recuperación, barra clara). Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 6. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en los niveles sanguíneos de fibrinógeno. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Se evaluó tras 8 días de administración de DSS (barra oscura) y tras 6 días después de interrumpir el tratamiento con DSS (recuperación, barra clara). Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 7. Efecto de la administración de derivados de resveratrol (HED=10 mg) en la arquitectura colónica de muestras colónicas de ratón tras administración con DSS. Tinción hematoxilina-eosina (x100). (a) Criptas, (b) epitelio, (c) infiltración celular. La figura muestra un ejemplo representativo del efecto observado en todas las muestras analizadas.

Fig. 8. Efecto de la administración de los derivados de resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de TNFR1 en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. Determinación tras los 8 días de administración de DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Valores expresados en unidades arbitrarias tras medida de la intensidad de las señales por densitometría. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 9. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de la proteína inflamatoria de macrófagos gamma (MIP- γ) en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Valores expresados en unidades arbitrarias tras medida de la intensidad de las señales por densitometría. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 10. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de la proteína de monocitos inducida por interferón gamma (MIG) en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Valores expresados en unidades arbitrarias tras medida de la intensidad de las señales por densitometría. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 11. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de la interleuquina 3 (IL-3) en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS ($P<0.05$). Valores expresados en unidades arbitrarias tras medida de la intensidad de las señales por densitometría. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 12. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de la interleuquina 6 (IL-6) en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS (P<0.05). Valores expresados en unidades arbitrarias tras medida de la intensidad de las señales por densitometría. Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 13. Efecto de los derivados del resveratrol (HED=10 mg) en el nivel de prostaglandina E₂ (PGE₂) en mucosa colónica tras inducción de inflamación con DSS. El asterisco indica diferencia significativa frente al grupo con DSS (P<0.05). Los resultados son una media de dos ensayos independientes y con ocho ratones por grupo en cada uno de esos ensayos.

Fig. 14. Aspecto de los ratones tras la administración de 1% DSS durante 8 días. Se muestran como ejemplos representativos el control-DSS (A), así como ratones que previamente habían consumido RES (B), BUT (C) y OCT (D). También se muestra en todos los casos la presencia o ausencia de hemorragias rectales (indicado con una flecha). Los ratones previamente alimentados con RES, BUT y OCT, mostraron mejor aspecto que los controles-DSS, especialmente en los ratones alimentados con BUT y OCT, que no mostraron ni rastro de hemorragias rectales.

Fig. 15. Recuentos de bifidobacterias en heces antes y después de la administración de DSS, en ratones con la dieta suplementada en los distintos compuestos (HED = 10 mg). **Diferencias significativas (P<0.01) respecto al grupo control-DSS.

Fig. 16. Recuentos de lactobacilos en heces antes y después de la administración de DSS, en ratones con la dieta suplementada en los distintos compuestos (HED = 10 mg). **Diferencias significativas (P<0.01) respecto al grupo control-DSS.

Fig. 17. Recuentos de clostridios en heces antes y después de la administración de DSS, en ratones con la dieta suplementada en RES, BUT y OCT (HED = 10 mg). **Diferencias significativas (P<0.01) respecto al grupo control-DSS.

Fig. 18. Recuentos de enterobacterias y *E. coli* en heces antes y después de la administración de DSS, en ratones con la dieta suplementada en RES, BUT y OCT (HED = 10 mg). **Diferencias significativas (P<0.01) respecto al grupo control-DSS.

Fig. 19. Cinética de concentración de resveratrol libre en el colon de ratones sanos tras la administración de resveratrol (RES), piceído (PICE), resveratrol-3,5-diglucósido (DIGLUC), butirato-piceído (BUT) y octanoato-piceído (OCT).

Fig. 20. Porcentaje de adhesión de bacterias patógenas a cultivos de células humanas de colon Caco-2. Diferencias respecto al control positivo C+ (solo bacterias, sin compuestos). (*) P<0.05; (**) P<0.01.

Fig. 21. Porcentaje de adhesión de bacterias patógenas a cultivos de células humanas de colon HT-29. Diferencias respecto al control positivo C+ (solo bacterias, sin compuestos). (*) P<0.05; (**) P<0.01.

Fig. 22. Producción de Interleuquina-8 en cultivo de células HT-29 como respuesta a la inoculación de *Listeria monocytogenes* Scott A, *E. coli* O157 o *Salmonella*.

Fig. 23. Producción de Interleuquina-8 en cultivo de células HT-29 como respuesta a la inoculación del patógeno *Listeria monocytogenes* Scott A. Diferencias respecto al control positivo C+ (solo *Listeria*, sin compuestos). (*) P<0.05; (**) P<0.01.

Fig. 24. Formación de hidroperóxidos conjugados durante la oxidación de emulsiones de aceites de pescado suplementadas con 100 ppm de resveratrol, piceído, resveratrol-3,5-diglucósido, piceído-butirato y piceído-octanoato. Valores determinados para el periodo de propagación del control (Día 10 de oxidación).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de los compuestos de la invención.

Ejemplo 1

Síntesis de compuestos de formula general (I)

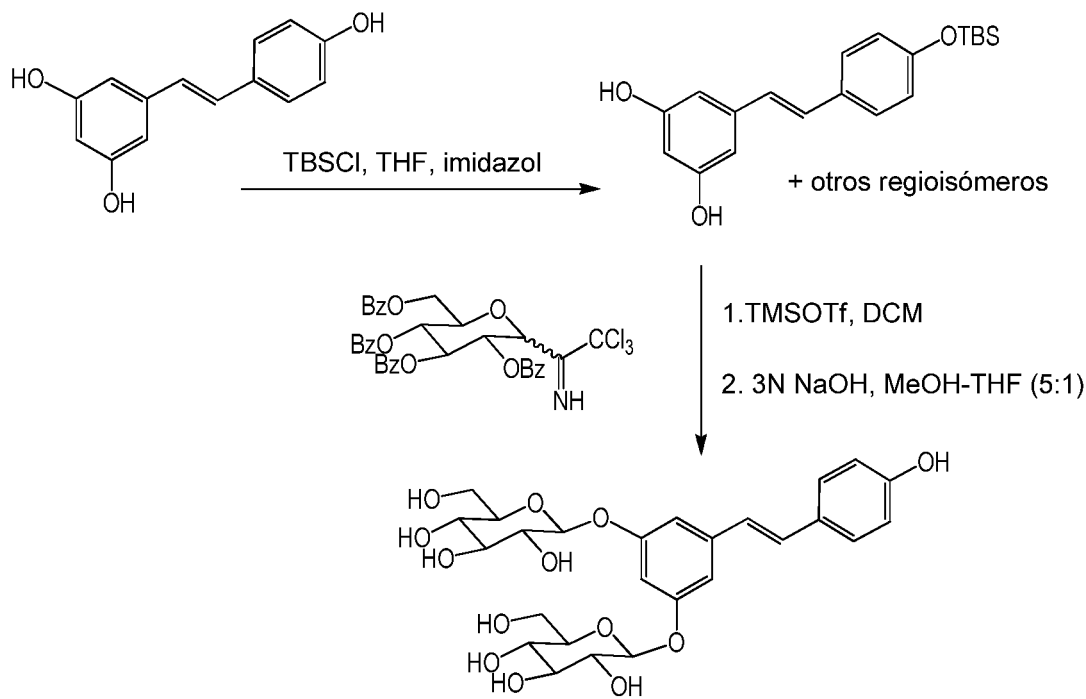
En general, estos compuestos no son de origen natural como el resveratrol o el piceído.

Síntesis del compuesto resveratrol-3,5-*O*-diglucósido (*trans*-resveratrol-3,5-di-*O*-β-*D*-glucopiranosido, DIGLUC)

La estrategia de síntesis del resveratrol-3,5-*O*-diglucósido que se ha utilizado es similar a la utilizada por Zhang y col (cfr. Zhaojun Zhang, Biao Yu, Richard R. Schmidt, *Synthesis*, 2006, N° 8, 1301-1306). En primer lugar se preparó

ES 2 362 065 A1

tert-butil-dimetilsilil-4-*O*-resveratrol, intermedio parcialmente protegido que se obtiene por reacción de resveratrol con cloruro de *tert*-butil-dimetilsililo (TBSCl). A continuación este derivado se hizo reaccionar con un donador de glucosilo. En nuestro caso, se utilizó el 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-D-glucopiranosil tricloroacetimidato en lugar del derivado trifluoroacetimidato que utilizaron Zhang y *col.* El derivado tricloroacetimidato es mas sencillo de preparar y mas barato, dando el mismo rendimiento en la reacción de doble glucosidación. Finalmente se realizó la desprotección de los grupos protectores, benzoilos y *tert*-butildimetilsililo siguiendo la misma metodología que Zhang y *col.*:



Las abreviaciones tienen los significados siguientes:

TBSCl: cloruro de *tert*-butil-dimetilsililo,

TMSOTf: éster trimetilsilílico del ácido trifluorometanosulfónico

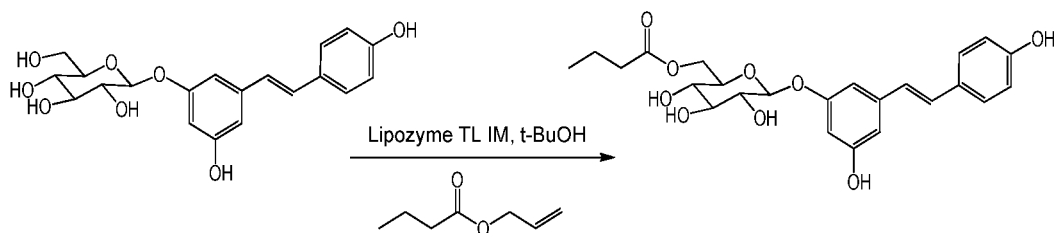
THF: tetrahidrofurano.

DCM: diclorometano.

MeOH: metanol.

*Síntesis del compuesto piceido-butirato (trans-resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-butanoil)- β -D-glucopiranosido, BUT)*

La síntesis de piceido-butirato se llevó a cabo por reacción de piceido (resveratrol-3-*O*-glucósido) con butirato de vinilo en presencia de una lipasa inmovilizada utilizando como disolvente *tert*-butanol (t-BuOH) (ver esquema). Se utilizó la lipasa de *Thermomyces Lanuginosus* inmovilizada en sílice granulada porosa, que es comercializada por la empresa Novozymes A/S bajo el nombre de *Lipozyme TL IM*[®]. La reacción se realizó a 60°C con agitación orbital durante 14 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna para dar trans-resveratrol-3-*O*-(6'-*O*-butanoil)- β -D-glucopiranosido (o también nombrado como piceido-butirato o BUT) con muy alto rendimiento (95-97%).

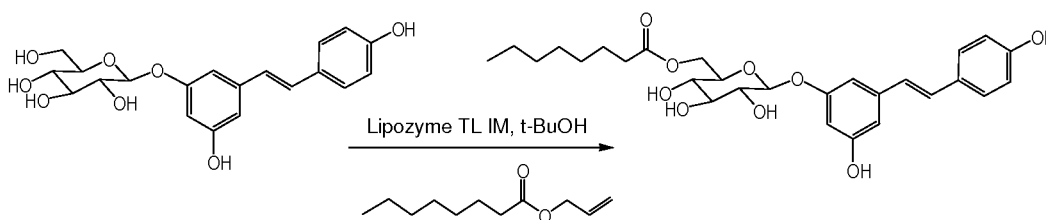


Caracterización

¹H-RMN (MeOD, 300 MHz), δ ppm: 7.38 (d, 2H, J=8.4 Hz); 7.03 (d, 1H, J=16.2 Hz); 6.86 (d, 1H, J=16.2 Hz); 6.79 (d, 2H, J=8.7 Hz); 6.74 (s, 1H); 6.64 (s, 1H); 6.43 (t, 1H, J=2.1 Hz); 4.92 (m, 1H), 4.45 (dd, 1H, J=2.1 and 12 Hz); 4.28-4.21 (m, 1H); 3.73-3.67 (m, 1H); 3.53-3.47 (m, 2H); 3.37 (m, 1H), 2.30 (t, 2H, J=7.5 Hz); 1.59-1.52 (m, 2H); 0.83 (t, 3H, J=7.2 Hz); ¹³C-RMN (MeOD, 75 MHz), δ ppm: 174.1; 158.8; 158.2; 157.0; 139.9; 128.8; 128.6; 127.5; 125.4; 115.2; 107.0; 105.5; 102.9; 100.5; 76.5; 73.9; 73.4; 70.5; 63.4; 35.5; 17.9; 12.5; HRESIMS: calculado para C₂₄H₂₈NaO₉ 483.1631, encontrado 483.1648.

Síntesis del compuesto piceido-octanoato (trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoil)- β -D-glucopiranosido, OCT)

La síntesis de piceido-octanoato o trans-resveratrol-3-O-(6'-O-octanoil)- β -D-glucopiranosido sigue la misma metodología utilizada para la preparación de piceido-butirato pero usando octanoato de vinilo como agente acilante:



De igual modo que la síntesis del compuesto anterior se obtuvieron rendimientos muy altos (95-97%).

