



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 746**

51 Int. Cl.:

**C07D 311/62** (2006.01)

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 3/12** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 39/06** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04745437 .6**

96 Fecha de presentación : **25.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1524270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54

Título: **Composición de oligómero de proantocianidina azufrado y procedimiento para su producción.**

30

Prioridad: **26.05.2003 JP 2003-148276**  
**26.01.2004 JP 2004-17113**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.12.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.12.2009**

73

Titular/es: **AMINO UP CHEMICAL Co. Ltd.**  
**High Tech Hill Shin-Ei, 363-32 Shin-Ei**  
**Kiyota-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 004-0839, JP**  
**Usaien Pharmaceutical Co., Ltd.**

72

Inventor/es: **Nonaka, Gen-ichiro;**  
**Sun, Buxiang;**  
**Yuan, Lan;**  
**Nakagawa, Takashi;**  
**Fujii, Hajime y**  
**Surh, Young-Joon**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 330 746 T3

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

# ES 2 330 746 T3

## DESCRIPCIÓN

Composición de oligómero de proantocianidina azufrado y procedimiento para su producción.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un oligómero de proantocianidina azufrado, a una composición del mismo, a un procedimiento de producción del mismo y a la utilización del mismo. Más específicamente, la presente invención proporciona: un procedimiento para producir un oligómero de proantocianidina azufrado mediante la reducción de los pesos moleculares de las proantocianidinas presentes en las plantas hasta un nivel que facilite su absorción a través del intestino de un organismo, una composición alimenticia natural y una composición de fármaco que contiene el oligómero de proantocianidina azufrado obtenido mediante dicho procedimiento, en forma de ingrediente activo y que resulta útil para tratar y prevenir diversas enfermedades relacionadas con el estilo de vida y diversas enfermedades cerebrales causadas por la generación de especies de oxígeno activo o similares.

15

### **Antecedentes de la técnica**

A consecuencia de una ingestión excesiva de grasas debido a cambios de dieta, a cambios ambientales, a un incremento de la exposición a los rayos ultravioleta debido a la destrucción de la capa de ozono, al incremento de los contaminantes ambientales y similares, se está incrementando el número de pacientes con enfermedades denominadas de estilo de vida, tales como la hiperlipemia, la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes y cánceres, y además se está incrementando el número de pacientes con alergia o enfermedades cerebrales tales como demencias. Debido a que progresivamente envejece la población, se teme un incremento del número de pacientes de demencia, síndrome de Alzheimer y similares; se ha informado de que las especies de oxígeno activo generadas en el organismo se encuentran implicadas en estas enfermedades (Bioorganic & Medicinal Chemistry 10:2497-2509, (2002)). Sin embargo, debido a que todavía no se ha desarrollado ninguna tecnología que suprima o controle completamente la generación de especies de oxígeno activo, en la actualidad no existen tecnologías establecidas que resulten suficientemente efectivas y fiables para prevenir o tratar las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, las enfermedades cerebrales y similares.

30

En años recientes se ha focalizado el interés en las sustancias naturales contenidas en las plantas y que muestran actividades fisiológicas, particularmente los compuestos polifenol. Los polifenoles generalmente se encuentran en el té, las verduras, las frutas, las hierbas y similares, y se espera que resulten útiles como agentes de tratamiento o preventivos que no presenten ningún efecto secundario, tal como se ha confirmado a partir de la ingestión de largo plazo como alimento o como alimento favorito.

35

Los compuestos polifenol son metabolitos secundarios de plantas y es conocido que se encuentran universal y abundantemente presentes en el mundo vegetal y que muestran diversas actividades fisiológicas. Los compuestos polifenol han recibido atención en el campo de la farmacología, la química vegetal y similares desde hace mucho tiempo, y recientemente han atraído la atención del campo de los alimentos naturales. Por ejemplo, es conocido que los polifenoles en el té, particularmente las catequinas, muestran una amplia diversidad de actividades fisiológicas, tales como un efecto antimicrobiano, un efecto antivírico, un efecto antimutacional, un efecto antioxidante, un efecto de prevención del incremento de la presión, un efecto de reducción del colesterol sanguíneo, un efecto anticaries, un efecto antialérgico, un efecto de mejora de la flora intestinal y un efecto desodorante.

45

Entre los polifenoles, las proantocianidinas son polifenoles que se encuentran contenidos en una amplia diversidad de plantas. Con el fin de que las proantocianidinas muestren diversas actividades fisiológicas, tal como se ha indicado anteriormente, los compuestos de proantocianidina deben absorberse en el organismo a través del intestino. Sin embargo, es conocido que las proantocianidinas presentan generalmente pesos moleculares del orden de varios miles y de varias decenas de miles. Las sustancias que presentan un peso molecular tan elevado resultan difíciles de absorber a través del intestino. Incluso al absorber las proantocianidinas, en la mayoría de casos no resultan absorbidas en el cuerpo vivo, de manera que no resultan utilizadas por el organismo vivo.

50

**Hong, C.-Y. et al.:** "The inhibitory effect of tannins on lipid peroxidation of rat heart mitochondria", *JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY* vol. 47, n° 2, páginas 138-142, 1995. El documento XP 001087938 da a conocer un derivado benciltioéter de la procianidina B-2 y las propiedades antioxidantes del mismo en las mitocondrias de rata.

55

**KOLODZIEJ, H.:** "Thiolysis of birch bark procyanidins: structural dependence in formation of 2,3-cis-3,4-cis-flavan-4-benzylthioethers from procyanidins", *PHYTOCHEMISTRY* vol. 29, n° 5 páginas 1671-1674, 1990. El documento XP 002980976 da a conocer composiciones que comprenden benciltioéteres de proantocianidinas aisladas a partir de corteza de abedul.

60

**HEMINGWAY, R.W. et al.:** "Heterogeneity of interflavanoid bond location in loblolly pine bark procyanidins", *PHYTOCHEMISTRY* vol. 22, n° 1, páginas 275-281, 1983. El documento XP 002980977 da a conocer composiciones que comprenden tiofenoléteres de proantocianidinas aisladas a partir de corteza de pino Taeda.

65

5 **FOO, L.Y. et al.:** "Procyanidin dimers and trimers from douglas fir inner bark", *PHYTOCHEMISTRY* vol. 28, nº 6, páginas 1743-1747, 1989. El documento XP nº 002980978 da a conocer composiciones que comprenden benciltioéteres de proantocianidinas aisladas a partir de corteza interior de abeto de Douglas.

10 **GEISS, F. et al.:** "Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark", *PHYTOCHEMISTRY* vol. 39, nº 3, páginas 635-643, 1995. El documento XP 002980979 da a conocer composiciones que comprenden benciltioéteres de proantocianidinas aisladas a partir de corteza de *Byrsonima crassifolia*.

15 **TANAKA, T. et al.:** "Chemical Evidence for the De-astringency (Insolubilization of Tannins) of Persimmon Fruit", *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS.* vol. 20, páginas 3013-3022, 1994. El documento XP 002980980 da a conocer composiciones que comprenden derivados hidroxietilsulfanilo de proantocianidinas aisladas a partir de fruta de Persimon.

20 **SCHOLZ, E. et al.:** "Proanthocyanidins from *Krameria triandra* Root", *PLANTA MEDICA* vol. 55, nº 4, páginas 379-384, 1989. El documento XP 002957320 da a conocer composiciones que comprenden benciltioéteres de proantocianidinas aisladas a partir de raíz de *Krameria triandra*.

El documento WO 03 024951 A1 da a conocer composiciones que comprenden cisteiniléteres de proantocianidinas aisladas a partir de la uva.

25 **TORRES, J.L. et al.:** "Cysteinyl-flavan-3-ol Conjugates from Grape Procyanidins. Antioxidant and Antiproliferative Properties", *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* vol. 10, páginas 2497-2509, 2002. El documento XP 002980981 da a conocer composiciones que comprenden cisteiniléteres, 2-aminoetiltioéteres y 2-hidroxietil-tioéteres de proantocianidinas aisladas a partir de la uva.

30 Los presentes inventores han descubierto que un polifenol extraído de trigo sarraceno presenta actividades de mejora del metabolismo lipídico, la función cerebral, etc. y presentaron una solicitud de patente (JP10-218786 A) basada en estos descubrimientos. El principio activo del polifenol es un polímero de proantocianidina, y su bioabsorbilidad se ha considerado como poco suficiente.

### 30 **Exposición de la invención**

35 La presente invención proporciona un medicamento y un alimento natural que resultan útiles para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con el estilo de vida y enfermedades cerebrales presumiblemente causadas por especies de oxígeno activo mediante la conversión de un compuesto proantocianidina que presenta una bioabsorbilidad reducida a través del intestino, en una forma de compuesto fácilmente absorbida en el cuerpo vivo y que permite que se manifiesten por completo diversos efectos fisiológicos del compuesto proantocianidina, de manera que puede incrementarse la actividad antioxidante del organismo vivo.

40 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que un oligómero de proantocianidina azufrado que presenta un peso molecular reducido, obtenido mediante una reacción entre una planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma y un compuesto que contiene SH, puede absorberse fácilmente en el cuerpo vivo a través del intestino y mostrar diversas actividades fisiológicas tras la ingestión oral y, basándose en este resultado, han completado la presente invención.

45 Es decir, la presente invención se refiere a los oligómeros de proantocianidina azufrados y composiciones de los mismos siguientes, que resultan útiles como composiciones farmacéuticas y composiciones alimenticias naturales, así como a procedimientos de producción de los mismos.

50 1. Una composición que comprende un oligómero de proantocianidina azufrado como componente principal, en el que el oligómero se obtiene mediante concentración y secado de una solución de reacción preparada mediante reacción de una planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma, con un compuesto que contiene grupos SH, que es por lo menos un compuesto seleccionado de entre un grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen grupos SH y sales de los mismos.

55 2. La composición de oligómero de proantocianidina azufrado según 1, en la que el oligómero es uno seleccionado de entre un dímero a pentámero de la proantocianidina.

60 3. La composición de oligómero de proantocianidina azufrado según 1, en la que la planta que contiene proantocianidinas es una o más seleccionada de entre un grupo constituido por verduras, frutas, té, hierbas, especias, maderas y cortezas.

4. La composición según cualquiera de 1 a 3, que es una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

65 5. La composición según cualquiera de 1 a 3, que es una composición farmacéutica para prevenir el envejecimiento.

6. La composición según cualquiera de 1 a 3, que es una composición alimenticia natural para aliviar y/o prevenir las enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

## ES 2 330 746 T3

7. La composición según cualquiera de 1 a 3, que es una composición alimenticia natural para prevenir el envejecimiento.

8. Un oligómero de proantocianidina azufrado, que se obtiene mediante fraccionamiento de componentes que contienen un oligómero de proantocianidina azufrado preparado mediante la reacción de una planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma con un compuesto que contiene uno o más grupos SH.

9. El oligómero de proantocianidina azufrado según 8, en el que el oligómero es uno seleccionado de entre un dímero a pentámero de proantocianidina.

10. Un procedimiento de producción de una composición de oligómero de proantocianidina azufrado, en el que se hace reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma, con un compuesto que contiene uno o más grupos SH bajo condiciones ácidas y la solución de reacción se concentra y se seca, en el que el compuesto que contiene uno o más grupos SH es por lo menos uno seleccionado de entre un grupo que consiste de cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen uno o más grupos SH y sales de los mismos.

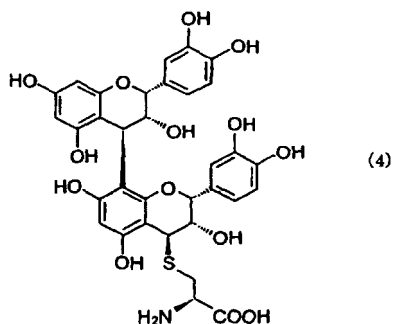
11. Un procedimiento de producción de una composición de oligómero de proantocianidina azufrado, en el que se hace reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma, con un compuesto que contiene uno o más grupos SH bajo condiciones ácidas y la solución de reacción se concentra y se fracciona, en el que el compuesto que contiene uno o más grupos SH es por lo menos un grupo seleccionado de entre un grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen uno o más grupos SH y sales de los mismos.

12. El procedimiento de producción según 10 u 11, en el que la planta que contiene proantocianidinas es una o más seleccionada de entre un grupo constituido por verduras, frutas, té, hierbas, especias, maderas y cortezas.

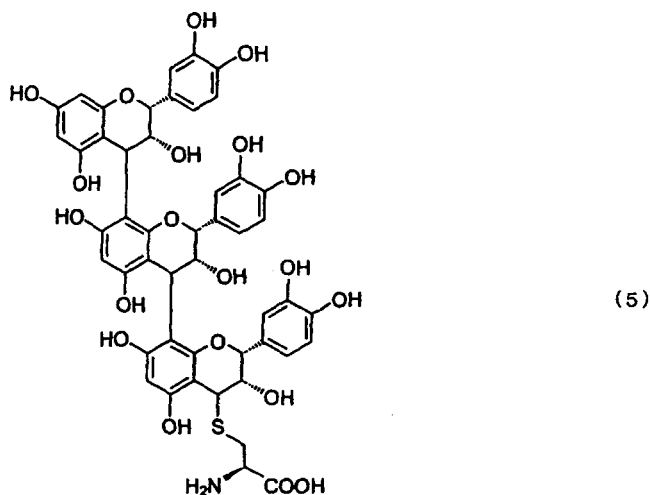
13. El procedimiento de producción según 10 u 11, en el que las condiciones ácidas se obtienen mediante la utilización de uno o ambos de entre un ácido inorgánico y un ácido orgánico.

14. El procedimiento de producción según 13, en el que se utiliza por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico.

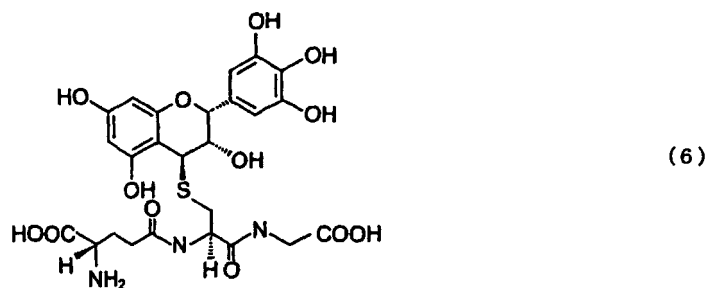
15. Un compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (4).



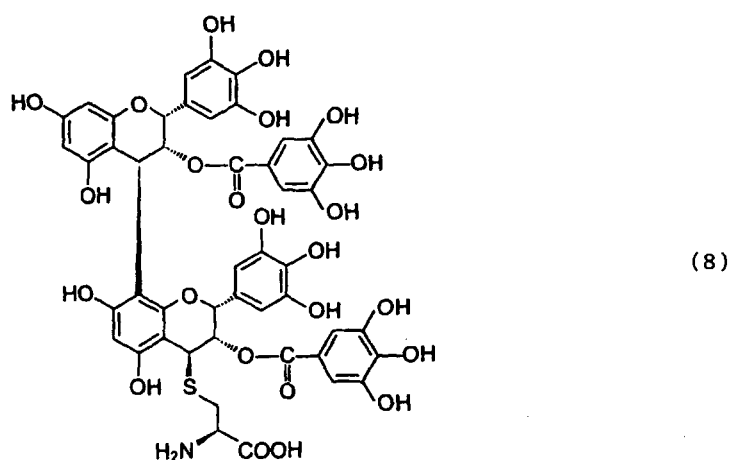
16. Un compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (5).



17. Un compuesto representado por la fórmula (6).



18. Un compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (8).



#### Breve descripción de los dibujos

40 Las figuras 1A y 1B son gráficos que ilustran los niveles séricos de LPO en ratones en los que se ha administrado una composición de oligómero de proantocianidina azufrado según el Ejemplo 1 de la presente invención (polvos antes del fraccionamiento; Sustancia 1) y la materia prima de la misma (extracto polifenol de semillas de uva; Sustancia Comparativa 1). La figura 1A proporciona los resultados de los grupos en los que se había administrado una dosis reducida, y la figura 1B proporciona los resultados de los grupos que habían recibido una dosis elevada.

45 Las figuras 2A, 2B y 2C son gráficos que ilustran los niveles de LPO en hígado (figura 2A), riñón (figura 2B) y cerebro (figura 2C) de ratones en los que se ha administrado la composición de oligómero de proantocianidina azufrado según el Ejemplo 1 de la presente invención (Sustancia 1) y la materia prima de la misma (Sustancia Comparativa 1), respectivamente.

50 La figura 3A se refiere a personas con niveles iniciales de LPO normales, y la figura 3B se refiere a personas con niveles iniciales de LPO anormales, ilustrando ambas figuras niveles séricos de LPO en seres humanos en los que se ha administrado la composición inventiva según el Ejemplo 1 (Sustancia 1) y la materia prima según el Ejemplo 1 (Sustancia Comparativa 1).

55 La figura 4A se refiere a personas con niveles iniciales de SOD normales, y la figura 4B se refiere a personas con niveles iniciales de SOD anormales, ilustrando ambas figuras niveles séricos de SOD en seres humanos en los que se ha administrado la composición inventiva según el Ejemplo 1 (Sustancia 1) y la materia prima según el Ejemplo 1 (Sustancia Comparativa 1).

60 La figura 5 es un gráfico que ilustra los efectos de inhibición de la muerte de las células PC-12 con respecto a los  $\beta$ -amiloides, de la Sustancia inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1 según el Ejemplo 1.

65 Las figuras 6A y 6B son una fotografía y un gráfico, respectivamente, que muestran los efectos de inhibición de la reducción del potencial de la membrana mitocondrial con respecto a los  $\beta$ -amiloides, de la Sustancia 1 y de la Sustancia Comparativa 1 según el Ejemplo 1.

## ES 2 330 746 T3

Las figuras 7A y 7B son una fotografía y un gráfico, respectivamente, que muestran los efectos de reducción de la acumulación de las especies de oxígeno activo en las células PC-12 con respecto a los  $\beta$ -amiloides, de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

5 La figura 8 es un gráfico que ilustra los efectos antioxidantes intracelulares de  $\beta$ -amiloides de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

La figura 9 es un gráfico que ilustra los efectos inhibitorios de la oxidación transmembranal con respecto a los  $\beta$ -amiloides de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

10 La figura 10 es un gráfico que ilustra los efectos de reducir el nivel en ayuno de glucosa en sangre en ratones con diabetes inducida con STZ, con respecto a la Sustancia Inventiva 1 y a la Sustancia Comparativa 1.

15 La figura 11 es un gráfico que ilustra los efectos de reducción del nivel de glucosa en orina en ratones con diabetes inducida con STZ, con respecto a la Sustancia Inventiva 1 y la Sustancia Comparativa 1.

La figura 12 es un gráfico que ilustra los efectos de reducir el nivel de proteínas en orina en ratones con diabetes inducida con STZ, de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

20 La figura 13 es un gráfico que ilustra los efectos de reducción del nivel sanguíneo de PLO en ratones con diabetes inducida con STZ, de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

La figura 14 es un gráfico que ilustra los efectos de elevar el nivel sanguíneo de TEAC (capacidad antioxidante) en ratones con diabetes inducida con STZ, de la Sustancia Inventiva 1 y de la Sustancia Comparativa 1.

25 La figura 15 es un gráfico que ilustra los efectos de elevar el nivel de polifenoles en sangre en modelos de rata con disfunción renal aguda inducida con bromato de potasio, con respecto a la Sustancia Inventiva 1.

30 La figura 16 es un gráfico que ilustra los efectos de elevar la actividad antioxidante sanguínea (TEAC) en modelos de rata con disfunción renal aguda inducida con bromato de potasio, con respecto a la Sustancia Inventiva 1.

La figura 17 es un gráfico que ilustra los efectos de inhibir el incremento del nivel de peróxidos lípidos en sangre en modelos de rata con disfunción renal inducida con bromato de potasio, con respecto a la Sustancia Inventiva 1.

35 La figura 18 es un gráfico que ilustra los efectos de inhibir la elevación de los niveles de nitrógeno de urea en sangre en modelos de rata con disfunción renal aguda inducida con bromato de potasio, con respecto a la Sustancia Inventiva 1.

40 La figura 19 es un gráfico que ilustra los efectos de inhibir la elevación de los niveles de creatinina en sangre en modelos de rata con disfunción renal aguda inducida con bromato de potasio, con respecto a la Sustancia Inventiva 1.

### Descripción detallada de la invención

45 El oligómero azufrado de la presente invención habitualmente comprende un dímero a pentámero de proantocianidina y habitualmente presenta un peso molecular de 1.500 o inferior.

50 Resulta preferido que la reacción en la planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma con el compuesto que contiene uno o más grupos SH se lleve a cabo bajo condiciones ácidas. Se utilizan ácidos adecuados seleccionados de entre ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico, y de entre ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico, a concentraciones de entre aproximadamente 0,1 N y 1,0 N, preferentemente de 0,5 N.

55 El término "proantocianidina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a polímeros de catequina, entre los ejemplos específicos de los cuales se incluyen catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, galocatequina y galato de galocatequina, así como los que incluyen los mismos como unidades constitucionales.

60 Entre las plantas que contienen proantocianidinas se incluyen una amplia diversidad de plantas, incluyendo: verduras y frutas, tales como persimon japonés, pera, uva, fresa, plátano, aguacate, arándano rojo, raíz de loto y trigo sarraceno; té en general, tales como té verde, té negro y té de oolong; hierbas y especias; y maderas y cortezas de pino. Preferentemente se utilizan las plantas y los extractos (incluyendo zumo exprimido, zumo de frutas y zumos vegetales) que contienen proantocianidina.

65 Un compuesto que contiene uno o más grupos SH utilizado en la presente invención es por lo menos uno seleccionado de entre el grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen SH y sales de los mismos. Considerando que el oligómero de proantocianidina azufrado de la presente invención se utiliza en composiciones alimenticias y farmacéuticas, los compuestos que contienen uno o más grupos SH utilizados en la misma preferentemente son los que se utilizan aceptablemente en alimentos y compuestos farmacéuticos.

## ES 2 330 746 T3

La reacción entre la planta que contiene proantocianidinas o un extracto de la misma con el compuesto que contiene uno o más grupos SH se lleva a cabo a una temperatura de entre la temperatura ambiente y 80°C, preferentemente a una temperatura de entre 40°C y 60°C durante un periodo de entre unas cuantas horas y 1 semana, preferentemente de entre 24 y 48 horas.

5

Entre los ejemplos del solvente utilizado en la reacción se incluyen agua, metanol, etanol y una mezcla de dos o más de los mismos. Sin embargo, en la aplicación a alimentos y compuestos farmacéuticos, resultan preferidos el agua y el etanol.