Caracterización

¹H-RMN (MeOD, 300 MHz), δ ppm: 7.38 (d, 2H, J=8.7 Hz); 7.03 (d, 1H, J=16.2 Hz); 6.86 (d, 1H, J=16.2 Hz); 6.78 (d, 2H, J=8.7 Hz); 6.74 (s, 1H); 6.64 (s, 1H); 6.43 (t, 1H, J=2.1 Hz); 4.90 (d, 1H, J= 7.3 Hz), 4.45 (dd, 1H, J=1.8 and 11.7 Hz); 4.28-4.21 (m, 1H); 3.73-3.68 (m, 1H); 3.51-3.48 (m, 2H); 3.45-3.33 (m, 1H); 2.30 (t, 2H, J=7.5 Hz); 1.52-1.47 (m, 2H); 1.25-1.16 (m, 8H); 0.86 (t, 3H, J=7.2 Hz); ¹³C-RMN (MeOD, 75 MHz), δ ppm: 174.1; 158.8; 158.2; 157.1; 139.9; 128.8; 128.5; 127.8; 127.5; 125.4; 115.1; 107.0; 105.2; 100.5; 76.5; 73.9; 73.4; 70.6; 63.4; 33.6; 31.4; 28.9; 28.6; 24.6; 22.2; 13.0; HRESIMS: calculado para C₂₈H₃₆NaO₉ 539.2257, encontrado 539.2269.

Ejemplo 2A

Actividad anti-inflamatoria del piceido, resveratrol-3,5-O-diglucósido, piceido-butirato y piceido-octanoato en un modelo animal de colitis ulcerosa. Comparación respecto al resveratrol

Modelo animal y de enfermedad

La experimentación animal se ha ajustado a los principios de la declaración de Helsinki y fue autorizado por el Servicio de Animalario de la Universidad de Murcia. Tras la experimentación los animales fueron anestesiados con ketamina y xilacina y sacrificados por desangrado.

Se ha usado un modelo de inflamación intestinal basado en la administración de DSS (sulfato de dextrano sódico) a ratones C57BL/6. En la actualidad no existe un consenso sobre cuál es, globalmente, el mejor modelo de colitis experimental. El modelo del DSS es ampliamente utilizado pues presenta características clínicas, morfológicas y analíticas similares, hasta cierto punto, a las propias de los pacientes con colitis ulcerosa o con enfermedad de Crohn.

El ensayo de inflamación *in vivo* se realizó por duplicado con una separación de varios meses. En cada ensayo, cada grupo de animales (n=8) fue alimentado con dieta estándar suplementada con 2,3 mg/día/kg (peso animal) de cada uno de los compuestos, según el grupo. Esta dosis supone la ingesta por ratón (con peso medio de 22 gramos) de 0,05 mg/día (50 μ g/día). Esta dosis, extrapolada al ser humano es equivalente a 10 mg en un adulto de 70 kg de peso; usando la fórmula HED (dosis equivalente en humano) = dosis animal en mg/kg x (peso animal kg/peso humano en kg)^{0.33}.

En cada ensayo, los ratones fueron alimentados durante 3 semanas tras las cuales se incluyó en la bebida DSS al 1%. El DSS se mantuvo durante 8 días (y también la misma alimentación que desde el principio). Después se retiró el DSS y se dejó recuperar a los animales otros 6 días (también con la misma alimentación).

Grupos incluidos en el estudio: control (pienso estándar), control-DSS, DSS-Resveratrol (RES), DSS-Piceido (PIC), DSS-Resveratrol-diglucósido (DIGLUC), DSS-Piceido-butirato (BUT), DSS-Piceido-octanoato (OCT).

Los efectos de la colitis inducida, y de acuerdo a los descritos anteriormente en este modelo, fueron los siguientes:

- ✓ Alteración de la barrera mucosa incrementando la exposición de los macrófagos a la microbiota.

- ✓ Liberación de citoquinas proinflamatorias.
- ✓ Aumento de la producción de prostaglandinas.
- 5 ✓ Pérdida de apetito y peso.
- ✓ Diarrea y sangre en heces. Anemia.
- 10 ✓ Acortamiento del colon y engrosamiento de sus paredes. Infiltrado leucocitario, pérdida de epitelio y destrucción de criptas.
- ✓ Aumento del estatus inflamatorio a nivel intestinal y sistémico.
- 15 ✓ Modificación de la microbiota aumentando el número de enterobacterias.

Evaluaciones realizadas

- *Control de peso, ingesta de alimento y bebida.* Los ratones de todos los grupos fueron individualmente controlados, monitorizando el peso, cantidad de pienso ingerido y agua bebida cada día a lo largo de todo el ensayo experimental.
- *Sangre y agua en heces.* El contenido de agua en heces, como índice de diarrea, se evaluó por diferencia de peso tras evaporación en estufa. La sangre se midió usando tiras reactivas basadas en la reacción guaicol-peroxidasa (HealthCare Diagnosis Inc.). Las muestras se diluyen en solución salina 1:50 y se aplican a las tiras reactivas. Después de 60 s, se compara el color con la plantilla suministrada por el fabricante. La reacción se mide usando una escala desde 0 (resultado negativo) a 4 (el cambio de color más intenso).
- *Longitud del colon.* Tras el sacrificio, se obtuvo el colon de cada ratón, se extendió y se midió. Mediante raspado de la cara luminal del colon, se obtuvieron muestras de mucosa colónica para diversos ensayos comentados a continuación.
- *Actividad mieloperoxidasa en mucosa colónica.* Se evaluó mediante espectrofotometría a 460 nm usando el reactivo O-dianisidina y peróxido de hidrógeno. El cambio en absorbancia a 460 nm se monitorizó durante 10 minutos en un espectrofotómetro V-630 (Jasco, Tokio, Japan). La actividad MPO se expresó como mU de actividad/mg de tejido fresco comparando el incremento de absorbancia con una recta patrón realizada con mieloperoxidasa de leucocitos (Sigma).
- *Prostaglandinas en mucosa colónica.* Los niveles de PGE₂ se midieron en homogenizados de mucosa colónica con un método inmunoenzimático usando un kit de Cayman Chem. (E.E.U.U.).
- *“Antibody array”.* Se utilizó el kit de “antibody array” de RayBiotech (“RayBio Mouse Inflammation Antibody Array 1”) para determinar citoquinas en muestras de tejido colónico. Los “RayBio Mouse inflammation antibody arrays” son un sistema rápido y preciso para detectar de forma muy sensible el perfil de expresión de múltiples citoquinas (40 en este caso). La sensibilidad es incluso de 100 veces mayor en comparación con el método ELISA. La medida se realizó por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo y a continuación se incubaron durante 2 h con 300 µg de proteína. Finalmente las membranas se incubaron con un cocktail de anticuerpos conjugados con biotina y después peroxidasa de rábano marcada con streptavidina. La señal se detectó mediante quimioluminiscencia. Las imágenes se captaron mediante una cámara CCD instalada en una estación de imagen Chemidoc XRS de Biorad. El análisis de las intensidades de señal (densitometría) se realizó mediante el software ScanAlyze. La media de las intensidades de los controles positivos se utilizó para normalizar los resultados. Los cambios de los niveles de citoquinas se expresaron como la media ± SD en unidades de densidad arbitrarias. Las diferencias para cada citoquina fueron evaluadas mediante ANOVA seguida del test de Tukey *post-hoc* usando el software SPSS para Windows version 15.0.
- *Arquitectura colónica.* Se analizaron muestras del colon distal, que se fijaron en formalina al 10%, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Las muestras se cortaron con un microtomo Leica en secciones de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina usando un microscopio óptico para su visualización. Se evaluó el grado de colitis de acuerdo al sistema de Araki (Araki *et al Clin. Exp. Immunol.* **2000**, 119, 264-269.), atendiendo a la pérdida de epitelio, destrucción de criptas e infiltrado de células inflamatorias.
- *Marcadores de inflamación sistémica.* La concentración sérica de haptoglobina se cuantificó con un método espectrofotométrico usando el kit “Phase Range Haptoglobin Assay” de Tridelta Development (Irlanda). El fibrinógeno se midió de acuerdo con el método de Clauss (Giffen, P.S. *et al. Arch. Toxicol.* **2003**, 77, 392-402).
- *Recuentos de la microbiota en heces.* Se analizaron muestras de heces a día 0, antes de la administración del DSS (día 21) y tras 8 días de administración del DSS (día 29). Las muestras se homogeneizaron en agua con peptona tamponada (1:10) utilizando un “stomacher” (IUL Instrument, Barcelona). Los lactobacilos y las bifidobacterias se cultivaron en agar MRS y en el caso de las bifidobacterias, además suplementado con 0,5 mg/L dicloxacilina, 3 g/L

de Lic. y 0,5 g/L de L-cisteína clorhidrato. Las enterobacterias se cultivaron en agar de bilis glucosa y rojo violeta; y *E. coli* en "Chromocult coliform Agar". Los clostridios se cultivaron en medio "Reinforced Clostrida". Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h en una cámara de anaerobios (Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) (CO₂:H₂:N₂, 5:15:80). Los recuentos microbianos se expresan como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g).

Resultados observados ($P < 0.05$)

Los resultados reflejan la media de todos los ratones de cada grupo y de los dos ensayos independientes.

- *Preservación de la longitud del colon*. Los ratones de los grupos BUT y OCT fueron los que mostraron un menor acortamiento del colon como consecuencia de la administración de DSS (Fig. 1).

- *Evolución del peso*. Todos los animales siguieron una curva normal de evolución del peso durante las 3 primeras semanas de alimentación con pienso suplementado en los distintos derivados de resveratrol con HED de 10 mg. Tras la administración de DSS (día 21), el aumento de peso mostró una ralentización, produciéndose un descenso en el peso en la mayoría de los grupos en comparación con los animales control. Sin embargo, los ratones de los grupos BUT y OCT mantuvieron el mismo peso que el grupo control. El espacio entre flechas indica el periodo de administración de DSS (Fig. 2).

- *Evaluación del DAI (Disease Activity Index)*. Se evaluó diariamente (a partir de la incorporación de DSS en el agua, día 21 del ensayo global) la inflamación intestinal mediante el DAI, que correlaciona la pérdida de peso, la consistencia de las heces (agua en heces) y la presencia de sangre en éstas. En la gráfica, del día 1 al 8 se corresponde con la administración de DSS y del 8 al 14, el periodo de recuperación. Se marcan con una flecha la mejora observada en los grupos BUT y OCT, muy por debajo del resto (Fig. 3).

El índice de actividad se calculó como el promedio de la puntuación de las variables: pérdida de peso, consistencia de las heces y sangre en heces.

La pérdida de peso se calculó como el porcentaje de la diferencia entre el peso original a día =0 (antes de comenzar a administrar el DSS) y el peso de cada día de suministro de DSS y los días de recuperación. La puntuación fue la siguiente:

0: < 1% de pérdida de peso

1: 1-5% de pérdida de peso

2: 5-10% de pérdida de peso

3: 10-15% de pérdida de peso

4: >15% de pérdida de peso.

La consistencia en heces se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de agua en heces

0= normal hasta 60% de agua en heces

1= poco blanda 60-70% de agua en heces

2= blanda 70-75% de agua en heces

3= diarrea >75% de agua en heces.

La presencia de sangre en heces se determinó mediante tiras reactivas basadas en el test de guaiacol (Bayer, Barcelona, España).

0: negativo; 1= +; 2= ++; 3= +++; 4= ++++.

- *Disminución de la actividad mieloperoxidasa en mucosa colónica*. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima secretada por monocitos y neutrófilos activados. En inflamación intestinal mide el grado de infiltración de tejido linfóide en la mucosa. Tiene poder pro-inflamatorio y en casos de enfermedad cardiovascular contribuye al daño directo sobre la placa aterosclerótica. Predice eventos en pacientes con enfermedad coronaria. La disminución más evidente se produjo con la administración de OCT y BUT (Fig. 4).

- *Efectos en inflamación sistémica*. Se evaluó la haptoglobina y el fibrinógeno que son marcadores muy útiles en eventos de inflamación aguda (pertenecen a las llamadas proteínas de fase aguda). En todos los casos se observó una clara tendencia de mejora, incluidos RES, DIGLUC, BUT y OCT, siendo las diferencias más notables, respecto al

grupo DSS las observadas en BUT y OCT en la haptoglobina (Fig. 5) y DIGLUC, BUT y OCT en el fibrinógeno (Fig. 6).

- *Atenuación del daño en la mucosa colónica.* En el control-DSS se apreció una destrucción masiva de las criptas colónicas y del epitelio así como una sustancial infiltración de tejido linfoide. Todos los derivados ejercieron una actividad protectora sobre las alteraciones anteriores. Los derivados BUT y OCT fueron los que mejor preservaron la arquitectura colónica tras tratamiento con DSS (Fig. 7).

- *“Antibody array” en mucosa colónica.* (Valores tras finalizar administración de DSS; sin período de recuperación). Solo se muestran resultados con diferencias estadísticamente significativas (aunque en otros muchos casos se observó también una tendencia clara). Los “antibody array” nos permiten una medida sensible y reproducible de numerosas proteínas de forma simultánea.

TNFR1 (Receptor del factor de necrosis tumoral, CD120a). Este receptor para $TNF\alpha$ media respuesta inflamatoria donde interviene la ruta de las MAPKinasas y NFKappaB. Media en la inducción de la potente citoquina pro-inflamatoria IL-6. En el BUT y OCT, los valores son similares a los ratones control (Fig. 8).

Macrophage Inflammatory Protein (MIP). MIP- γ es una proteína inflamatoria de macrófagos y potente atrayente de neutrófilos. Favorece por tanto el reclutamiento de neutrófilos para potenciar la respuesta inflamatoria. Induce la producción de citoquinas como IL-1, IL-6 y $TNF\alpha$. Se sabe que la reducción de MIP disminuye las consecuencias perjudiciales de la inflamación (Fig. 9).

MIG. Esta citoquina producida por monocitos (monoquina) es inducida por IFN- γ . La MIG (también conocida como CXCL9), atrae a las células T e influye críticamente en el proceso inflamatorio. Todos los derivados disminuyen el nivel de MIG de forma parecida (Fig. 10).

Interleuquina-3 (IL-3). La IL-3 mejora las defensas del organismo como parte del sistema inmune. De hecho se ha comprobado su utilidad en pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia pues estimula la diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotenciales. La IL-3 no se asocia con procesos inflamatorios (no se afecta el valor tras tratamiento con DSS), pero se ha incluido por considerarse su aumento un efecto positivo. Todos los derivados tienen un efecto estadísticamente significativo (Fig. 11).

Interleuquina-6 (IL-6). La IL-6 es la citoquina pro-inflamatoria clave en procesos de inflamación agudos y crónicos. Está implicada en procesos de trombosis/inflamación pues activa la coagulación. También está relacionada con la obesidad y la resistencia a insulina (Fig. 12).

- *Síntesis de prostaglandinas.* La prostaglandina E2 está involucrada en la inflamación, piresis (fiebre) y en la hipersensibilidad al dolor. Se trata del producto final formado a partir del ácido araquidónico y donde intervienen enzimas clave de su síntesis como la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Todos los derivados ejercieron efecto positivo disminuyendo la producción de prostaglandinas y la expresión de COX-2 (a nivel génico y protéico). Nuevamente, los derivados BUT y OCT fueron los que mostraron mejores resultados (Fig. 13).

- *Aspecto general de los ratones.* Los animales que no ingirieron ningún derivado de resveratrol, tras la administración durante 8 días de DSS al 1%, mostraron ataxia, caída de pelo y pérdida del brillo, delgadez y hemorragias rectales (Fig. 14A). Los animales alimentados previamente con derivados del resveratrol mostraron mejora sustancial sobre los controles (Fig. 14B,C,D), observándose una mejora con el siguiente orden: OCT (D) $\approx$ BUT (C) $\gg$ RES $\approx$ DIGLUC $\approx$ PIC (B) $\gg$ Control-DSS (A) (Fig. 14). Se muestran resultados representativos para los grupos con mayor efecto (BUT y OCT) y referenciados al resveratrol (RES) y control-DSS.

- *Evaluación de la microbiota en heces antes y después de la administración de DSS.* En todos los grupos se observó un incremento en el recuento de bifidobacterias en las 3 semanas previas a la administración del DSS respecto al grupo control (Fig. 15). A las 3 semanas, el mayor recuento se observó en el grupo con dieta suplementada en DIGLUC, si bien las diferencias entre grupos fueron mínimas. Sin embargo, tras la administración del DSS, solo los grupos OCT y BUT continuaron con la tendencia al alza en los recuentos de bifidobacterias. Por el contrario, en el resto de grupos, los recuentos disminuyeron drásticamente situándose al nivel del grupo control, excepto en el grupo RES con recuentos ligeramente superiores (Fig. 15). Salvo ligeros matices, el mismo resultado se observó en el caso de los lactobacilos (Fig. 16) y los clostridios (Fig. 17). En este último caso solo se evaluaron los grupos más significativos (control, RES, BUT y OCT).

El análisis de estos resultados pone básicamente de manifiesto que el pretratamiento con OCT y BUT, incrementa la población de bifidobacterias, lactobacilos y clostridios, y este aumento se mantiene tras la administración del DSS, que presenta un conocido efecto de alterar la microbiota intestinal. El papel beneficioso de bifidobacterias y lactobacilos es conocido al estimular las defensas frente a situaciones de estrés o infección y contribuir a la homeostasis general intestinal. En el caso de los clostridios, es sabido que son productores de ácidos grasos de cadena corta, de conocidos efectos anti-inflamatorios a nivel intestinal y que también podrían contribuir al efecto global.

El mantenimiento de las poblaciones de los grupos bacterianos analizados en BUT y OCT refleja el buen estatus de homeostasis intestinal que presentan estos ratones, sumándose a los efectos beneficiosos anteriormente descritos.

El DSS también es conocido por facilitar la proliferación de enterobacterias, incluyendo *E. coli*, en parte debido a la destrucción de otros grupos microbianos como los anteriormente mencionados. Se realizó el recuento tras administración del DSS en los tratamientos más importantes, BUT y OCT, usando al resveratrol (RES) y control como comparación (Fig. 18). Se observó una clara reducción de enterobacterias y *E. coli* en los tres grupos, especialmente en el caso de BUT y OCT.

Ejemplo 2B

Tiempo de llegada y concentración detectada de resveratrol en el colon tras el suministro de piceido (PIC), resveratrol-3,5-O-diglucósido (DIGLUC), piceido-butirato (BUT) y piceido-octanoato (OCT) a ratones sanos. Comparación respecto al resveratrol (RES)

En otro ensayo diferente, utilizando la misma cepa de ratones que en el ejemplo anterior pero sin inducirles la inflamación, se suministraron los correspondientes compuestos mediante sonda gástrica. Cada ratón recibió la misma cantidad de resveratrol en equivalentes mol/mol a partir de los distintos compuestos. Lógicamente no se suministró la misma cantidad porque en comparación peso/peso, las moléculas de mayor masa contiene menos resveratrol proporcionalmente. Si el resveratrol desnudo aporta 1 de resveratrol, esta relación es de 0,58 para PIC, 0,41 para DIGLUC, 0,5 para BUT y 0,44 para OCT. Esta relación supuso una administración de resveratrol de 84 mg/kg peso vivo de ratón (HED 0,5 g en persona de 70 kg), y esta cantidad de resveratrol fue aportada por 145 mg/kg de PIC, 205 mg/kg de DIGLUC, 168 mg/kg de BUT y 191 mg/kg de OCT.

Los ratones se dividieron en grupos (n=3) que se sacrificaron a distintos tiempos (15 min, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h) tras la ingesta de los correspondientes compuestos. Por tanto, se establecieron 40 grupos de ratones de 3 ratones cada uno. El sacrificio de los animales se realizó tal y como se especificó en el ejemplo anterior.

Extracción y análisis de metabolitos en el tracto gastrointestinal. El contenido del colon se extrajo con metanol:agua (50:50), se centrifugó y los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía de alta resolución (Agilent 1200 series) con flujo capilar, acoplada a un espectrómetro de masas equipado con una trampa de iones (ESI) (Bruker Daltonics). Los picos cromatográficos se identificaron según su espectro ultravioleta, ion de masas e iones hijo resultantes tras su fragmentación. La cuantificación de los picos se realizó a 320 nm usando los correspondientes estándares.

Resultados observados

El resveratrol administrado como tal (RES), empezó a detectarse en el colon una hora después de su ingesta (FIG. 19), mostrando un máximo en torno a las 5 horas. Las modificaciones estructurales del resveratrol llevaron consigo una mayor presencia de éste en el colon, siendo máxima en el caso de los compuestos BUT y OCT. Las modificaciones estructurales introducidas en BUT y OCT protegieron al resveratrol frente a su absorción y conjugación, detectándose 6 y 5,6 veces más resveratrol en colon que cuando se utilizó el resveratrol desnudo (RES) (Fig. 19). Por tanto, en compuestos de fórmula general (I), el uso de un grupo acilo (-OCO-R₃) en R₂, y donde preferiblemente R₃ es un grupo alquilo (C₂-C₁₀), y más preferiblemente R₃ es un grupo alquilo (C₃-C₇), permitió vehiculizar de forma más efectiva al resveratrol para incrementar su concentración en el colon y por tanto poder ejercer mayor acción biológica.

Ejemplo 3

Actividad anti-adhesión e inmunomoduladora del resveratrol, piceido, resveratrol-3,5-O-diglucósido, piceido-butirato y piceido-octanoato frente a bacterias patógenas intestinales

La capacidad de los compuestos ensayados para inhibir adhesión de bacterias como la *Salmonella*, *E. coli* serotipo O157 y *Listeria monocytogenes* que son tres de los principales patógenos bacterianos implicados en las toxiinfecciones alimentarias ayudaría a prevenir la invasión intestinal de dichas bacterias y por tanto, serían una herramienta muy útil como inhibidores de los mecanismos de la infección bacteriana. En consecuencia, podría ofrecer una alternativa a la profilaxis de antibióticos. La capacidad de estos compuestos para modular la producción de moléculas pro-inflamatorias, tales como la interleuquina-8 (IL-8), como respuesta a la infección por bacterias enteropatógenas como las mencionadas anteriormente ayudaría a prevenir la inflamación intestinal exacerbada en presencia de dichas bacterias. En consecuencia, reduciría la sintomatología asociada a las infecciones del tracto digestivo.

Se contemplan por separado los dos principales aspectos evaluados en la infección de patógenos bacterianos, la adhesión de la bacteria a la célula huésped y la inflamación que causa en esta célula huésped la invasión del patógeno.

Actividad antiadhesión

Metodología

Para evaluar la capacidad antiadhesión de los compuestos derivados del resveratrol frente a bacterias patógenas alimentarias utilizamos dos modelos celulares de carcinoma de colon: Caco-2 (modelo utilizado frecuentemente para medir adhesión de microorganismos) y HT-29 (modelo utilizado frecuentemente para medir la respuesta inmune frente a infecciones por enteropatógenos). El crecimiento de células Caco-2 y HT-29 se llevó a cabo en EMEM y

DMEM, respectivamente, para lo cual se utilizaron placas de 24 pocillos a 37°C, 5% CO₂, 95% aire hasta formación de epitelio confluyente unicapa (concentración de células por pocillo 2x10⁵ y 6x10⁵, respectivamente). Las bacterias patógenas (*E. coli* O157, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* Scott A) se pusieron en contacto con los distintos compuestos derivados del resveratrol durante 1 h y posteriormente, las bacterias junto con los distintos compuestos a una concentración de 25 µM/pocillo se inocularon sobre los cultivos celulares incubando las placas durante 2 h/37°C, 5% CO₂, 95% aire. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS estéril y se añadió 1 ml de agua destilada con 20% de glicerol y se congelaron a -70°C para lisar las células epiteliales. Por último, se llevó a cabo un recuento de los patógenos bacterianos adheridos a las células utilizando placas petri con agar nutritivo (para el recuento de *Salmonella* y *E. coli* O157) y en placas con agar infusión cerebro-corazón (para el recuento de *L. monocytogenes*). Las concentraciones de los distintos derivados testados han sido detectadas en el tracto digestivo de animales de experimentación y por tanto el ensayo se enmarca dentro de unas concentraciones fisiológicamente alcanzables.

Resultados

En los ensayos utilizando cultivos celulares de Caco-2, se observa que el resveratrol y sus derivados redujeron la adhesión de bacterias patógenas al epitelio intestinal si los comparamos con la adhesión de bacterias inoculadas sin la adición de dichos compuestos (control positivo, C+) (Fig. 20). La eficacia anti-adhesión de los distintos derivados del resveratrol testados fue similar frente a *E. coli* O157. Sin embargo, frente a *Salmonella* y *L. monocytogenes*, se observó una mayor eficacia anti-adhesión de BUT y OCT en comparación con el resveratrol y los otros derivados (Fig. 20). En los ensayos utilizando cultivos celulares de HT-29, corroboraron que el resveratrol y sus derivados redujeron la adhesión de bacterias patógenas al epitelio intestinal si los comparamos con la adhesión de bacterias inoculadas sin la adición de dichos compuestos (control positivo, C+) (Fig. 21).

Actividad inmunomoduladora

Metodología

Para evaluar la capacidad de los compuestos derivados del resveratrol para modular la producción de la interleuquina-8 como respuesta a bacterias patógenas alimentarias se utilizó el modelo celular humano de carcinoma de colon: HT-29. El crecimiento de células HT-29 se llevó a cabo en DMEM para lo cual se utilizaron placas de 96 pocillos a 37°C, 5% CO₂, 95% aire hasta formación de epitelio confluyente unicapa. Las bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes* Scott A) se pusieron en contacto con los distintos compuestos derivados del resveratrol durante 1 h y posteriormente, las bacterias junto con los compuestos se inocularon sobre los cultivos celulares incubando las placas durante 6 h/37°C, 5% CO₂, 95% aire. Se observó la viabilidad celular al microscopio y se recogieron los sobrenadantes de los pocillos. Tras centrifugar (10.000 rpm/10 min) y filtrar los sobrenadantes (0.22), se determinó IL-8 mediante método ELISA (Human Elisa IL-8 dialclone). Las concentraciones de los distintos derivados testados han sido detectadas en el tracto digestivo de animales de experimentación y por tanto el ensayo se enmarca dentro de unas concentraciones fisiológicamente alcanzables.