10

Tras la reacción, se separa el residuo mediante filtración y se concentra el filtrado. A continuación, se purifica el concentrado de una manera convencional.

15

Es decir, puede llevarse a cabo la purificación del concentrado sometiendo el extracto obtenido a tratamiento de membrana (ultrafiltración, ósmosis inversa, etc.) o mediante tratamiento del concentrado con un adsorbente. Entre los adsorbentes que pueden utilizarse se incluyen adsorbentes de estireno-divinilbenceno, adsorbentes de ácido metacrílico, polímeros de vinilo hidrofílico, gel de dextrano modificado, gel de poliácridamida, gel de sílice de fase reversa y resina de intercambio iónico. Al utilizar un adsorbente tal como los indicados, la fracción adsorbida sobre el adsorbente (en lo sucesivo denominada "fracciones adsorbidas") contiene un compuesto polifenol (oligómero de proantocianidina azufrado) que presenta un peso molecular que se ha reducido mediante la reacción con el compuesto que contiene uno o más grupos SH. Mediante la elución de la fracción adsorbida con hidroalcohol, alcohol, acetona o similar, pueden obtenerse componentes que presentan diversos pesos moleculares.

20

25

Los valores medidos mediante HPLC de fase normal y RMN confirman que los oligómeros de proantocianidina azufrada obtenidos de esta manera son dímeros a pentámeros de proantocianidina representados por la fórmula (9) general siguiente.

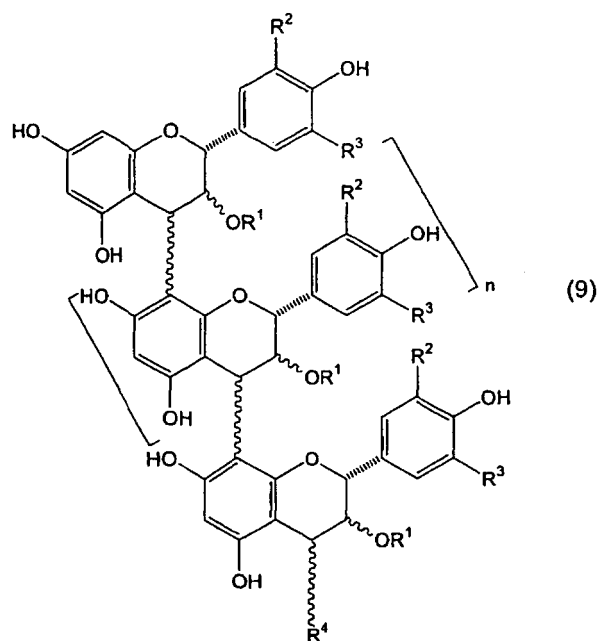
30

35

40

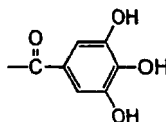
45

50



en la que n es 0 o un número entero entre 1 y 3, R<sup>1</sup> representa un átomo de hidrógeno o un grupo galilo, representado por la fórmula siguiente:

55



60

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representan independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R<sup>4</sup> representa cisteína, cistina, glutatión o un residuo péptido que contiene uno o más grupos SH.

65

El oligómero de proantocianidina azufrado resulta fácilmente absorbido en el cuerpo vivo a través del intestino debido al peso molecular, de tan sólo 1.500 o inferior, y muestra un potente efecto secuestrador de radicales DPPH, un efecto de incremento de la actividad de tipo SOD, un efecto de prevención de la peroxidación del lípido P450, un efecto protector frente al estrés oxidativo del FNT, un efecto protector de las células nerviosas frente a la muerte

celular oxidativa inducida por los  $\beta$ -amiloides, un efecto de prevención de la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y similares. El oligómero presenta una capacidad antioxidante relativamente elevada en comparación con otros materiales polifenólicos. Los datos que se consideran basados en los efectos antioxidantes también se obtienen en ensayos de seguimiento de índice de antioxidación en seres humanos.

5 Por lo tanto, una composición que contenga el oligómero de proantocianidina azufrado de la presente invención como ingrediente activo no sólo presenta un efecto preventivo frente a la producción de peróxidos lípidos en un organismo, sino que también resulta efectivo para enfermedades causadas por el daño oxidativo debido a la generación de oxígeno activo. De acuerdo con lo anterior, la composición presenta efectos preventivos frente a disfunciones de  
10 diversos órganos y frente al envejecimiento causados por peróxidos lípidos o por la producción de oxígeno activo, y diversas enfermedades causadas por los peróxidos lípidos o por la producción de oxígeno activo se tratan y/o se previenen efectivamente mediante la utilización de la composición. Además, la composición se considera que resulta efectiva para suprimir, prevenir o tratar las disfunciones cerebrales, tales como la demencia, que se presume están causadas por el envejecimiento del cerebro. Simultáneamente, mediante la mejora de la función cerebral, también se  
15 esperan efectos de mejora de la función del aprendizaje, reducción de la dispersión, alivio del insomnio, recuperación de la calma y similares. Por lo tanto, la composición que contiene el oligómero de proantocianidina azufrado de la presente invención como ingrediente activo puede utilizarse como composición farmacéutica y como composición alimenticia natural.

20 La composición que contiene el oligómero de proantocianidina azufrado de la presente invención como ingrediente activo no muestra toxicidad en absoluto y puede utilizarse con bastante seguridad. La composición se utiliza oral o parenteralmente. Al utilizar la composición oralmente, la dosis de composición, que puede variar dependiendo de la edad, peso corporal, síntomas, efecto terapéutico diana, procedimiento de administración y similares, habitualmente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 100 y 2.000 mg por dosis para un adulto. Al administrar  
25 la composición de la presente invención oralmente, generalmente la composición se utiliza en la forma de tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, jarabe y similares. Al administrar parenteralmente la composición de la presente invención, la composición se utiliza en la forma de inyecciones, linimentos y similares. Al formular la composición de la presente invención en gránulos, tabletas o jarabe, pueden utilizarse materiales auxiliares apropiados (almidones, dextrina, edulcorantes, pigmentos, fragancias) según resulte necesario.

### 30 **Mejor modo de poner en práctica la invención**

A continuación en la presente memoria, la presente invención se describe con mayor detalle mediante ejemplos y ejemplos de ensayo de la composición de oligómero de proantocianidina azufrado de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### 40 *Producción de oligómero de proantocianidina azufrado derivada de semillas de uva*

###### (1) *Extracción de polifenol de semillas de uva*

Se extrajeron 8 kg de semillas de uva secas con 30 l de metanol al 80% a temperatura ambiente durante 3 días y se separó el residuo mediante filtración. A continuación, el filtrado se concentró bajo presión reducida para obtener una  
45 solución concentrada, que se purificó bajo las condiciones siguientes.

###### *Condiciones de purificación*

Se cargó la cantidad total de la solución concentrada en una columna de DIAION HP-20 (fabricada por Mitsubishi  
50 Chemical Corporation) de 200 mm $\varnothing$  x 30 cm (aproximadamente 25 l) y se lavó con 100 l de agua. A continuación, se recuperó un eluido obtenido utilizando 50 l de metanol, se concentró bajo presión reducida y se liofilizó, obteniendo 456 g de una composición en polvo.

###### (2) *Reacción de reducción del peso molecular con cisteínas*

55 Se mezclaron 400 g del polifenol de semilla de uva obtenidos en el procedimiento (1) descrito anteriormente, 400 g de L-cisteína (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 4 g de ácido ascórbico (fabricado por Junsei Chemical Co., Ltd.), 0,8 kg de ácido cítrico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 4 l de agua, y se hicieron reaccionar a 40°C durante 48 horas. La mezcla de reacción se cargó en una columna (volumen: aproximadamente 25 l) de 200 mm de diámetro y 800 mm de altura, rellena de DIAION HP-20 (fabricado por Mitsubishi  
60 Chemical Corporation) como portador y se lavó una fracción no adsorbida con 100 l de agua. A continuación, se recuperaron fracciones eluidas con 50 l de etanol al 40%, se concentraron bajo presión reducida y se liofilizaron, obteniendo polvos marrón rojizo (rendimiento: 408 g) que eran fácilmente solubles en agua, metanol y etanol. Los polvos se fraccionaron con una solución agitada de etanol-agua en una columna (diámetro: 50 mm, altura: 500 mm, volumen: aproximadamente 1 litro) rellena de Sephadex LH-20 (fabricado por Pharmacia Co., Ltd.) y la composición  
65 de oligómero de las fracciones se analizó mediante el procedimiento de Nonaka *et al.* (Chem. Pharm. Bull. 34(2):633-642, (1986)). Como resultado, se obtuvieron las composiciones siguientes.

## ES 2 330 746 T3

Fracción de monómero de epicatequina unida por cisteínas 19%

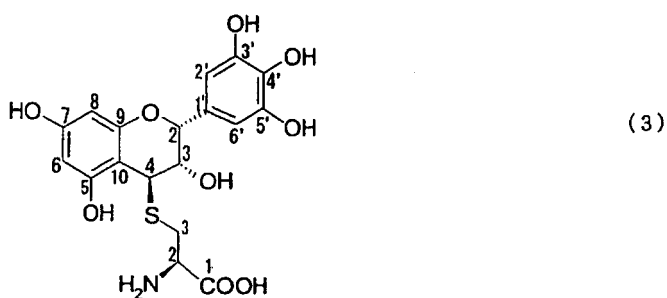
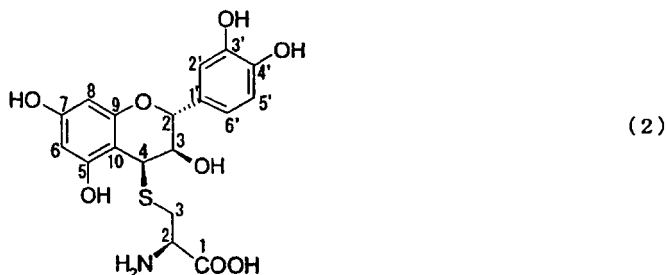
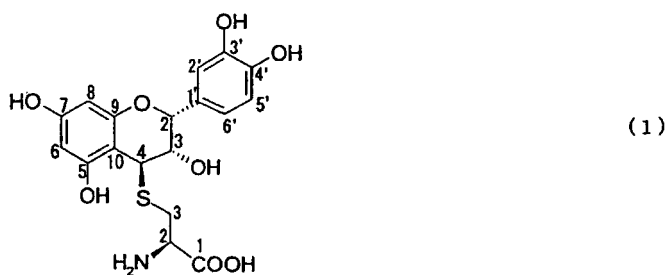
Fracción de dímero de epicatequina unida por cisteínas 21%

5 Fracción de trímero de epicatequina unida por cisteínas 11%

Fracción de tetrámero a hexámero de epicatequina unida por cisteínas 16%

10 (3) *Ejemplo de referencia: monómero de epicatequina unido por cisteínas*

La fracción de monómero de epicatequina unido por cisteínas obtenida de esta manera se purificó mediante cromatografía de columna utilizando gel Sephadex LH-20 (agua-metanol-acetona) para separar las manchas que se colorearon de marrón rosáceo al pulverizarlas con reactivo de ninhidrina-ácido acético y calentarlas, y de esta manera se aislaron los compuestos representados por las fórmulas (1) a (3) siguientes (en adelante ocasionalmente abreviadas como “Compuestos 1 a 3”).