Resultados

La inoculación de *Listeria monocytogenes* en epitelio confluyente de HT-29 dio como resultado una gran producción de la citoquina proinflamatoria IL-8, alcanzando concentraciones de 200-250 pg/ml después de 6 h de contacto (Fig. 22). Usando este modelo celular y este patógeno como ejemplo representativo de infección que además cursa con inflamación, se procedió al estudio del efecto de los distintos derivados en la producción de IL-8. El resveratrol y la mayoría de derivados de resveratrol testados no fueron efectivos reduciendo significativamente la producción de esta citoquina. Sin embargo, OCT y BUT sí redujeron significativamente su producción (Fig. 23). Dicha modulación fue más evidente al incrementar la dosis de OCT y BUT hasta concentraciones de 50 y 100 µM (Fig. 23).

Ejemplo 4

Actividad antioxidante en aceites de pescado y emulsiones de aceites de pescado

La evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos se ensayó en emulsiones de aceites de pescado, modelo que simula la actividad en membranas y especialmente adecuado para simular la actividad antioxidante en músculo de pescado y carnes.

Para la realización de los experimentos se empleó un aceite de hígado de bacalao (*Gadus morhua*) proporcionado por Fluka (New-Ulm, Switzerland) y se prepararon emulsiones de aceite de pescado en agua utilizando con un contenido del 10% de aceite empleando como agente emulsificante lecitina (40% de fosfatidilcolina, Sigma).

El sistema se enriqueció en los compuestos antioxidantes a ensayar (resveratrol, piceído, resveratrol-3,5-diglucósido, piceído-butilato y piceído-octanoato) y se comparó el grado de inhibición de la oxidación durante experimentos inducidos de oxidación frente a controles (muestras sin antioxidantes).

La oxidación de las muestras de emulsiones se activó térmicamente en estufas a 40°C. Se monitorizó diariamente, y la extensión de la oxidación se evaluó mediante el análisis de hidroperóxidos conjugados y los compuestos fluorescentes (método propuestos por Nielsen *et al.*, 1985; Brit. J. Nutr. 53, 75-86) en emulsiones.

ES 2 362 065 A1

Se obtuvieron las cinéticas de formación de los hidroperóxidos conjugados y de los compuestos fluorescentes de las distintas muestras, y se estimó la actividad antioxidante de los compuestos en base a los porcentajes de inhibición de los productos de oxidación formados.

5 El porcentaje de inhibición se calculó en la fase de propagación de la oxidación, por la modificación de la fórmula propuesta por Frankel (1998; Lipid Oxidation. The Oily Press. Dundee, Scotland): Porcentaje de inhibición (%): $(C - S / C - C_0) \times 100$; donde, C representa el valor del índice de oxidación en el control, C_0 el valor del índice de oxidación en el control a tiempo cero y S el valor de oxidación en las muestras con compuesto.

10 *Resultados Emulsiones*

El resveratrol, el piceido y el derivado DIGLUC mostraron una actividad antioxidante en emulsiones significativa (Fig. 24) y muy similar con inhibiciones de la oxidación comprendidas entre el 45 y 60%. Estos resultados indican que DIGLUC puede ser utilizado con efectividad para inhibir la rancidez oxidativa en alimentos.

15 Los derivados BUT y OCT mostraron una significativa actividad inhibidora de la rancidez oxidativa en emulsiones de aceites de pescado con valores comprendidos de 55 y 60% de inhibición, respectivamente.

20

25

30

35

40

45

50

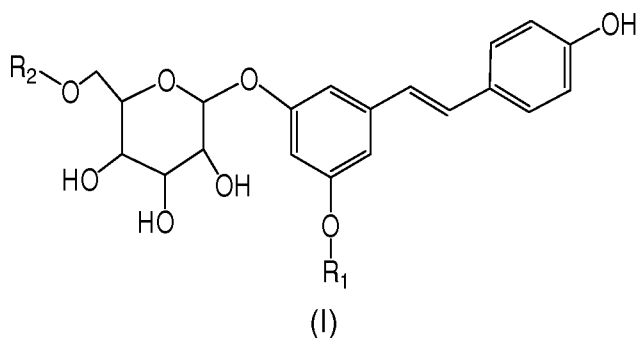
55

60

65

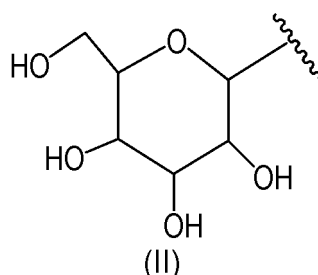
REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica o alimenticia para el tratamiento y/o prevención de procesos inflamatorios.



donde:

R_1 es hidrógeno ó el grupo de fórmula general (II):



donde:

R_2 es hidrógeno o forma junto con el oxígeno un grupo acilo ($-\text{OCO}-R_3$) donde R_3 es un grupo alquilo (C_1-C_{22}) o un grupo alquénilo (C_2-C_{22}), y

cuando R_2 es hidrógeno R_1 representa el grupo de fórmula general (II).

2. Uso del compuesto según la reivindicación 1, donde los anillos de piranosa que forman parte de las estructuras (I) o (II), se seleccionan, independientemente, entre glucosa, galactosa, manosa o alosa.

3. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, la unión del anillo de piranosa, contenido en las fórmulas general (I) o (II), al anillo fenólico correspondiente es de estereoquímica alfa o beta.

4. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anillo de piranosa es una glucosa.

5. Uso del compuesto según la reivindicación 4, donde la unidad de glucosa se une con estereoquímica beta al anillo fenólico correspondiente.

6. Uso del compuesto según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5, donde R_1 es hidrógeno.

7. Uso del compuesto según las reivindicaciones 1 a 6, donde R_2 forma un grupo acilo y R_3 es un grupo alquilo (C_2-C_{10}).

8. Uso del compuesto según las reivindicaciones 1 a 7, donde R_3 es un grupo alquilo (C_3-C_7).

9. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_2 es hidrógeno, R_1 representa al compuesto de fórmula general (II).

10. Uso del compuesto según la reivindicación 1, seleccionados de la lista que comprende trans-resveratrol-3,5-di- O - β -D-glucopiranosido, trans-resveratrol-3- O -(6'- O -butanoil)- β -D-glucopiranosido y trans-resveratrol-3- O -(6'- O -octanoil)- β -D-glucopiranosido.

11. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los procesos inflamatorios conducen o están originados por enfermedades inflamatorias, sistémicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas o cáncer.

12. Uso del compuesto según la reivindicación 11, donde la enfermedad inflamatoria sistémica es la artritis.

13. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los procesos inflamatorios están relacionados con procesos infecciosos provocados por microorganismos.

14. Uso de los compuestos según la reivindicación 13, donde los microorganismos se pueden seleccionar de la lista que comprende virus, *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis* o *Listeria monocytogenes*.

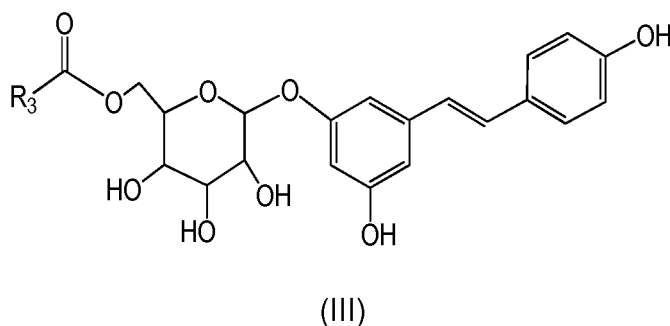
15. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como antioxidantes alimenticios.

16. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los procesos inflamatorios son enfermedades inflamatorias del tracto digestivo.

17. Uso del compuesto según la reivindicación 16, donde las enfermedades inflamatorias son del intestino.

18. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde las enfermedades inflamatorias del tracto digestivo se seleccionan de la lista que comprende el síndrome de intestino irritable, colitis indeterminada, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

19. Compuesto de fórmula general (III)



donde:

R_3 está descrito en la reivindicación 1.

20. Compuesto según la reivindicación 19, donde el anillo de piranosa es una glucosa.

21. Compuesto según la reivindicación 20, donde la glucosa se une con estereoquímica beta al anillo fenólico.

22. Compuesto según las reivindicaciones 19 a 21, donde R_3 es un grupo alquilo (C_2 - C_{10}).

23. Compuesto según las reivindicaciones 19 a 22, donde R_3 es un grupo alquilo (C_3 - C_7).

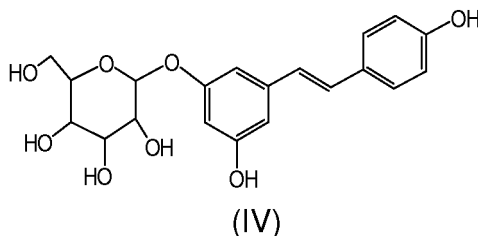
24. Compuesto según la reivindicación 23, trans-resveratrol-3- O -(6'- O -butanoil)- β -D-glucopiranosido.

25. Compuesto según la reivindicación 23, trans-resveratrol-3- O -(6'- O -octanoil)- β -D-glucopiranosido.

ES 2 362 065 A1

26. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (III) según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, que comprende:

a. mezclar el compuesto (IV):



con un compuesto de fórmula $R_3\text{-COO-R}_4$, en presencia de una lipasa,

donde: R_3 se describe en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25 y R_4 es hidrógeno o un grupo activador de la formación de enlace éster.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, donde la lipasa es de *Candida Antarctica*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei* o *Thermomyces Lanuginosus*.

28. Procedimiento según la reivindicación 27, donde la lipasa es de *Thermomyces Lanuginosus*.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, donde la lipasa está inmovilizada.

30. Procedimiento según la reivindicación 29, donde la lipasa está inmovilizada en sílice.

31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que la mezcla se realiza en un disolvente orgánico.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que la mezcla se realiza en acetona, dietil-éter, diisopropil-éter, metil tert-butil éter, tert-butanol, alcohol tert-amílico o alcohol tert-pentílico o mezclas de alguno de éstos con hexano, pentano, ciclohexano, piridina o tolueno.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la mezcla de reactivos se realiza en tert-butanol.

34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, donde la mezcla se calienta a una temperatura de entre 30°C y 70°C.

35. Procedimiento según la reivindicación 26, donde R_4 contiene un grupo vinilo.

36. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, para la elaboración de un medicamento.

37. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, para la elaboración de una composición alimenticia.

38. Uso del compuesto según la reivindicación anterior, donde la composición alimenticia se puede seleccionar de entre un alimento, complemento alimenticio, alimento funcional o nutraceutico.

39. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, como antioxidantes.

40. Uso del compuesto según la reivindicación anterior, para prevenir oxidaciones en alimentos.

41. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

42. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el compuesto es de fórmula general (III).

43. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 41 o 42, que además comprende otro principio activo.

44. Composición alimenticia que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I).

45. Composición alimenticia según la reivindicación anterior, donde el compuesto es de fórmula general (III).

ES 2 362 065 A1

46. Uso del compuesto de fórmula (I) descrito según la reivindicación 5, como vehículo para incrementar la presencia de resveratrol en el tracto intestinal.

5 47. Uso del compuesto de fórmula (I) descrito según la reivindicación 5, para la modulación de la microbiota intestinal, incrementando la población intestinal de bifidobacterias, lactobacilos y disminuyendo la de población de patógenos.

10 48. Uso del compuesto de fórmula general (III) según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, como vehículo para incrementar la presencia de resveratrol en el tracto intestinal.

49. Uso del compuesto de fórmula general (III) según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, para la modulación de la microbiota intestinal, incrementando la población intestinal de bifidobacterias, lactobacilos y disminuyendo la de población de patógenos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