55

El compuesto de fórmula (1) (Compuesto 1) mostró un pico de ión molecular  $[M+H]^+$  ( $m/z$ ) de 410,0925 al medir mediante HR-FAB-MS (espectroscopía de masas rápida de alta resolución por bombardeo de átomos), que concordaba con un valor calculado de 410,0910, correspondiente a la fórmula molecular  $C_{18}H_{20}O_8NS$  con un error de 3,6 ppm (menor a 10 ppm). Por lo tanto, se presumió que el Compuesto 1 presentaba la fórmula molecular  $C_{18}H_{19}O_8NS$  y se supuso que el átomo de azufre de la L-cisteína se encontraba unido a la catequina o a la epicatequina. Además, en la medición de RMN- $^1H$  (espectro de resonancia magnética nuclear del hidrógeno, ver la Tabla 1) del Compuesto 1, aparte de las cinco señales de protones en el anillo aromático que son comunes a la catequina y a la epicatequina, se observaron señales de estructuras que presentaban un átomo de oxígeno o un átomo de azufre en la base en  $\delta$ 5,09 (br.s),  $\delta$ 4,07 (m) y  $\delta$ 3,86 (d,  $J=2Hz$ ), cada uno con un protón. Lo expuesto anteriormente sugiere que el Compuesto 1 presenta una configuración de epicatequina. La señal de protones en  $\delta$ 3,86 (d,  $J=2Hz$ ) se asigna a una estructura  $4\alpha$ , correspondiente a la señal de un producto de tiólisis en el que el átomo de azufre se encuentra en  $4\beta$ . Además, se

## ES 2 330 746 T3

observaron señales de tipo ABX en  $\delta$ 4,13 (1H, dd, J=9, 4Hz),  $\delta$ 2,95 (1H, dd, J=15,9Hz) y  $\delta$ 3,43 (1H, dd, J=15,4Hz), sugiriendo una estructura parcial en la que un grupo metilo es contiguo al grupo metino en la cisteína. Basándose en la información proporcionada anteriormente, se infirió que la estructura química del Compuesto 1 era: 4 $\beta$ -(S-L-cisteinil)-(-)-epicatequina, representada por la Fórmula (1). Un total de 18 señales de carbono, incluyendo cada orden de carbono observado en la RMN-<sup>13</sup>C (espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13, ver la Tabla 2) (procedimiento DEPT) del Compuesto 1 corroboró esta estructura.

En la RMN-<sup>1</sup>H (ver la Tabla 1) del compuesto de fórmula (2) (Compuesto 2), se observaron señales de estructuras que presentaban un átomo de oxígeno o un átomo de azufre en la base en  $\delta$ 4,86 (1H, d, J=9,6Hz),  $\delta$ 4,22 (1H, dd, J=9,6, 4,3Hz) y  $\delta$ 4,23 (1H, d, J=4,3Hz), cada uno con un protón. Los primeros dos se asignaron a configuraciones 2 $\beta$  y 3 $\beta$ , y  $\delta$ 4,23 (1H, d, J=4,3Hz) se asignó a una configuración 4 $\alpha$ . Las señales corresponden a señales de un producto de tiólisis en el que el átomo de azufre se encuentra situado en 4 $\beta$ . Por lo tanto, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 se considera que difieren entre sí únicamente por la configuración de la posición 3, de manera que la estructura química del Compuesto 2 se infiere que es 4 $\beta$ -(S-L-cisteinil)-(+)-catequina, representada por la fórmula (2).

El compuesto de fórmula (3) (Compuesto 3) mostró un pico de ión molecular [M+H]<sup>+</sup> (m/z) de 426,0844 en la medición mediante HR-FAB-MS, que está de acuerdo con un valor calculado de 426,0859, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>NS, que presenta un átomo de oxígeno más que el Compuesto 1, con un error de 3,5 ppm. Además, el Compuesto 3 correspondía y era similar al Compuesto 1 excepto en que, en la medición mediante RMN-<sup>1</sup>H (ver la Tabla 1) del Compuesto 3, los hidrógenos en las posiciones 2' y 6' se habían observado como señales equivalentes en  $\delta$ 6,57 (2H, s) en una región del anillo aromático. Tras considerar la asignación de señales de la RMN-<sup>13</sup>C mostrada en la Tabla 2, se infirió que la estructura del Compuesto 3 era: 4 $\beta$ -(S-L-cisteinil)-(-)-epigallocatequina, representada por la fórmula (3).

TABLA 1

*Asignación de señales de RMN-<sup>1</sup>H ( $\delta$  en ppm) de los Compuestos 1, 2 y 3*

n° de H	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
2-H	5,09 (br.s)	4,86 (d, 2Hz)	5,13(s)
3-H	4,07 (m)	4,22 (dd, 8,3, 2Hz)	4,07(s)
4-H	3,86 (d, 2Hz)	4,27 (d, 2Hz)	3,92(s)
6-H	5,99 (d, 2Hz)	6,04 (d, 2Hz)	6,03(br.s)
8-H	5,87 (d, 2Hz)	5,81 (d, 2Hz)	5,96(br.s)
2'-H	6,99 (d, 2Hz)	6,94 (br.s)	6,57(s)
5'-H	6,76 (d, 8,3Hz)	6,86 (br.s)	
6'-H	6,81 (dd, 8,3, 2Hz)	6,86 (br.s)	6,57(s)
cis 2-H	4,13 (dd, 9, 4Hz)	4,07 (dd, 9, 4Hz)	4,10(m)
cis 3-H <sub>2</sub>	2,95 (dd, 15, 9Hz)	3,02 (dd, 15, 9Hz)	3,00(dd, 15, 9Hz)
	3,43 (dd, 15, 4Hz)	3,55 (dd, 15, 4Hz)	3,45 (dd, 15, 4Hz)

Notas) Se midió el Compuesto 1 en acetona-d<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O, y los Compuestos 2 y 3 se midieron en CD<sub>3</sub>OD, respectivamente.

# ES 2 330 746 T3

TABLA 2

Asignación de las señales de RMN-<sup>13</sup>C (δ en ppm) de los Compuestos 1 y 3

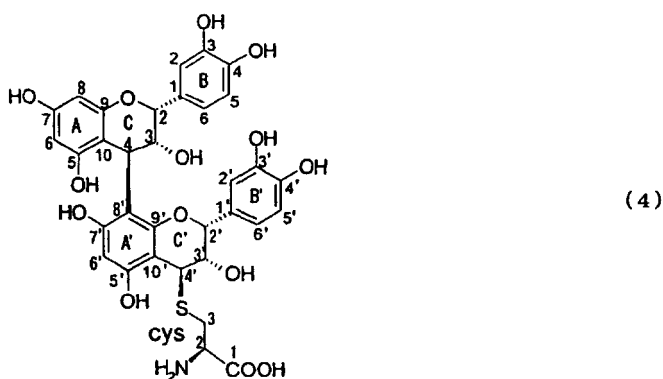
nº de C	Compuesto 1	Compuesto 3
C-2	74,7	75,7
-3	70,6	71,9
-4	41,7	42,9
-5	156,1	157,2
-6	94,5	96,2
-7	157,1	158,2
-8	96,4	99,0
-9	157,7	159,1
-10	99,0	99,6
-1'	130,8	131,1
-2'	115,8 <sup>a)</sup>	107,1
-3'	144,6 <sup>b)</sup>	146,7
-4'	144,7 <sup>b)</sup>	133,6
-5'	115,9 <sup>a)</sup>	146,7
-6'	119,1	107,1
Cys-1	172,1	172,9
-2	53,7	54,7
-3	32,9	34,0

Nota 1) se midió el Compuesto 1 en acetona-d<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O, y el Compuesto 3 se midió en CD<sub>3</sub>OD, respectivamente.

Nota 2) los valores con a) y b) a la derecha en la columna son intercambiables.

#### 4) Dímero de epicatequina unido por cisteínas

Se purificaron polvos de fracción de dímero de epicatequina unido por cisteínas, de la misma manera que la indicada anteriormente para aislar un compuesto representado por la fórmula (4) (en adelante ocasionalmente abreviada como "Compuesto 4").



El Compuesto 4 mostró un pico de ión molecular [M+H]<sup>+</sup> (m/z) de 698 en la medición mediante FAB-MS, sugiriendo una estructura que contenía una unidad de catequina más que el Compuesto 1. A pesar del comportamiento único mostrado en la TLC y HPLC, la RMN-<sup>1</sup>H del Compuesto 4 mostró un espectro en el que las señales estrechas coexistían con señales anchas. Esta distribución de señales de RMN-<sup>1</sup>H característica sugirió que, de entre 4→6 y 4→8, la posición de condensación de unión sería la última, que genera un impedimento rotacional fuerte. Las señales derivadas de los benzopiranos respectivos directamente unidos al enlace 4→8 se observó que se encontraban deformadas, formando señales amplias. Es decir, se asignaron δ4,22, δ4,54 y δ4,96 (cada 1H, br.m, C-3, -4 y -2, respectivamente) a una unidad del extremo superior, y las señales más estrechas δ3,83 y δ3,90 (cada 1H, s, c-4' y -3', respectivamente), 5,20 (1H, br.m, C-2'), se asignaron a una unidad (extremo inferior) unida al átomo de azufre. La utilización de un modelo molecular sugirió que la unidad del extremo inferior se encontraba más libre de impedimentos rotacionales que la uni-

## ES 2 330 746 T3

dad del extremo superior. En la región aromática en  $\delta 5,92$ , se observó que las señales correspondientes a tres protones que debían asignarse a C-6, -8 y -6' correspondían a una envoltura. Los protones en los anillos B de ambas unidades se observaron de  $\delta 6,60$  a  $\delta 7,09$ , y una señal estrecha de doblete que presenta una constante de acoplamiento de 8,3Hz entre ellas se considera asignada a la posición 5 en la unidad del extremo inferior, que se encontraba libre de impedimentos rotacionales. Las señales restantes:  $\delta 2,95$  y  $\delta 3,44$  (cada 1H, br.s, cys-C-3) y  $\delta 4,14$  (1H, dd,  $J=9, 4$ Hz, cys-C-2) se presumieron derivadas de residuos de cisteína. La RMN- $^{13}$ C del Compuesto 4 (ver la Tabla 3), que contiene señales correspondientes al Compuesto 1, confirma la estructura del Compuesto 4 representada por la fórmula (4). Por lo tanto, se presumió que la estructura del Compuesto 4 era:  $4\beta$ (S-L-cisteinil)-(-)-epicatequina-( $4\beta \rightarrow 8$ )-(-)-epicatequina.

TABLA 3

*Asignación de las señales de la RMN- $^{13}$ C ( $\delta$  en ppm) del Compuesto 4*

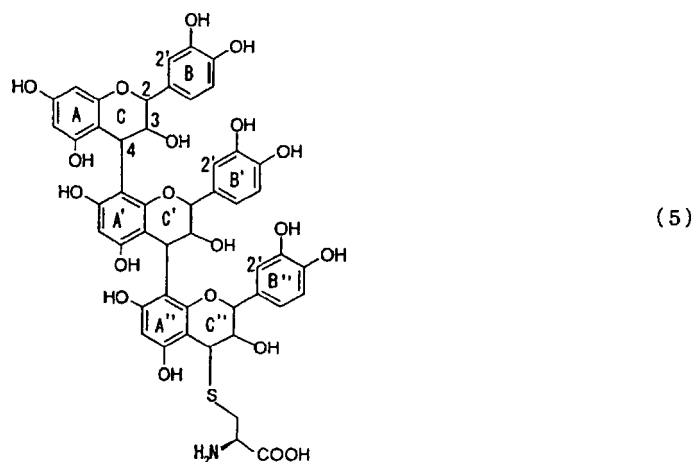
nº de C		nº de C	
C-2	76,0	C-2'	74,6
-3	72,0	-3'	69,9
-4	36,1	-4'	42,0
-5	156,6 <sup>a)</sup>	-5'	156,5 <sup>a)</sup>
-6	95,3	-6'	95,3
-7	156,5	-7'	156,6
-8	95,3	-8'	99,0
-9	156,5	-9'	156,6 <sup>a)</sup>
-10	99,0	-10'	99,0
anillo B -1	130,7	anillo B-1'	130,7
-2	114,7 <sup>b)</sup>	-2'	115,7
-3	144,6 <sup>c)</sup>	-3'	144,6
-4	144,2 <sup>c)</sup>	-4'	144,2
-5	115,0 <sup>b)</sup>	-5'	115,7
-6	119,2	-6'	119,2
		Cys-1	172,2
		-2	53,7
		-3	32,8

Nota 1) Cada muestra se midió en acetona- $d_6$ -D<sub>2</sub>O.

Nota 2) Los valores de desplazamiento químico con a), b) y c) a la derecha son intercambiables.

### 5) Trímero de epicatequina unido por cisteínas

Se purificaron polvos de fracción de monómero de epicatequina unido por cisteínas de la misma manera que anteriormente para aislar un compuesto representado por la fórmula (5) (en adelante ocasionalmente abreviado "Compuesto 5").



## ES 2 330 746 T3

El Compuesto 5 mostró un pico de ión molecular  $[M-H]^+$  (m/z) de 984,1956 al medir mediante HR-ESI-MS, que era consistente con un valor calculado de 984,2011, correspondiente a la fórmula molecular  $C_{48}H_{42}O_{20}NS$  con un error de 5,5 ppm. Por lo tanto, se presumió que el Compuesto 5 presentaba la fórmula molecular  $C_{48}H_{43}O_{20}NS$  y se supuso que en su estructura química la L-cisteína se encontraba unida a un condensado de tres moléculas de catequina o epicatequina. Además, las señales de RMN- $^1H$  del Compuesto 5 eran generalmente anchas y se sugiere que las tres unidades se encuentran condensadas linealmente al enlace 4 $\rightarrow$ 8, con la L-cisteína unida a la unidad del extremo inferior. A partir de los singletes observados en  $\delta$ 5,98 como señales en los anillos aromáticos, se realizó la asignación siguiente: 6-H y 8-H en el anillo A, 6-H en el anillo A', y 6-H en el anillo A''. Las señales observadas en los campos magnéticos inferiores ( $\delta$ 6,04, s;  $\delta$ 6,91, 7,01, s;  $\delta$ 7,11, s) presentaban unas proporciones del pico de aproximadamente 3:2:1:3 y se asignaron a señales derivadas de 2-H en los anillos B, B' y B''. Las señales en  $\delta$ 6,91 y  $\delta$ 7,01 (2:1) se consideró que habían aparecido como resultado de que la señal derivada de 2-H en el anillo B situado en el centro de la estructura se había dividido debido a impedimentos rotacionales. Basándose en esta información, la estructura planar del Compuesto 5 se presumió tentativamente que presentaba la fórmula (5).

### Ejemplo 2

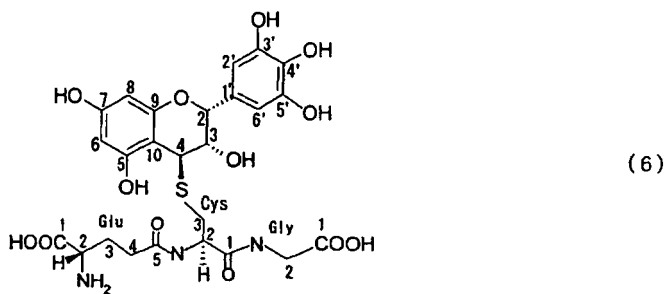
#### Producción de oligómero de proantocianidina azufrado derivada de semillas de uva

Utilizando la misma materia prima y condiciones que en el Ejemplo 1, se extrajo polifenol de las semillas de uva y se purificó bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. El producto purificado se hizo reaccionar con glutatión bajo las condiciones siguientes para reducir el peso molecular.

Es decir, se mezclaron 1,0 g del polifenol obtenido de semillas de uva, 3,0 g de glutatión (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,5 g de ácido ascórbico (fabricado por Junsei Chemical Co., Ltd.) y 50,0 ml de ácido clorhídrico 1 N, y se hicieron reaccionar a 40°C durante 48 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante la utilización de DIAION HP-20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), MCIgel CHP-20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), Sephadex LH-20 (fabricado por Pharmacia Co., Ltd.), etc., se concentraron bajo presión reducida y se liofilizaron, obteniendo polvos marrón rojizo (rendimiento: 120 mg).

#### 1) Monómeros unidos por glutatión

Los polvos marrón rojizo obtenidos se purificaron mediante repetición de cromatografía de columna utilizando gel de poliestireno, gel Sephadex LH-20 y gel de sílice ODS como portadores y una mezcla de agua y metanol como fase móvil, obteniendo un compuesto representado por la fórmula (6) (Compuesto 6).



Tras medir mediante HR-ESI-MS (espectroscopía de masas de alta resolución con ionización por electropulverización), el Compuesto 6 mostró un pico de ión molecular  $[M+H]^+$  (m/z) de 596,1550, que concordaba con un valor calculado de 596,1551, correspondiente a la fórmula molecular  $C_{25}H_{30}O_{12}N_3S$  con un error de 0,17 ppm. Por lo tanto, se presumió que el Compuesto 6 presentaba una estructura química en la que el átomo de azufre derivado de la L-cisteína del glutatión se encuentra unido a la catequina o a la epicatequina. En la RMN- $^1H$  del Compuesto 6, aparte de 5 señales ( $\delta$ 5,84, 5,96, 6,91 (cada una 1H, 8-, 6-, 2'-H, respectivamente),  $\delta$ 6,73-6,78 (2H, m, 5'-, 6'-H) de protones en un anillo aromático, que son comunes a la catequina y a la epicatequina, se observaron señales de estructuras que presentan un átomo de oxígeno o un átomo de azufre en la base en  $\delta$ 3,90, 3,91, 5,15 (cada 1H, 3-, 4-, 5-H, respectivamente). Lo expuesto anteriormente sugiere que en la estructura el átomo de azufre se encuentra situado en 4 $\beta$  en la posición 4 de la epicatequina de la misma manera que en el Compuesto 1. Además, se observaron señales correspondientes a la parte cisteína ( $\delta$ 3,63 (1H, br.t, J=9, 4Hz, cys-2-H), 3,72, 3,80 (cada 1H, d, J=17,6Hz, cys-3-H<sub>2</sub>), parte de ácido glutámico ( $\delta$ 1,72 (2H, m, glu-4-H<sub>2</sub>), 1,78 (2H, m, glu-3-H<sub>2</sub>)), 3,05 (1H, br.d, J=5,4 Hz, glu-2-H) y parte glicina ( $\delta$ 3,20 (2H, s, gly-2-H<sub>2</sub>)). Esta estructura se confirmó mediante la observación de 25 señales de carbono mediante la medición de la RMN- $^{13}C$  (ver la Tabla 4) del Compuesto 6.

Por lo tanto, se presumió que la estructura del Compuesto 6 era: 4 $\beta$ -(glutathionil)-(-)-epicatequina, representada por la fórmula (6), en la que el átomo de azufre derivado de la parte cisteína de la molécula de glutatión se encuentra unida a 4 $\beta$  de la epicatequina.

## ES 2 330 746 T3

TABLA 4

*Asignación de señales de RMN-<sup>13</sup>C ( $\delta$  en ppm) del Compuesto 6*

	nº de C	nº de C	
5	C-2	74,9	glu-1
	-3	70,9	-2
10	-4	43,3	-3
	-5	156,5	-4
	-6	96,9	-5
	-7	115,9	cys-1
15	-8	95,8	-2
	-9	157,9	-3
	-10	99,7	gly-1
	-1'	131,5	-2
20	-2'	115,4	
	-3'	144,9*	
	-4'	145,0*	
	-5'	116,7	
25	-6'	119,9	

Nota 1) la muestra se midió tras disolverla en CD<sub>3</sub>OD.

Nota 2) Valores de desplazamiento químico con el símbolo \*a la derecha son intercambiables.

### Ejemplo 3

#### Producción de proantocianidina azufrada derivada de corteza de pino

##### (1) Extracción de polifenol de la corteza de pino

Se extrajeron 400 g de corteza de *Abies sachalinensis* (abeto de Sakhalin) con 1,5 l de metanol al 8% a temperatura ambiente durante 3 días, y el residuo se separó mediante filtración. A continuación, el filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniendo una solución concentrada, que se purificó bajo las condiciones siguientes.

##### Condiciones de purificación

Se cargó la cantidad total de la solución concentrada en una columna de DIAION HP-20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation) de 50 mmØ x 30 cm (aproximadamente 600 ml) y se lavó con 2.500 ml de agua. A continuación, se recuperó un eluido mediante la utilización de 1.200 ml de metanol, se concentró bajo presión reducida y se liofilizó, obteniendo 18,4 g de una composición de polvos.

##### (2) Reacción de reducción del peso molecular con cisteínas

Se mezcló 1,0 g del polifenol de corteza de pino obtenido mediante el procedimiento (1) descrito anteriormente, 1,7 g de L-cisteína (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,25 g de ácido ascórbico (fabricado por Junsei Chemical Co., Ltd.) y 20,0 ml de ácido clorhídrico 1 N y se hicieron reaccionar a 40°C durante 48 horas. La mezcla de reacción se cargó en una columna (volumen: aproximadamente 100 ml) de 25 mm de diámetro y 150 mm de altura, se rellenó con DIAION HP-20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation) como portador y se lavó la fracción no adsorbida con 400 ml de agua. A continuación, se recuperaron las fracciones eluidas con 400 ml de metanol, se concentraron bajo presión reducida y se liofilizaron, obteniendo unos polvos marrón rojizo (rendimiento: 0,95 g).

La proantocianidina muestra una fuerte actividad antioxidante *in vitro*, mientras que la proantocianidina no siempre muestra un efecto suficiente *in vivo* por vía oral. Presumiblemente el motivo es que la proantocianidina de peso molecular elevado no puede ser fácilmente absorbida en el intestino. Por el contrario, el oligómero de proantocianidina azufrado que presenta un peso molecular reducido debido a la utilización de la sustancia que contiene grupos SH según la presente invención, muestra actividad antioxidante equivalente a la de la proantocianidina de peso molecular elevado *in vitro* y también muestra una actividad antioxidante superior a la de la proantocianidina de peso molecular elevado *in vivo*.

## Ejemplo 4

*Producción de proantocianidina azufrada derivada de Myrica rubra*5 (1) *Extracción de polifenol de Myrica rubra*

Se extrajeron 400 g de corteza de *Myrica rubra* (mirto de la cera) con 1,5 l de metanol al 80% a temperatura ambiente durante 3 días y se separó el residuo mediante filtración. A continuación, el filtrado se concentró bajo presión reducida, obteniendo una solución concentrada que se purificó bajo las condiciones siguientes.

10

*Condiciones de purificación*

Se cargó la cantidad total de la solución concentrada en una columna de DIAION HP-20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation) de 50 mmØ x 30 cm (aproximadamente 600 ml) y las fracciones no adsorbidas se lavaron con 15 2.500 ml de agua. A continuación, se recuperó un eluido obtenido mediante la utilización de 1.200 ml de metanol, se concentró bajo presión reducida y se liofilizó, obteniendo 38,0 g de una composición de polvos.