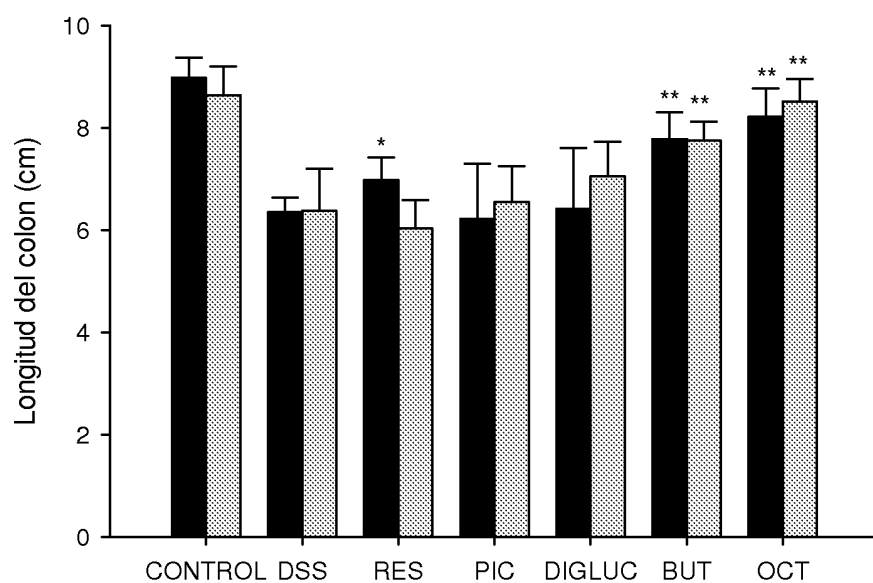


FIG. 1

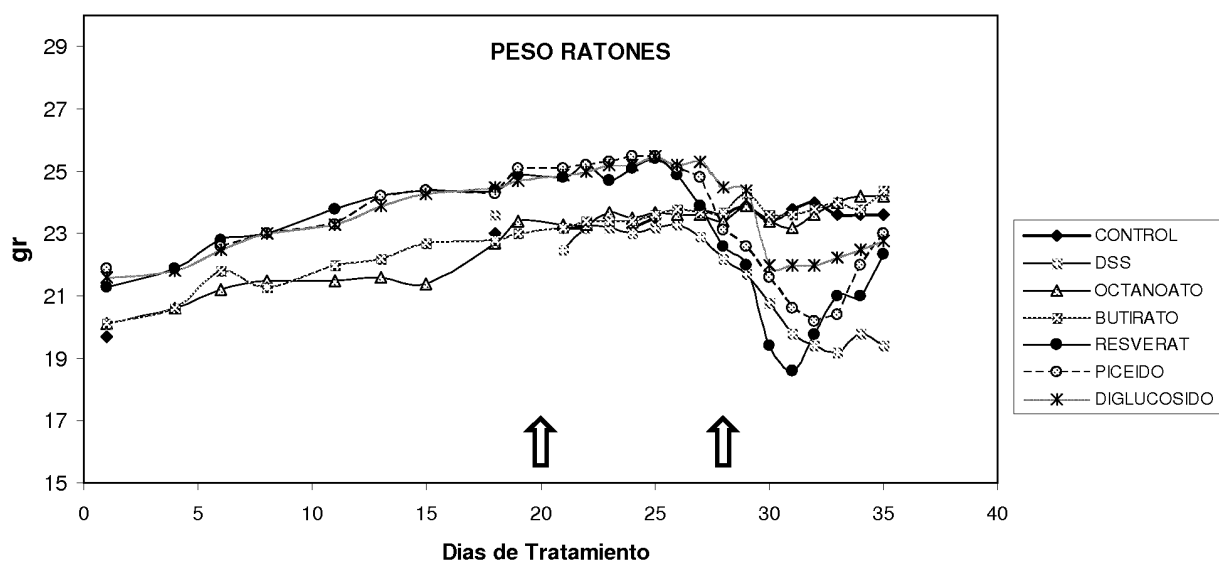


FIG. 2

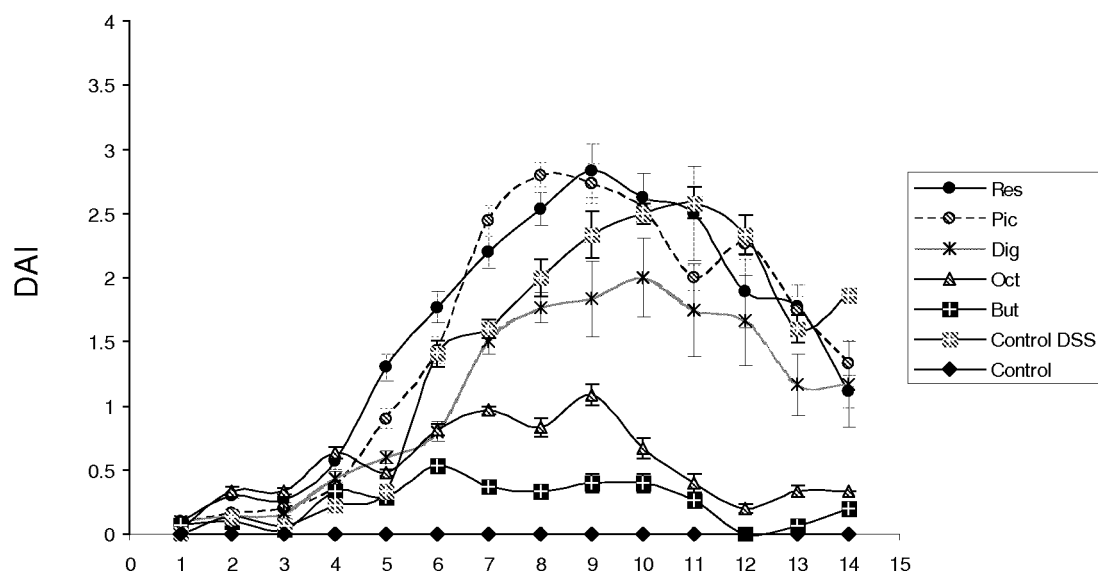


FIG. 3

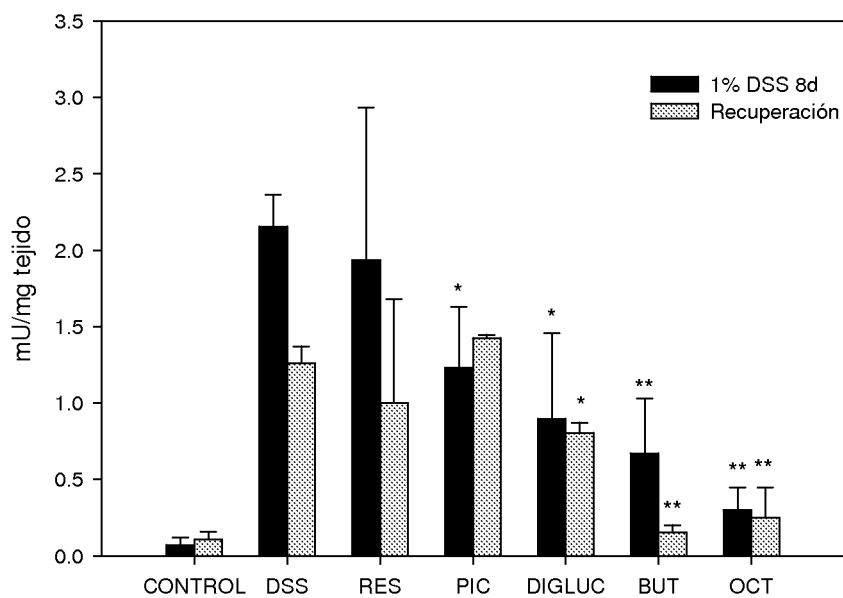


FIG. 4

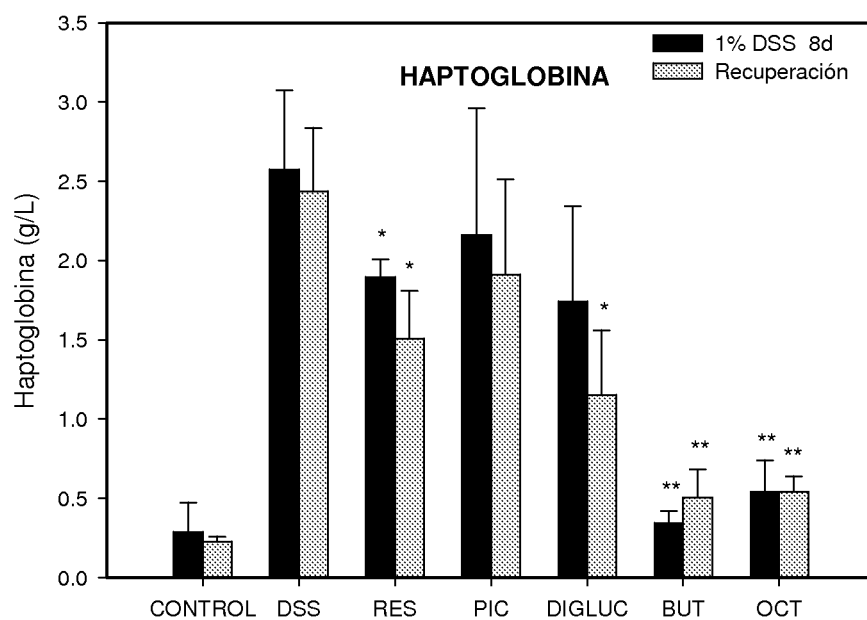


FIG. 5

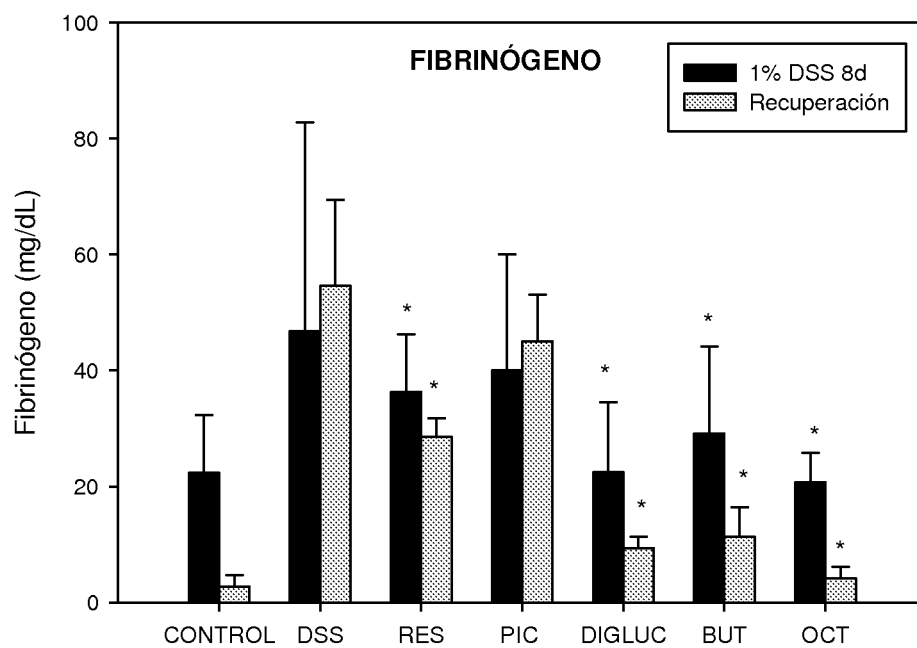


FIG. 6

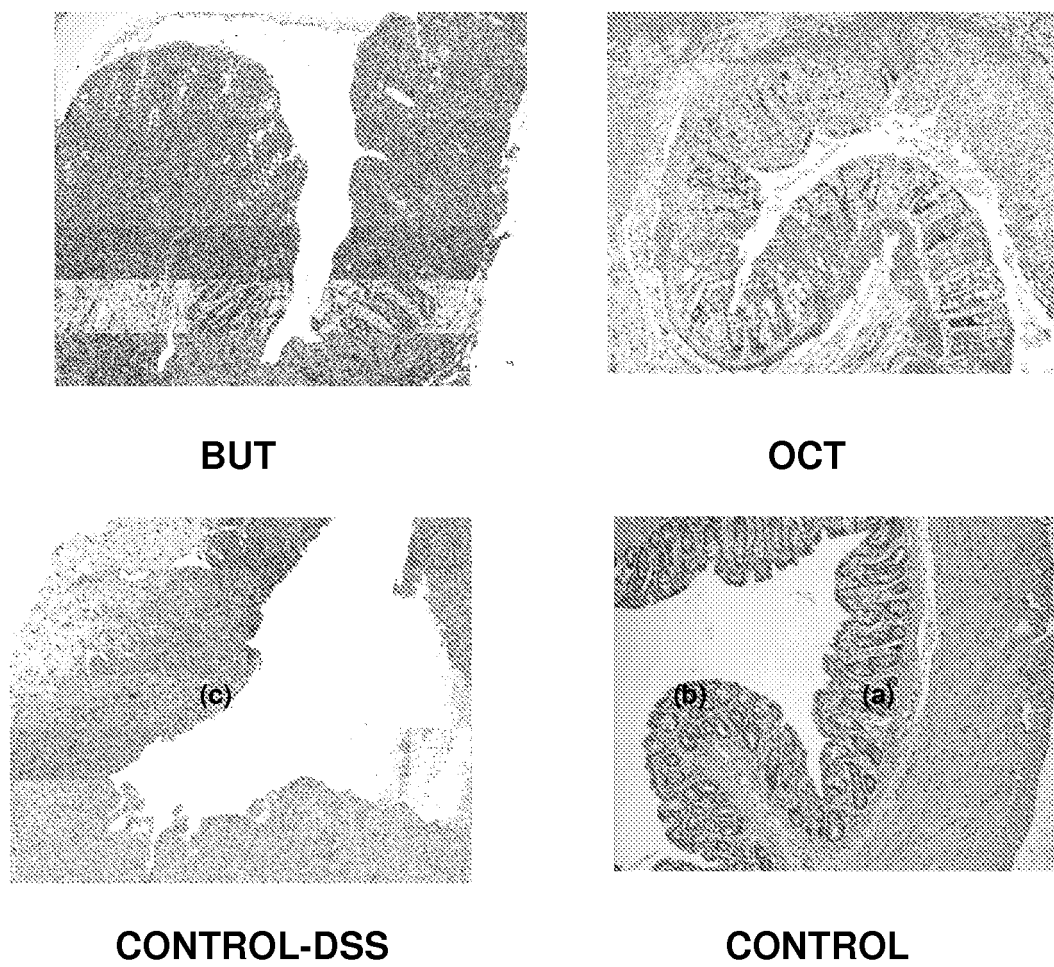


FIG. 7

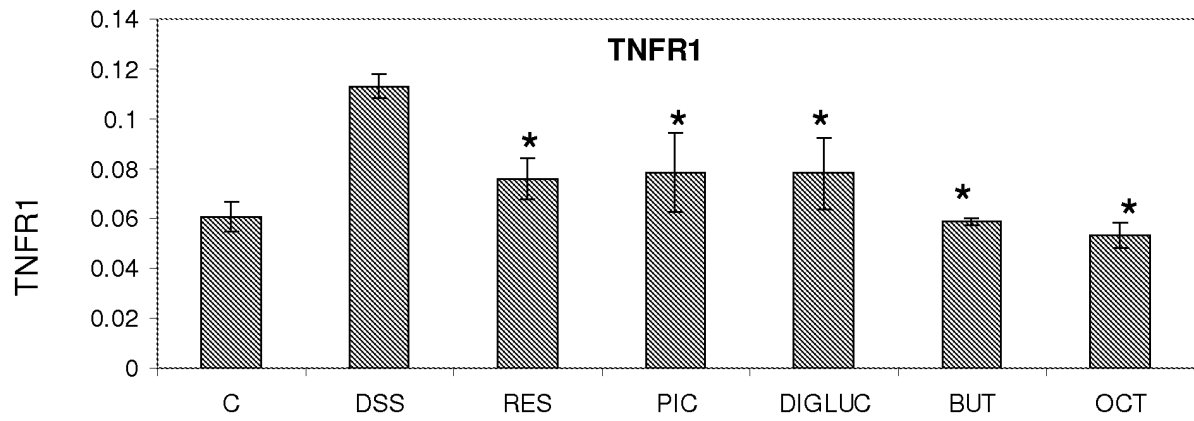


FIG. 8

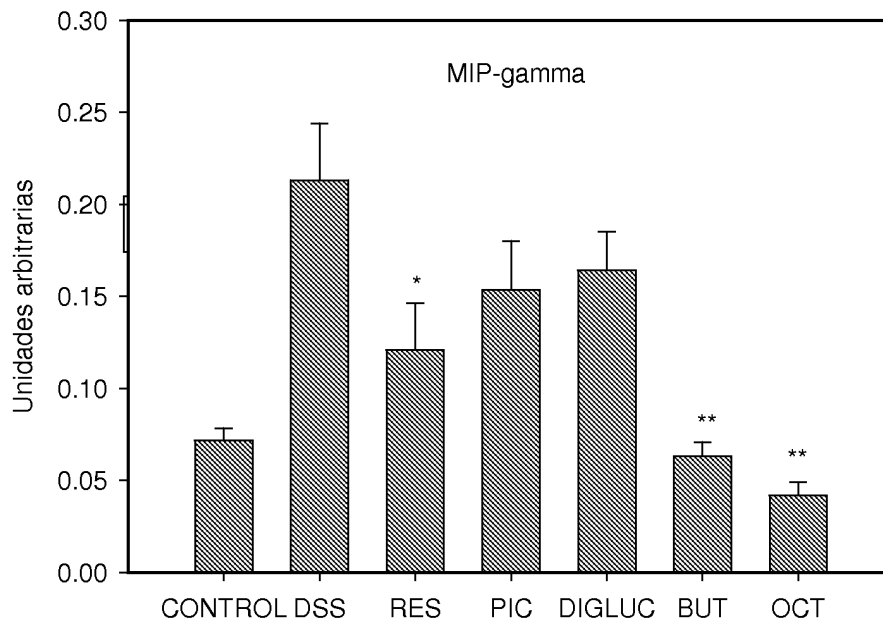


FIG. 9

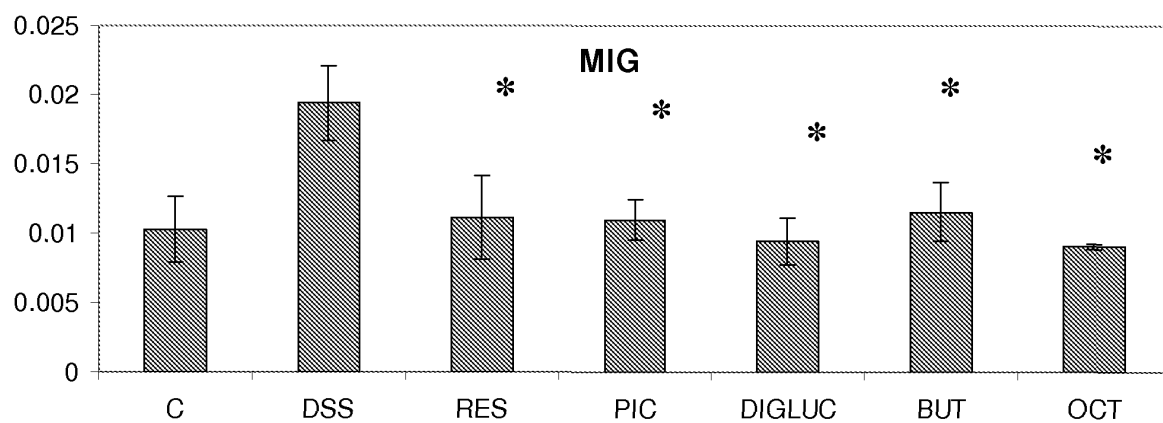


FIG. 10

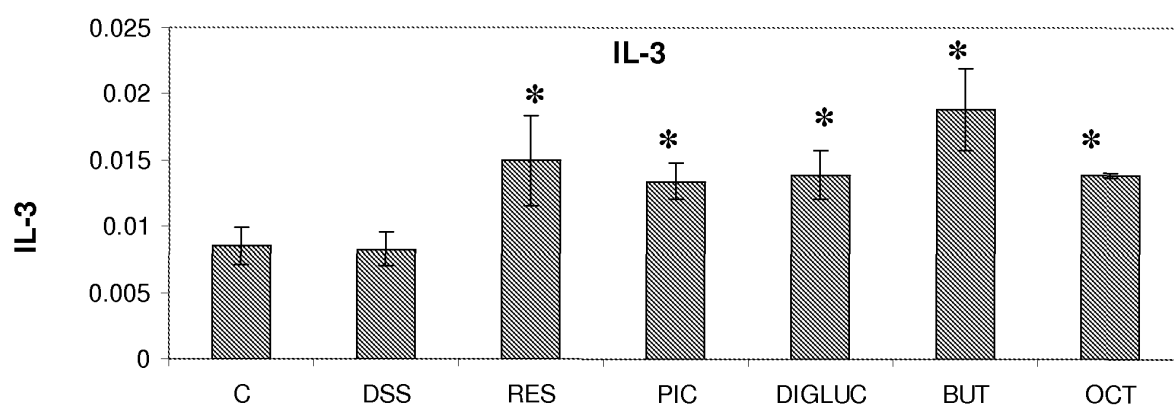


FIG. 11

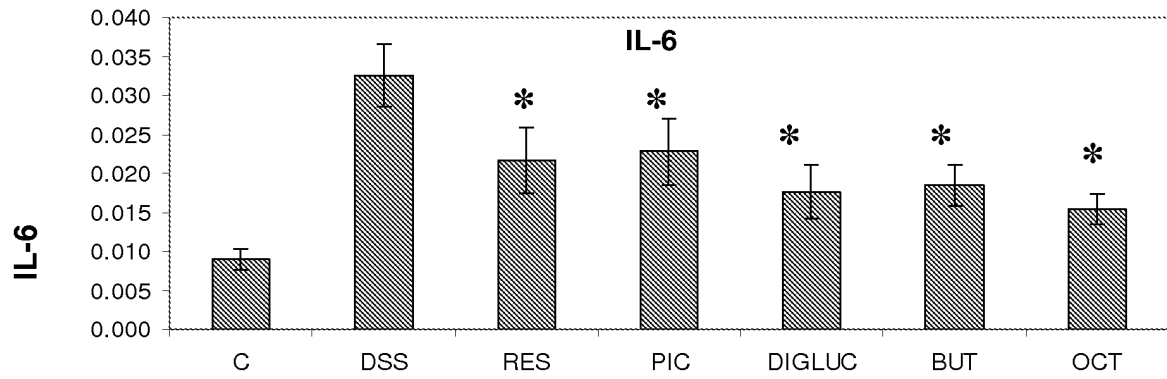


FIG. 12

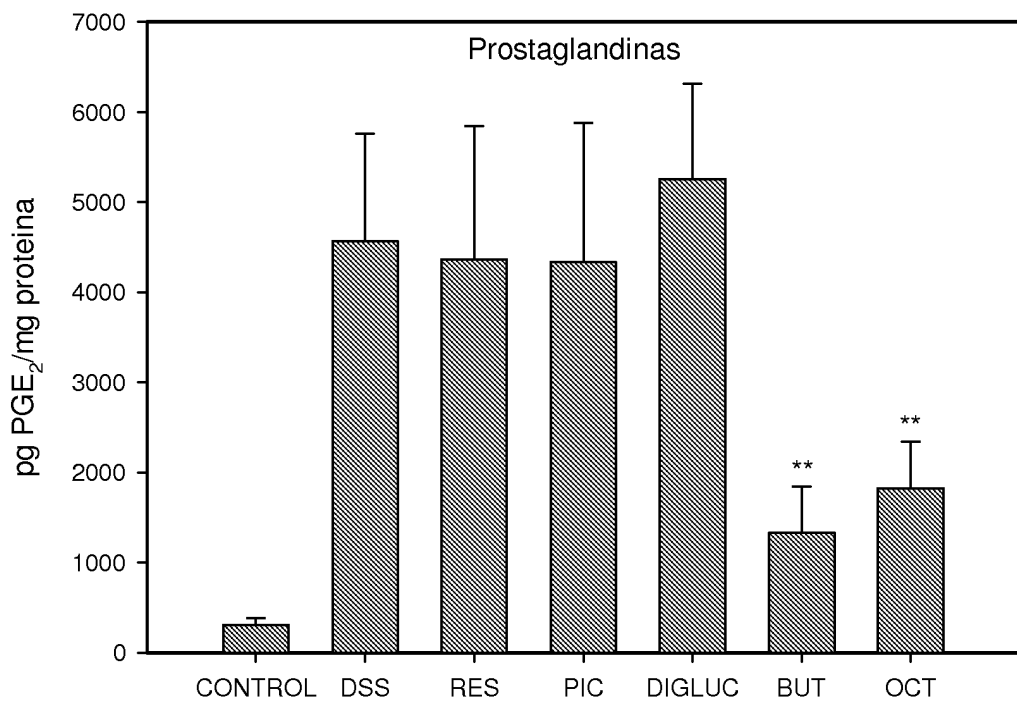


FIG. 13

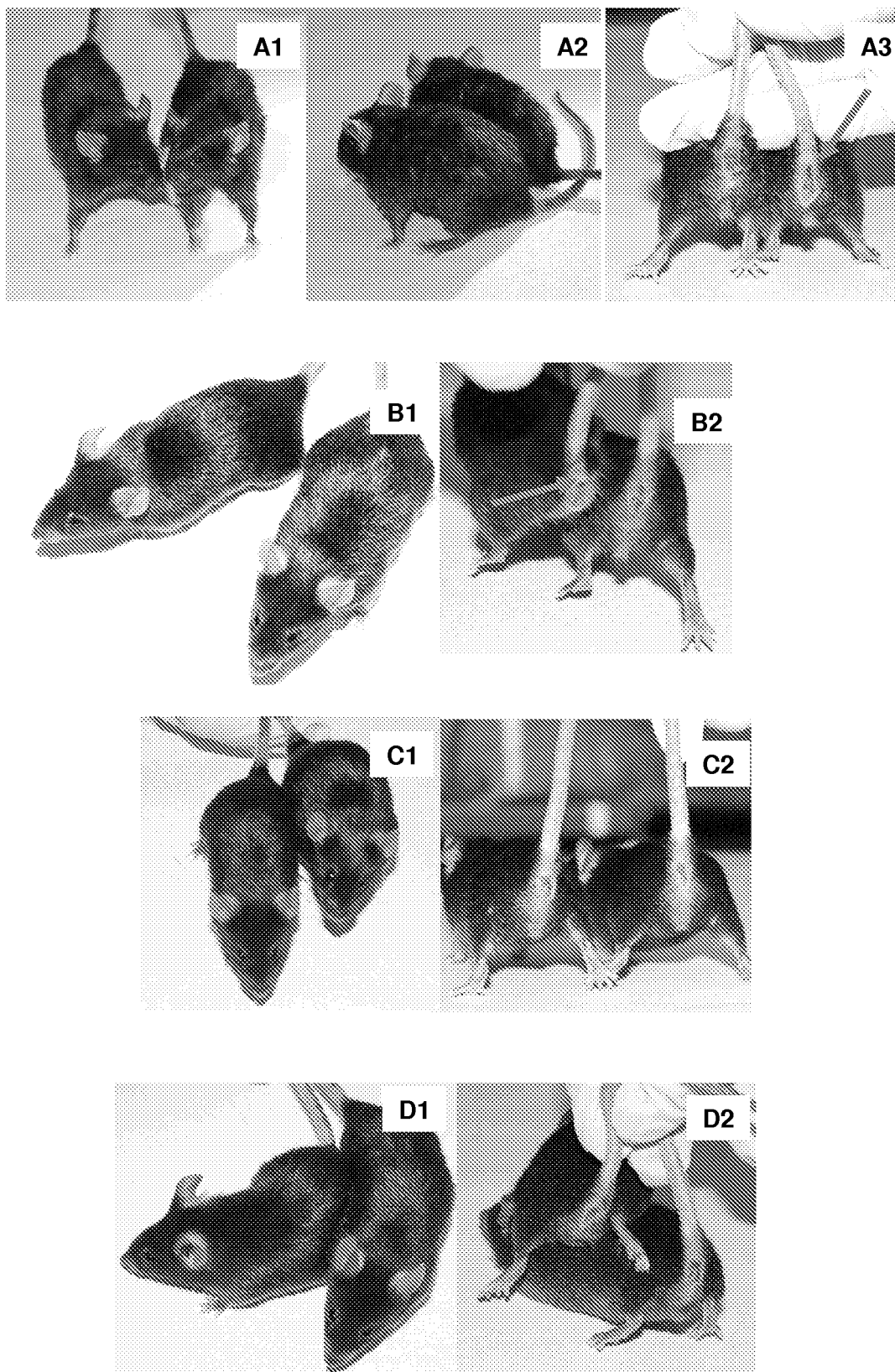


FIG. 14

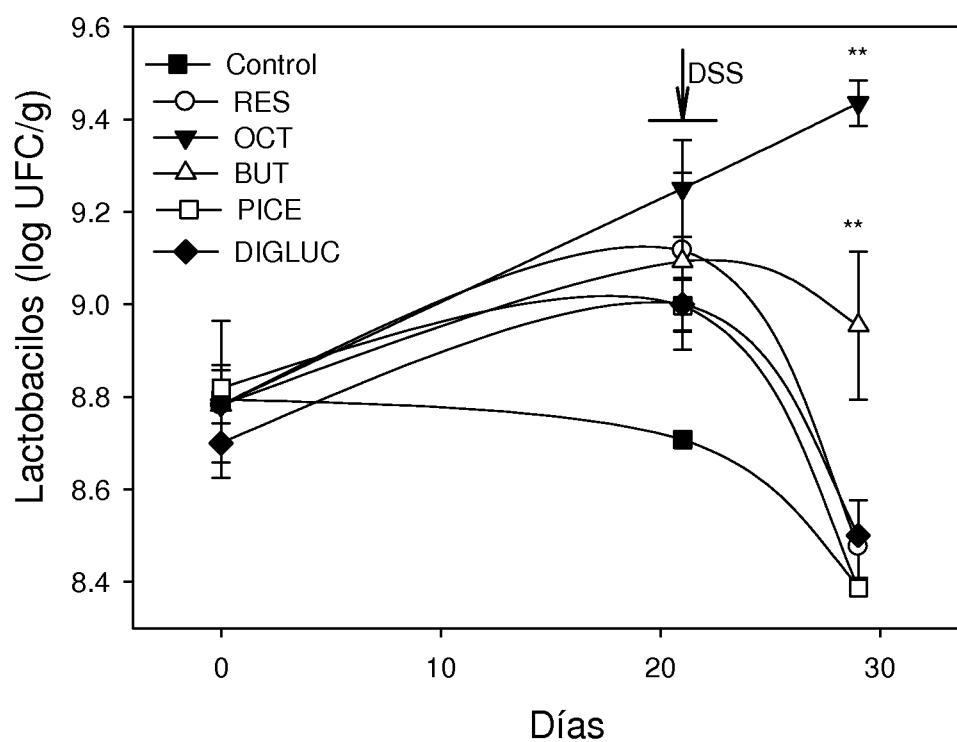


FIG. 15

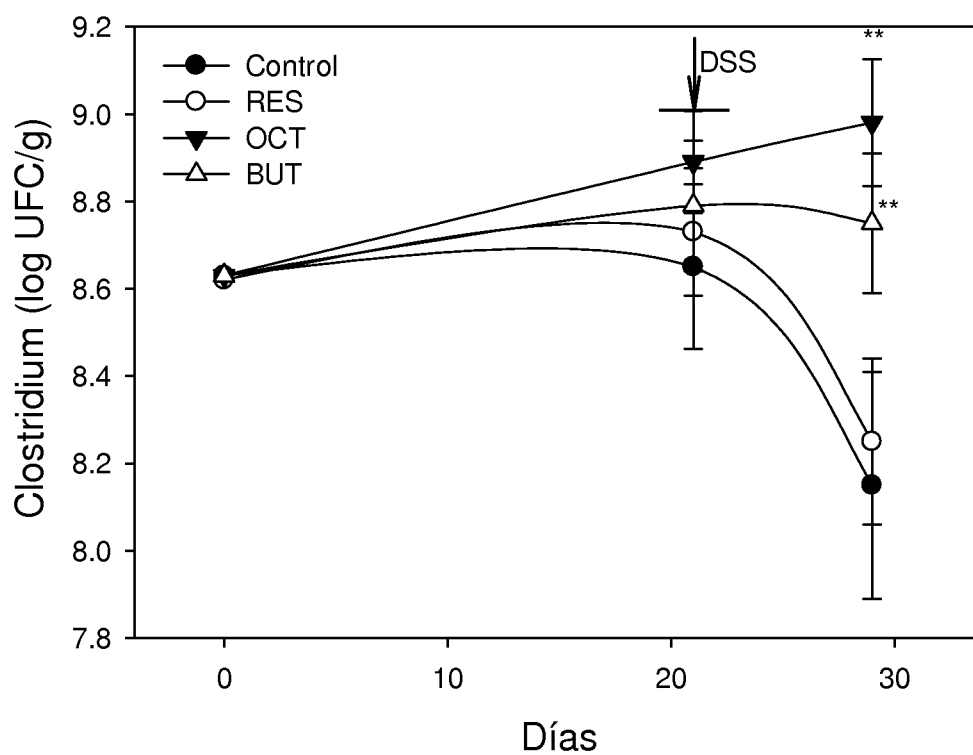