(2) *Reacción de reducción del peso molecular con cisteínas*

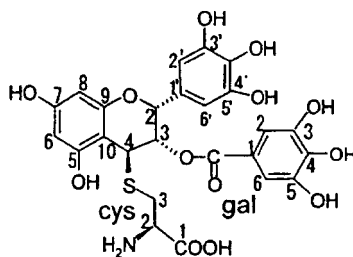
20 Se mezcló 1,0 g del polifenol de *Myrica rubra* obtenido mediante el procedimiento (1) descrito anteriormente, 1,7 g de L-cisteína (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0,25 g de ácido ascórbico (fabricado por Junsei Chemical Co., Ltd.) y 20,0 ml de ácido clorhídrico 1 N y se hicieron reaccionar a 40°C durante 48 horas. Se cargó la mezcla de reacción en una columna de DIAION HP-20 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation) de 25 mmØ de diámetro y 150 mm de altura (volumen: aproximadamente 100 ml) y se lavó la fracción no adsorbida con 400 ml de agua. A continuación, se recuperó un eluido obtenido mediante la utilización de 400 ml de metanol, se concentró bajo presión reducida y se liofilizó, obteniendo 0,95 g de polvos marrón rojizo.

25

(3) *Combinación de polifenol de corteza de mirto de la cera y L-cisteína*30 1) *Monómero de galato de epigalocatequina unida por L-cisteínas (ejemplo de referencia)*

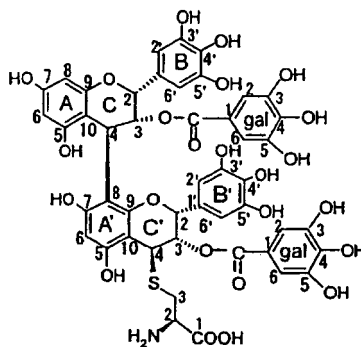
Se purificaron los polvos marrón rojizo obtenidos en (2) mediante repetición de la cromatografía de columna utilizando gel de poliestireno, gel Sephadex LH-20 y gel de sílice ODS como portadores, y una mezcla de agua, metanol y acetona en proporciones opcionales como fase móvil, con el fin de aislar galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, galato de (4β→8) de epigalocatequina y el Compuesto 3 indicado anteriormente, así como los 35 compuestos siguientes, representados por las fórmulas (7) y (8) (Compuestos 7 y 8).

40



45

50



55

60

El Compuesto 7 mostró un pico de ión molecular  $[M-H]^+$  (m/z) de 575 en la medición del ESI-MS. Además, los resultados de la medición mediante RMN-<sup>1</sup>H (ver la Tabla 5) indicaron que el Compuesto 7 era similar a los 65 Compuestos 1 y 3. Sin embargo, se observaron 3-βH (1H, 5,29, s) que se encontraban desplazados hacia campos magnéticos más bajos por aproximadamente 1,3 ppm, así como posiciones 6 y 8 en el anillo A en una región del anillo aromático, y dos conjuntos de señales singletes estrechas equivalentes (derivadas de los hidrógenos de las posiciones

## ES 2 330 746 T3

2 y 6 en el benceno 1,3,4,5-sustituido) sumando, cada uno, dos protones. Estas señales sugieren que el Compuesto 7 es un galato de epigalocatequina.

5 Considerando conjuntamente la información y asignación de señales de RMN-<sup>13</sup>C, se presumió que la estructura del Compuesto 7 era: galato de 4β-(S-L-cisteinil)-(-)-epicatequina, representada por la fórmula (7).

### 2) Dímero de galato de epigalocatequina unida por L-cisteínas

10 En la medición mediante HR-ESI-MS el Compuesto 8 mostró un pico de ión molecular [M-H]<sup>+</sup> (m/z) de 1.032,1517, que concordaba con un valor calculado de 1.032,1503, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S con un error de 1,4 ppm. Por lo tanto, se presumió que el Compuesto 8 presentaba una estructura con una unidad de galato de epicatequina más que el Compuesto 7. La RMN-<sup>1</sup>H del Compuesto 8 mostró un espectro en el que una señal estrecha coexistía en la señales anchas de manera similar al Compuesto 4, y se consideró que era del tipo condensación 4→8. Las señales de la RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se asignaron de manera similar al Compuesto 4 (Tablas 5 y 6, respectivamente) y la estructura del Compuesto 8 presumiblemente era: galato de 4β-(S-L-cisteinil)-(-)-epicatequina-galato de (4β→8)-(-)-epicatequina, representada por la fórmula (8).

TABLA 5

Asignación de las señales RMN-<sup>1</sup>H (δ en ppm) de los compuestos 7 y 8

nº de C	Compuesto 7	Compuesto 8
C-2-H	5,37 (s)	5,50 (s)
3-H	5,29 (s)	4,75 (s)
4-H	4,16 (s)	4,15 (br.s)
A-6-H	6,08 (s)	5,87 (br.s)
8-H	6,01 (d, 2,2Hz)	5,90 (br.s)
B-2'-H	6,45 (s)	6,45 (br.s)
6'-H	6,45 (s)	6,45 (br.s)
gal-2-H	6,96 (s)	6,96 (br.s)
gal-6-H	6,96 (s)	7,00 (br.s)
C'-2-H		5,39 (br.s)
3-H		5,12 (br)
4-H		4,15 (br.s)
A'-6-H		6,09 (br.s)
8-H		-
B'-2'-H		6,57 (br.s)
6'-H		6,57 (br.s)
gal-2'-H		7,00 (br.s)
gal-6-H		7,00 (br.s)
cys 2-H	4,19 (br.m)	4,07 (dd, 9, 4Hz)
cys 3-H <sub>2</sub>	3,17 (dd, 15, 8Hz)	3,02 (dd, 15, 9Hz)
	3,71 (br.d, 15Hz)	3,55 (dd, 15, 4Hz)

Notas) Se midió el Compuesto 7 a 25°C, el Compuesto 8 se midió a 40°C en acetona-d<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O.

TABLA 6

Asignación de las señales de RMN-<sup>13</sup>C (δ en ppm) de los Compuestos 7 y 8

nº de C	Compuesto 7	Compuesto 8			
C-2	74,0	C-C-2	75,0	C'-C-2	73,5
-3	74,0	-3	75,0	-3	73,5
-4	39,3	-4	32,4	-4	38,9
-5	156,2	A-C-5	154,8	A'-C-5	154,8
-6	95,4	-6	94,7	-6	94,7
-7	157,3	-7	156,1 <sup>a)</sup>	-7	155,9 <sup>a)</sup>

# ES 2 330 746 T3

TABLA 6 (continuación)

	nº de C	Compuesto 7	Compuesto 8			
5	-8	97,0	-8	95,3	-8	95,3
	-9	158,9	-9	156,5	-9	156,5
	-10	97,9	-10	96,6	-10	96,9
10	-1'	129,3	B-C-1	131,9	B'-C-1	131,9
	-2'	106,4	-2	106,0	-2	106,0
	-3'	145,6	-3	131,9	-3	131,9
	-4'	132,9	-4	119,6	-4	119,6
15	-5'	145,6	-5	144,8	-5	144,8
	-6'	106,4	-6	106,0	-6	106,0
	gal-C-1	120,2	gal-C-1	119,6	gal-C-1	119,6
	-2	109,8	-2	109,4 <sup>b)</sup>	-2	109,4
20	-3	146,0	-3	145,0	-3	145,3
	-4	139,2	-4	138,8	-4	138,8
	-5	146,0	-5	145,0	-5	145,3
	-6	109,8	-6	109,5 <sup>b)</sup>	-6	109,4
25	-C(=O)O-	167,0	-C(=O)O-	166,7	-C(=O)O-	166,7
	Cys-1	171,8			Cys-1	171,0
	-2	53,9			-2	53,3
30	-3	33,3			-3	32,6

Nota 1) se midió el compuesto 1 en acetona-d<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O, el compuesto 3 se midió en CD<sub>3</sub>OD.

Nota 2) los valores de desplazamiento químico con a) y b) a la derecha son intercambiables.

## Ejemplo de ensayo 1

### *Efecto secuestrador de radicales DPPH*

Los polvos antes del fraccionamiento del Ejemplo 1 (Sustancia 1), la fracción de monómero (Sustancia 2) obtenida mediante fraccionamiento de la Sustancia 1, las fracciones de dímero y trímero (Sustancia 3) obtenidas mediante fraccionamiento de la Sustancia 1, las fracciones de tetrámero a hexámero (Sustancia 4) obtenidas mediante fraccionamiento de la Sustancia 1, la materia primera en el Ejemplo 1 (extracto de polifenol de semillas de uva) (Sustancia Comparativa 1) y catequina comercialmente disponible (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (Sustancia Comparativa 2) se midieron para el efecto secuestrador de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) mediante el procedimiento siguiente.

Se cargaron 100  $\mu$ l de una solución de DPPH (solución de etanol 60  $\mu$ M) en una microplaca de 96 pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de etanol como muestra de ensayo o 100  $\mu$ l de etanol como control, y se mezcló suavemente el conjunto y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se midió la absorbancia a 520 nm y se calculó la capacidad secuestradora de radicales DPPH según la fórmula siguiente. Se calculó la concentración efectiva 50% (EC<sub>50</sub>) a partir de la capacidad secuestradora de radicales DPPH y de las concentraciones de muestras de ensayo gradualmente diluidas.

$$\text{Capacidad secuestradora de radicales DPPH (\%)} = \frac{[1 - (\text{absorbancia de la muestra de ensayo})]}{(\text{absorbancia del control})} \times 100$$

Se calculó la concentración efectiva 50% (EC<sub>50</sub>) a partir de las capacidades de secuestro de radicales DPPH en concentraciones graduales de cada muestra. La Tabla 7 muestra los resultados.

A concentraciones bajas, la Sustancia 4 presentaba una capacidad secuestradora de radicales DPPH relativamente elevada. Otras muestras mostraron actividades similares. A concentraciones elevadas cada muestra mostró una actividad elevada.

## ES 2 330 746 T3

TABLA 7

EC <sub>50</sub> de secuestro de radicales DPPH	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Sustancia 1	1,62
Sustancia 2	2,78
Sustancia 3	1,45
Sustancia 4	0,77
Sustancia Comparativa 1	1,55
Sustancia Comparativa 2	1,71

15 Ejemplo de ensayo 2

*Actividad de tipo superóxido dismutasa (SOD)*

20 Con respecto a las Sustancias 1 a 4 y a las Sustancias Comparativas 1 y 2 que eran iguales a aquéllas utilizadas en el Ejemplo de ensayo 1, se midió actividad de tipo SOD utilizando un kit de medición de la actividad SOD en sangre (ensayo SOD Wako: fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se calculó la actividad de tipo SOD según la fórmula siguiente y se calculó la concentración efectiva 50% (EC<sub>50</sub>) basándose en la relación con la concentración de muestra de ensayo:

25 
$$\text{Actividad de tipo SOD (\%)} = [(1 - (\text{absorbancia de muestra de ensayo})) / (\text{absorbancia del control})] \times 100$$

30 Se calculó la EC<sub>50</sub> a partir de las actividades de tipo SOD en concentraciones graduales de cada muestra. La Tabla 8 muestra los resultados. Cada fracción de Sustancias 2 a 4 mostró una actividad de tipo SOD elevada comparado con las Sustancias Comparativas 1 y 2.