FIG. 16

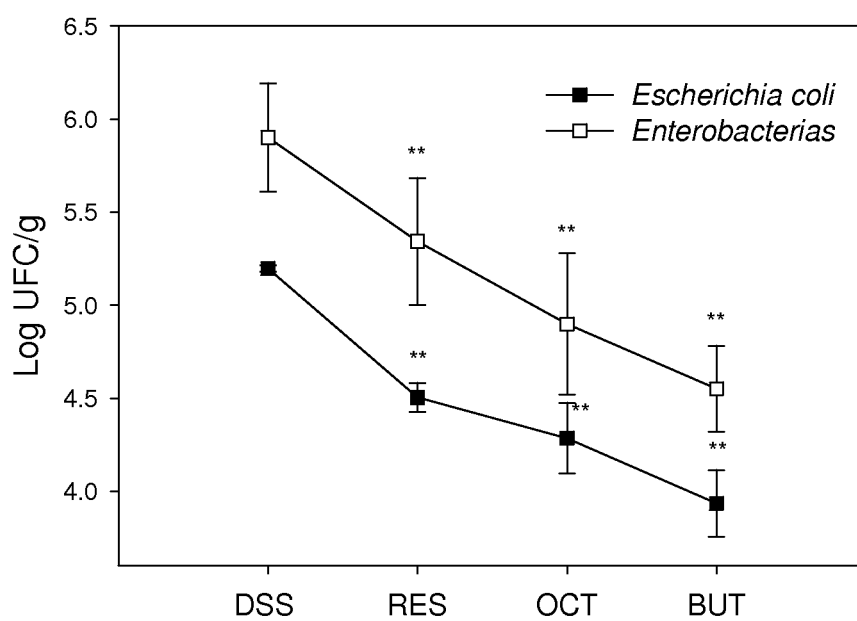


FIG. 17

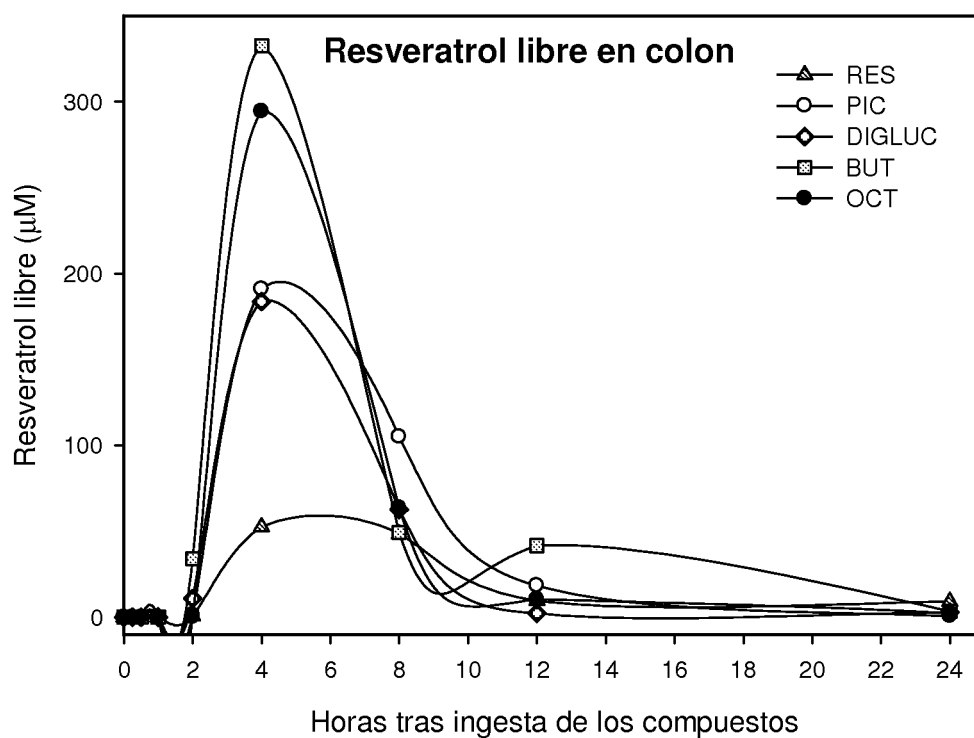


FIG. 18

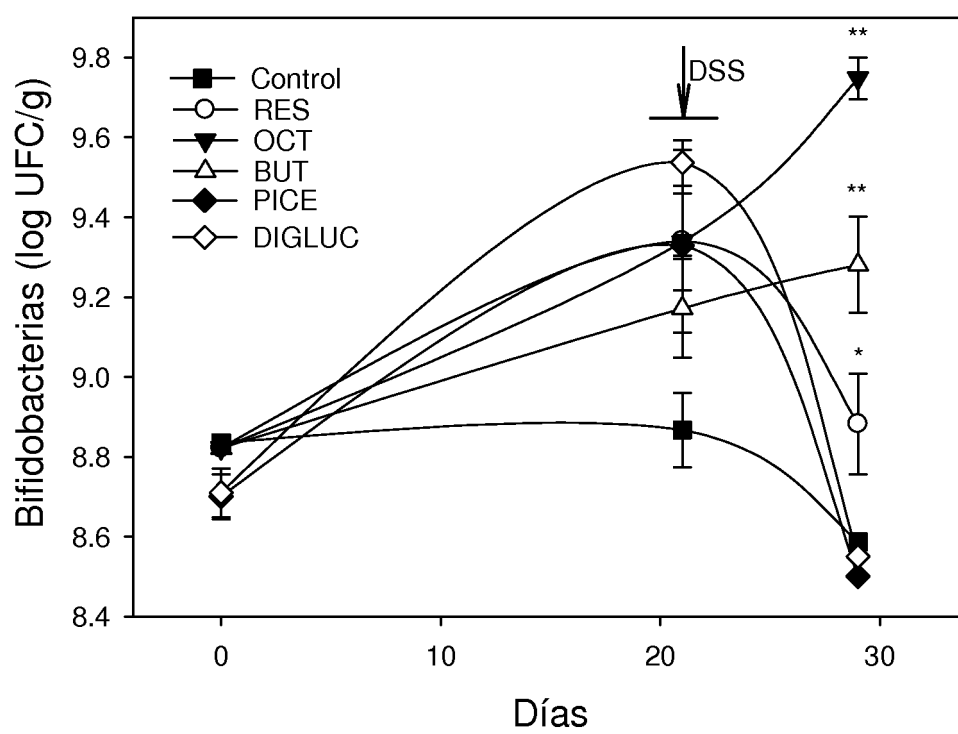


FIG. 19

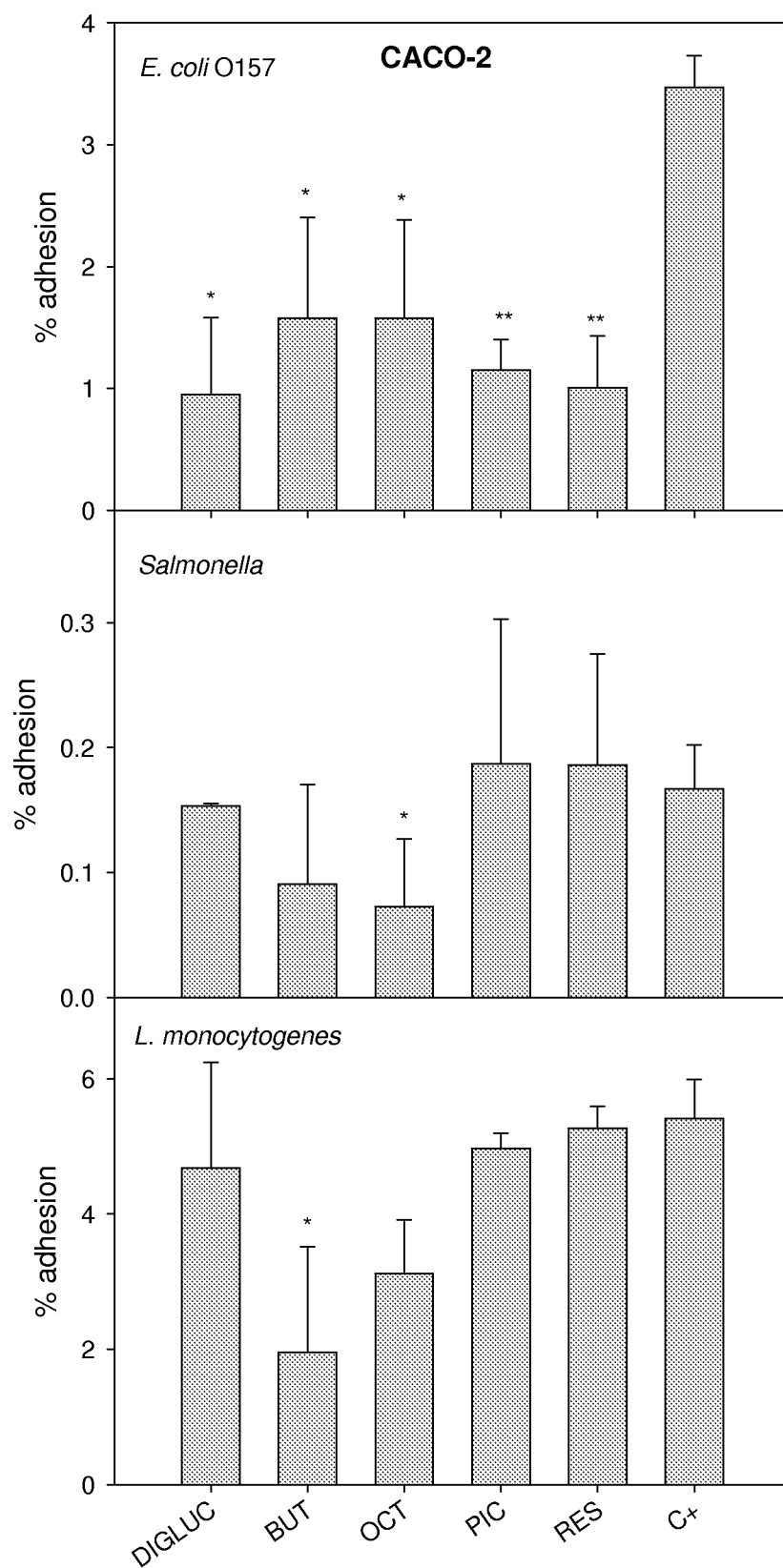


FIG. 20

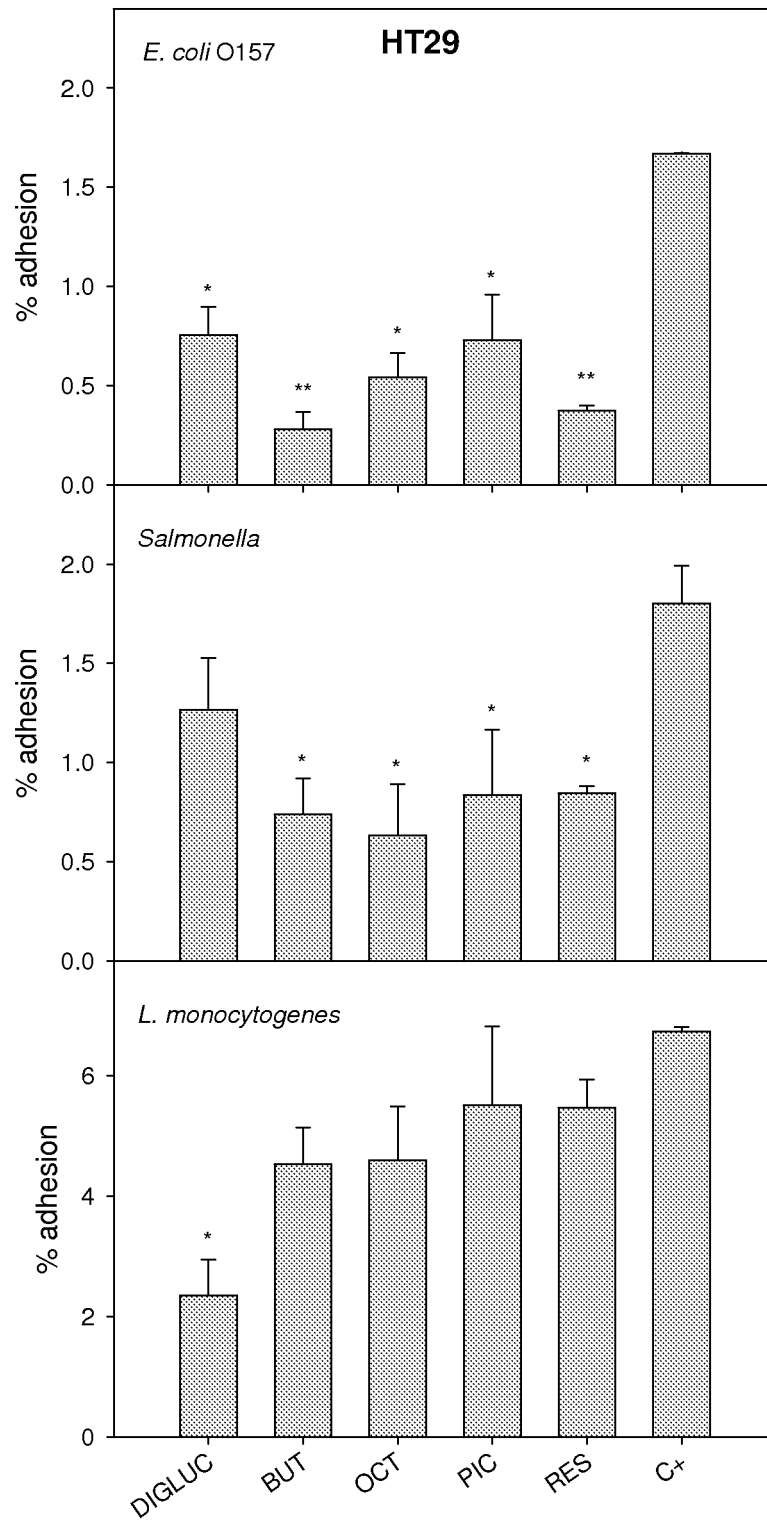


FIG. 21

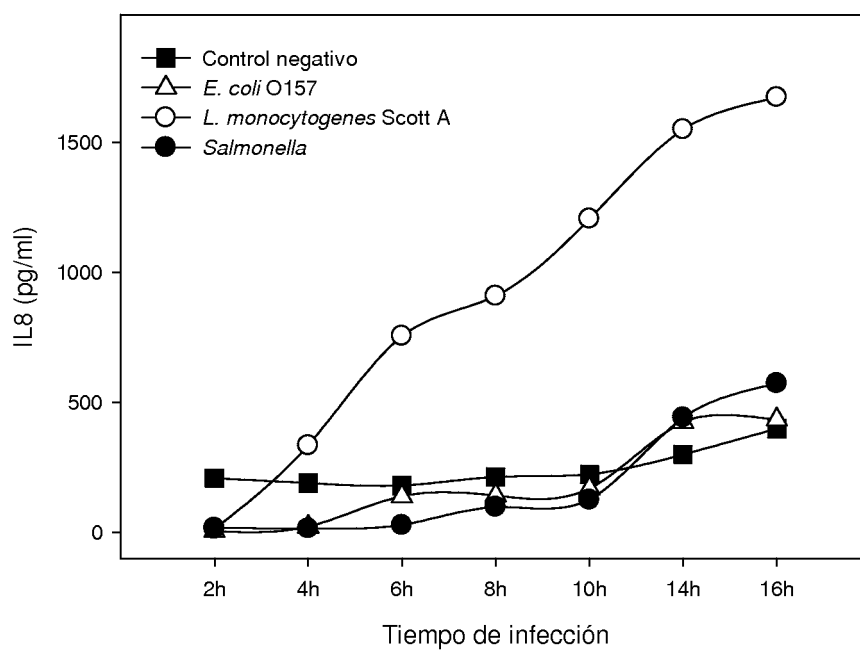


FIG. 22

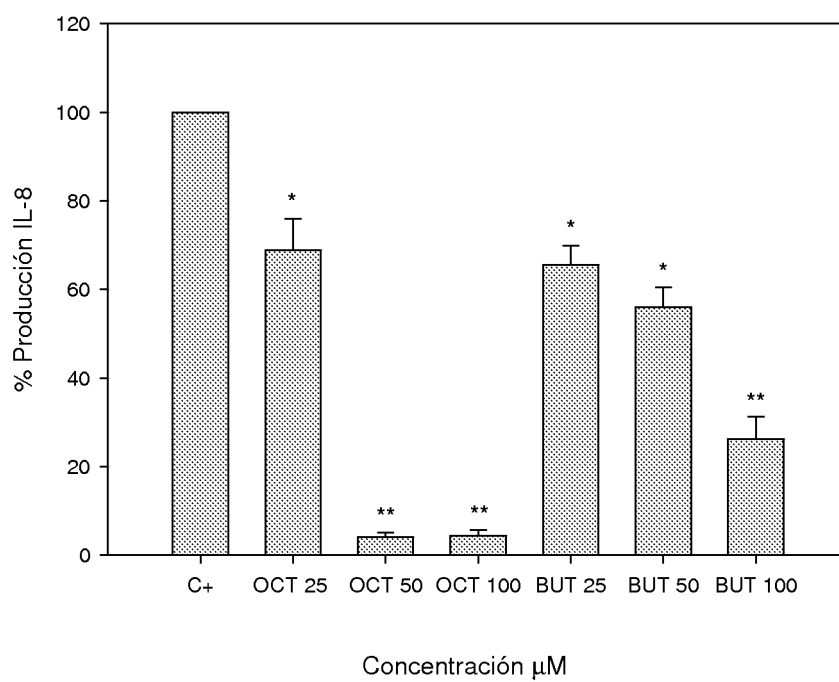


FIG. 23

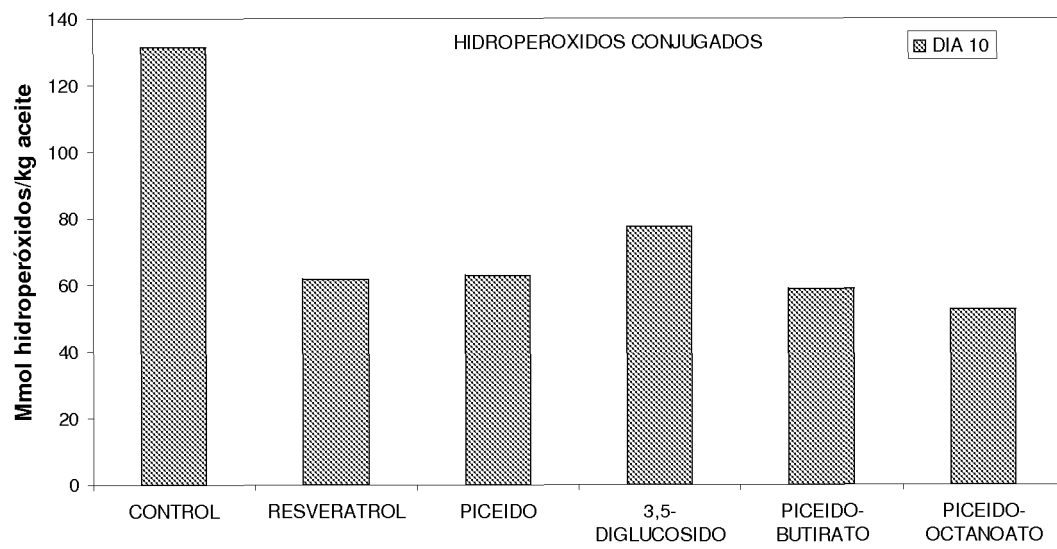


FIG. 24



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931169

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/7024** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6414037 B1 (PEZZUTO et al.) 02.07.2002, columna 2; reivindicaciones.	1-49
A	US 6878751 B1 (DONNELLY et al.) 12.04.2005, columna 2; reivindicaciones.	1-49
A	WO 2007020673 A1 (TUBILUX PHARMAC S.P.A) 22.02.2007, páginas 12,13; reivindicaciones.	1-49

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.04.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-49	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-49	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6414037 B1	02.07.2002
D02	US 6878751 B1	12.04.2005
D03	WO 2007020673 A1	22.02.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a compuestos derivados del resveratrol glucósido de fórmulas I y III, composiciones farmacéuticas que los contienen, procedimiento de obtención y su uso para la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de procesos inflamatorios, donde la enfermedad es la artritis, enfermedades inflamatorias del tracto digestivo y como antioxidantes. Así mismo se reivindica el uso para preparar un complemento alimenticio, alimento funcional o nutracéutico.

Los documentos D1-D3 se refieren a formulaciones farmacéuticas del resveratrol entre ellas de derivados como el resveratrol glucósido y su utilización en el tratamiento de alteraciones inflamatorias del sistema respiratorio (documento D2) y de la piel (documento D1) y en patologías del ojo (documento D3).

Los compuestos de fórmulas I o III no aparecen descritos en ninguno de los documentos citados y por tanto tampoco su utilización en el tratamiento de procesos inflamatorios y como antioxidantes a que se refieren las reivindicaciones de la presente solicitud.

Por lo tanto, se considera que la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-49 de la presente solicitud presenta novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P