TABLA 8

EC <sub>50</sub> de actividad de tipo SOD (µg/ml)	
Sustancia 1	69,7
Sustancia 2	84,8
Sustancia 3	74,6
Sustancia 4	75,5
Sustancia Comparativa 1	70,9
Sustancia Comparativa 2	62,0

45 Ejemplo de ensayo 3

50 *Efecto en modelo de insuficiencia orgánica múltiple subaguda inducida por FeNTA*

Se llevaron a cabo ensayos utilizando FeNTA (una mezcla de nitrato de hierro (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) y nitrilotriacetato sódico (NTA<sub>3</sub>Na)) conocido como modelo de oxidación *in vivo* que genera una gran cantidad de oxígeno activo al administrarlo en un organismo para inducir insuficiencia orgánica múltiple.

55 Es decir, se mezcló una solución de 240 mg de nitrato de hierro noahidrato (fabricado por Kanto Kagaku) en 40 ml de agua fría y se añadió una solución de 390 mg de nitrilotriacetato sódico monohidrato en 40 ml de agua fría bajo enfriamiento con hielo y se ajustó el pH de la mezcla a 7,5 con ácido clorhídrico 1 N y se enrasó a un volumen fijo de 100 ml para preparar una solución de FeNTA. Dentro de los 10 minutos posteriores a la preparación, se administraron intraperitonealmente 22,5 mg/kg de peso corporal en forma de Fe de la solución de FeNTA en ratones ddY macho de 7 semanas de edad (peso corporal medio: 30 g) cada dos días. Cada una de entre la Sustancia 1 y la Sustancia Comparativa 1 se administró forzosamente por vía oral cada día a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal (grupo administrado una dosis baja) o 50 mg/kg de peso corporal (grupo administrado una dosis alta). El grupo de control debió ingerir agua corriente. Se preparó un grupo de control negativo, al que no se había administrado FeNTA y un grupo de control positivo al que se había administrado FeNTA. Se permitió que los animales bebieran y comieran libremente. Se recogió sangre los días 7, 14, 21 y 28 tras el inicio de la administración. Se midió el nivel sérico de peróxido lípido (LPO). El día 28 desde el inicio de la administración se diseccionaron los animales para extraer hígado, riñón y cerebro, y se midió el nivel de LPO de homogenada para cada órgano.

## ES 2 330 746 T3

### Resultados de ensayo

(1) Las figuras 1(A) y 1(B) muestran los niveles séricos de LPO. En el grupo administrado una dosis baja, el nivel sérico de LPO del grupo de Sustancia 1 se redujo significativamente comparado con el grupo de la Sustancia Comparativa 1 y que el grupo de control positivo el día 21 (figura 1(A)). Además, en el grupo administrado una dosis alta, el nivel sérico de LPO del grupo de la Sustancia 1 se redujo significativamente el día 21 desde el inicio de la administración y después (figura 1(B)). El grupo de la Sustancia Comparativa 1 también mostró un nivel bajo el día 21, aunque la sustancia de la presente invención mostró efectos más fuertes.

### (2) Nivel de LPO en cada órgano

Las figuras 2A a 2C muestran los niveles de LPO en hígado, riñón y cerebro.

En el hígado, no se observó ningún incremento significativo del nivel de LPO tras administrar FeNTA ni ningún cambio en cada grupo de administración. En el riñón y en el cerebro, la administración de FeNTA incrementó el nivel de LPO en el homogenado. La administración de Sustancia 1 y de Sustancia Comparativa 1 redujo el nivel de LPO. Tanto el riñón como el cerebro mostraron el nivel más bajo en el grupo de administración de dosis elevada de Sustancia 1. En particular, en el cerebro, la administración de Sustancia Comparativa 1 también mostró niveles reducidos. Sin embargo, el grupo de administración de dosis elevada de Sustancia 1 mostró niveles significativamente reducidos comparado con los demás grupos.

### Sumario de los resultados

La administración de FeNTA incrementó el nivel sérico de LPO. La Sustancia 1 mostró el efecto a dosis bajas y durante periodos cortos en comparación con la Sustancia Comparativa 1. Lo expuesto anteriormente demuestra que, debido a la reducción del peso molecular, la Sustancia 1 resulta más fácilmente absorbida por el intestino al administrarla oralmente, de manera que la Sustancia 1 muestra el efecto a dosis bajas y durante periodos cortos. En particular, se ha clarificado que la Sustancia 1 muestra una potente actividad antioxidante en riñón y cerebro.

### Ejemplo de ensayo 4

#### Ensayo de seguimiento en seres humanos

#### Procedimiento de Ensayo

Se dividieron treinta y cuatro (34) personas sanas (edad media: 41,2 años de edad, 21 machos y 13 hembras) en dos grupos, tal como se muestra en la Tabla 9, y se administraron 500 mg/día de cada una de la Sustancia 1 y la Sustancia Comparativa 1 durante 28 días. Se recogió sangre antes de iniciarse la administración y 28 días después de ésta, y se midió el nivel sérico de LPO y de actividad de tipo SOD.

TABLA 9

Grupo de administración	Edad media	Proporción macho/hembra	Nivel inicial de LPO elevado	Nivel inicial de SOD bajo
Sustancia 1	41,9 años	10 machos 6 hembras	7 personas	7 personas
Sustancia Comparativa 1	40,5 años	11 machos 6 hembras	11 personas	8 personas

### Resultados

Las figuras 3A, 3B, 4A y 4B muestran el nivel de LPO y de actividad de tipo SOD antes y después de la administración. La figura 3A muestra los niveles de LPO para personas con niveles iniciales normales, y la figura 3B muestra los niveles de LPO para las personas con niveles iniciales anormales. La figura 4A muestra la actividad de tipo SOD para personas con valores iniciales normales, y la figura 4B muestra la actividad de tipo SOD para personas con valores iniciales normales.

Mediante la administración de la Sustancia Comparativa 1 y la Sustancia 1 durante 28 días, los niveles de LPO mostraron una reducción y la actividad de tipo SOD mostró una tendencia a incrementarse. Entre los sujetos con niveles iniciales anormales, aquellos con un nivel inicial de LPO relativamente alto (nivel de LPO de 8,0 ó más) y aquellos con una actividad de tipo SOD relativamente baja (actividad de tipo SOD de 12,0 ó menos), se observó una reducción estadísticamente significativa del nivel de LPO en un grupo en el que se administró la Sustancia 1 (figura (3B)). De manera similar, se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad de tipo SOD en un

## ES 2 330 746 T3

grupo en el que se administró la Sustancia 1 (figura (4B)). Lo anterior confirmó que la Sustancia 1 resulta más efectiva para mejorar el estado de oxidación de un organismo que la misma cantidad de Sustancia Comparativa 1.

### 5 Ejemplo de ensayo 5

#### *Efecto de protección de las células nerviosas frente a la muerte celular oxidativa inducida por $\beta$ -amiloides*

10 La enfermedad de Alzheimer, que está causada por la regeneración anormal de los nervios, se caracteriza porque la enfermedad forma placas seniles mediante acumulación de  $\beta$ -amiloide. El  $\beta$ -amiloide es una sustancia que genera especies de oxígeno activo y desempeña un papel crucial en la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer debido a la citotoxicidad para las células nerviosas. Se examinó el polifenol de peso molecular reducido (en adelante ocasionalmente "GSM") para el efecto de protección de las células nerviosas frente a la actividad dañina para las células por inducción de apoptosis en células PC-12, ampliamente utilizadas en experimentos de citotoxicidad nerviosa.

15

#### *Procedimiento de Ensayo*

Se cultivaron células PC-12 en medio DMEM que contenía suero equino inactivado por calor al 10% y suero fetal bovino al 5% en una atmósfera de 10% de dióxido de carbono. Tras el precultivo durante 24 horas con ajuste de la densidad celular a  $4 \times 10^4$  células/300  $\mu$ l, se añadió GSM o polifenol de semillas de uva (en lo sucesivo abreviado en ocasiones "GSP") a medio N-2 que no contenía suero, a una concentración de 1, 1,5, 5 ó 10  $\mu$ g/ml y se llevó a cabo el cultivo en una placa de 48 pocillos.

20

#### *(1) Ensayo de supervivencia celular*

25

Tras el tratamiento, las células se trataron con 1 mg/ml de solución de MTT y se disolvió un producto de azul formazán profundo en un tampón y se midió la absorbancia a longitudes de onda entre 540 y 595 nm. Se muestran los resultados como proporción (%) respecto a la absorbancia de células de control no tratadas.

30

#### *Resultados*

El ensayo MTT demostró que GSM suprimía la muerte de las células PC-12 debida al  $\beta$ -amiloide de manera dependiente de la concentración. Su efecto era superior al de GSP en una región de concentración baja de, particularmente, 1 y 1,5  $\mu$ g/ml (figura 5).

35

#### *(2) Ensayo de medición del potencial de membrana mitocondrial*

Se utilizó TMRE, una sonda catiónica soluble en grasas, para medir el potencial de membrana mitocondrial. Se trataron células PC-12 ( $1 \times 10^4$  células/ml) con  $\beta$ -amiloide 25  $\mu$ M en presencia/ausencia de GSM o de GSP y después se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, seguido de tratamiento con TRME (150 nM) a 37°C durante 30 minutos. Se detectó el TMRE acumulado dependiendo del potencial de membrana mitocondrial mediante la utilización de fluorescencia a una longitud de onda excitatoria de 488 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm.

40

#### *Resultados*

45

Las mitocondrias experimentan alteraciones de la integridad de la membrana antes de los síntomas de la muerte celular. Este cambio se produce en las membranas tanto interna como externa de la mitocondria, conduciendo finalmente a la descarga del potencial transmembrana, liberando una proteína intermembranal soluble, tal como el citocromo C, y un cambio de la permeabilidad membranal. Al exponer las células PC-12 a  $\beta$ -amiloide, las células experimentan una rápida reducción del potencial transmembrana mitocondrial, que se expresa mediante fluorescencia roja utilizando TMRE, que es un pigmento dependiente del potencial (figura (6A)). La reducción del potencial transmembranal por el  $\beta$ -amiloide resultó significativamente suprimido por el pretratamiento con GSM y el efecto fue superior al de GSP (figuras (6A) y (6B)).

50

#### *(3) Medición de la acumulación de especies de oxígeno activo en las células*

55

Con el fin de observar la cantidad acumulada de especies de oxígeno activo en las células, se utilizó la sonda fluorescente DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato).

Tras tratar las células PC-12 ( $1 \times 10^6$  células/3 ml) con  $\beta$ -amiloide 25  $\mu$ M en presencia/ausencia de GSM o de GSP, las células se lavaron con solución de Krebs-Ringer y se añadió a la misma DCF-DA 10  $\mu$ M. Tras el cultivo a 37°C durante 15 minutos, se observaron las células mediante la utilización de un microscopio láser confocal dotado de un láser de argón a una longitud de onda excitatoria de 488 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm.

60

#### *Resultados*

65

Con el fin de elucidar el estrés oxidativo en la muerte celular de las células PC-12 debido al  $\beta$ -amiloide, se midió la acumulación intracelular de especies de oxígeno activo mediante la utilización de DCF-DA, que puede permear a

través de una membrana celular. En una célula, DCF-DA se hidroliza a DCF debido a la actividad esterasa de la célula, y reacciona con un peróxido para producir una sustancia fluorescente. Las células PC-12 tratadas con  $\beta$ -amiloide se tiñeron con un pigmento DCF y se visualizaron (figura 7(A)). GSM redujo la acumulación de especies de oxígeno activo en la célula debida al  $\beta$ -amiloide y el efecto de reducción fue más elevado que el de GSP (figuras 7(A) y 7(B)).

5

#### (4) Nivel intracelular de glutatión

El nivel intracelular de glutatión se midió mediante la utilización de un kit disponible comercialmente (BIOXY-TECH GSH-400: fabricado por OXIS Research Corporation, U.S.A.). Se recuperaron células PC-12 tratadas con  $\beta$ -amiloide cultivadas en presencia/ausencia de GSM o de GSP y se homogeneizaron en una solución de ácido metafosfórico, y se centrifugaron para obtener un sobrenadante, al que se añadió una solución de cromógeno ácido clorhídrico. Tras la agitación, se añadió una solución de hidróxido sódico al 30% y las células se cultivaron a 25°C durante 10 minutos y después se centrifugaron para obtener un sobrenadante transparente, en el que se midió la absorbancia a 400 nm. Se midió el contenido de proteínas mediante la utilización de un kit de medición de proteína BCA y se comparó la concentración de glutatión de la proteína por unidad de peso de proteína con la del control no tratado.

15

#### Resultados

La muerte celular debida al  $\beta$ -amiloide implica el daño oxidativo. En las células tratadas con  $\beta$ -amiloide se redujo el nivel intracelular de glutatión. En las células tratadas con GSP, el nivel intracelular de glutatión se recuperó hasta un nivel normal, mientras que en el caso de GSM, se observó un nivel intracelular de glutatión superior al nivel normal, de manera que GSM mostró una elevada actividad antioxidante en la célula (figura 8).

20

#### (5) Nivel de peróxido lípido

25

Se midió el nivel de peróxido lípido mediante la utilización de un kit comercializado (BIOXYTECH LPO-586: fabricado por OXIS Research Corporation, U.S.A.). Se recuperaron células PC-12 tratadas con  $\beta$ -amiloide cultivadas en presencia/ausencia de GSM o de GSP y se homogenizaron en un tampón de hidrocloreuro de Tris 20 mM que contenía hidroxitolueno butilado 0,5 mM, y se centrifugaron para obtener un sobrenadante, que se diluyó y se mezcló con una solución 10,3 mM en acetonitrilo de N-metil-2-fenilindiol. Tras añadir ácido clorhídrico al 37%, la mezcla se cultivó a 45°C durante 60 minutos. Tras enfriar, se llevó a cabo la centrifugación, obteniendo un sobrenadante transparente, en el que se midió la absorbancia a 590 nm. Se midió el contenido de proteínas mediante la utilización de un kit de medición de proteína BCA y se comparó la concentración de peróxido lípido de la proteína por unidad de peso de proteína con la del control no tratado.

30

35

#### Resultados

La peroxidación de la membrana celular causada por el tratamiento con  $\beta$ -amiloide está indicada por el malondialdehído (MDA) producido a partir de un peróxido lípido. El pretratamiento con GSM o con GSP suprimió la peroxidación de lípido por parte del  $\beta$ -amiloide y el efecto del GSM fue más fuerte, suprimiendo el peróxido lípido hasta el nivel del control no tratado o menos (figura 9).

40

#### Sumario de los resultados

GSM suprimió la muerte de las células nerviosas debida a la toxicidad del  $\beta$ -amiloide al reducir la acumulación de especies de oxígeno activo en las células nerviosas utilizando células PC-12, que son una línea celular modelo de célula nerviosa. El efecto fue superior que el de GSP. Aunque el daño oxidativo a las células se encuentra implicado en la muerte de las células nerviosas debido a la toxicidad por el  $\beta$ -amiloide, GSM suprimió el daño oxidativo a las células y el efecto de GSM fue superior que el de GSP.

50

La supresión de la muerte de las células nerviosas debida al  $\beta$ -amiloide, profundamente implicada en la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, debida a GSM en virtud de su efecto antioxidante, indica que la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer puede resultar suprimido por GSM.

55

#### Ejemplo de ensayo 6

##### *Efecto preventivo de la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ)*

Con el fin de examinar el efecto preventivo de la Sustancia 1 contra la diabetes inducida por STZ en ratones, se utilizó un modelo clínico de condición correspondiente a un estadio inicial de la diabetes inducida por la administración de STZ en múltiples dosis reducidas (MLD).

60

#### Procedimiento

65

Se midieron en ratones Jla:ddy (machos, 7 semanas de edad) peso corporal, nivel sanguíneo de glucosa y nivel de LPO en sangre y se agruparon de la manera siguiente, ecualizando cada grupo.

## ES 2 330 746 T3

- (1) Grupo de control negativo: STZ(-) (n=5, 1 jaula),
- (2) Grupo de control positivo: STZ(+) (n=15, 3 jaulas),
- 5 (3) Grupo de Sustancia 1: STZ(+) + Sustancia 1 (n=10, 2 jaulas) y
- (4) Grupo de Sustancia Comparativa 1: STZ(+) + Sustancia Comparativa 1 (n=10, 2 jaulas).

10 Tras administrar STZ intraperitonealmente a una dosis de 20 mg/kg durante 4 días consecutivos (se llevaron a cabo 2 rondas de esta administración de 4 días), se administró una dosis de 40 mg/kg de STZ intraperitonealmente durante 4 días consecutivos. Se mezcló la Sustancia 1 o la Sustancia Comparativa 1 con pienso en polvo al 0,06% y se dejó que los animales se alimentaran libremente del pienso (a partir de la cantidad de pienso ingerido al día se estimó que la cantidad de Sustancia 1 o de Sustancia Comparativa 1 obtenida al día era de aproximadamente 100 mg/kg). Se fijó el periodo de administración en 5 días antes de iniciar la administración de STZ y hasta 65 días después de iniciar la administración de STZ.

15 Durante el periodo de administración, se recogió sangre y orina y se midió la glucosa en sangre, la glucosa en orina, la proteína en orina, el nitrógeno de urea en sangre (BUN) y LPO/TEAC en sangre (capacidad antioxidante equivalente Trolox). Las figuras 10 a 14 muestran los resultados de las mediciones.

### *Sumario de los resultados*

#### *(1) Niveles plasmáticos de glucosa en ayuno*

25 En la diabetes, el nivel de glucosa en sangre es elevado durante el ayuno, tal como se muestra en la figura 10. Los días 35, 49 y 66 tras la administración de STZ, el grupo de control positivo mostró niveles de glucosa en sangre significativamente más altos que aquellos del grupo de control negativo y se confirmó que se había preparado un modelo de diabetes leve mediante la administración de STZ en múltiples dosis reducidas. El grupo de Sustancia 1 y el grupo de Sustancia Comparativa 1 mostraron niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos que en el grupo de control positivo y el grupo de Sustancia 1 presentó una tendencia a mostrar un efecto más fuerte de reducción del nivel de glucosa en sangre que el grupo de Sustancia Comparativa 1.

#### *(2) Nivel de glucosa en orina*

35 En la diabetes, se incrementa la cantidad de glucosa excretada en la orina. La cantidad de glucosa excretada en la orina se incrementa mucho bajo el tratamiento de STZ, confirmando que se ha inducido diabetes en ratones. Tal como se muestra en la figura 11, el efecto de mejora del nivel de glucosa en orina que se incrementa debido a la STZ, se observó en el grupo de Sustancia 1 y en el grupo de Sustancia Comparativa 1, y se observó una diferencia significativa entre los grupos de Sustancia 1 y de control positivo y también entre el grupo de Sustancia Comparativa 1 y el de control positivo el día 49, respectivamente. Además, el grupo de Sustancia 1 mostró niveles relativamente reducidos en comparación con aquellos de la Sustancia Comparativa 1.

#### *(3) Nivel de proteínas en orina*

45 En la diabetes, se incrementa la cantidad de proteínas excretadas en la orina. Tal como se muestra en la figura 12, la Sustancia 1 y la Sustancia Comparativa 1 pudieron suprimir la fuga de proteínas hacia la orina debido a STZ, y ambas sustancias redujeron significativamente la cantidad de proteínas el día 49 tras la administración de STZ en comparación con el grupo de control positivo. Además, se anticipa que la Sustancia 1 mostrará el efecto en estadios anteriores de este modelo clínico que la Sustancia Comparativa 1.

#### *(4) Indicador de capacidad antioxidante*

##### *(4-1) Nivel de LPO en sangre*

55 Tal como se muestra en la figura 13, se observó una tendencia a que el grupo de Sustancia 1 mostrase valores más bajos que los del grupo de control positivo y que el grupo de Sustancia Comparativa 1.

##### *(4-2) Valor de TEAC en sangre*

60 El procedimiento TEAC (capacidad antioxidante equivalente Trolox) proporciona una evaluación relativa de la intensidad de antioxidación mediante la conversión de la actividad de antioxidación de un compuesto en capacidad antioxidante de Trolox, que es un derivado de  $\alpha$ -tocoferol. Los valores obtenidos mediante el procedimiento TEAC se utilizan ampliamente como indicadores de actividad antioxidante. Tal como se muestra en la figura 14, los valores de actividad antioxidante del grupo de Sustancia Comparativa 1 y del grupo de control positivo eran sustancialmente del mismo nivel el día 49 y el día 66, mientras que los valores del grupo de Sustancia 1 eran elevados, mostrando que este grupo presentaba la actividad antioxidante más elevada.

## ES 2 330 746 T3

### *Sumario*

En modelos de múltiples dosis reducidas de STZ, puede inducirse diabetes leve en ratones y los modelos no muestran grandes diferencias entre modelos individuales en el nivel de glucosa en sangre en comparación con un caso de utilización de modelos de dosis elevada única. Por lo tanto, el modelo de múltiples dosis reducidas de STZ puede considerarse como altamente conveniente para estudiar los efectos de prevención de la diabetes. La Sustancia 1 ha demostrado que suprime el incremento del nivel de glucosa en sangre y el nivel de glucosa en orina implicados en el desarrollo de la condición clínica en el modelo de diabetes y de esta manera presentan efectos preventivos de la diabetes.

En la diabetes inducida por STZ, las células  $\beta$  dañadas letalmente por radicales generados específicamente en las células  $\beta$  pancreáticas inducen diabetes. Presumiblemente, la administración de Sustancia 1 y de Sustancia Comparativa 1 a partir de los 5 días anteriores a la administración de STZ, puede incrementar preventivamente la actividad antioxidante en el cuerpo, de manera que puede aliviarse el daño a las células  $\beta$  causado por la STZ.

Los resultados de los ensayos de LPO y de TEAC en sangre demostraron que la Sustancia 1 incrementa significativamente la capacidad antioxidante de la sangre. Es un hecho bien conocido en la técnica que radicales tales como el monóxido de nitrógeno y el oxígeno activo se encuentran implicados en la destrucción de los islotes de Langerhans pancreáticos en la diabetes insulino-dependiente, y se está demostrando mediante ensayos en el cuerpo humano que la supresión del daño celular causado por los radicales libres puede aliviar la diabetes. Por lo tanto, los resultados demostraron que la Sustancia 1 presenta un efecto preventivo en personas sanas que son candidatos potenciales a la diabetes y efectos adicionales de supresión del desarrollo de condiciones clínicas en estadios más tempranos de la diabetes.

### Ejemplo de ensayo 7

#### *Ensayos comparativos en un modelo de rata de insuficiencia renal aguda inducida por bromato de potasio*

Con el fin de elucidar el nivel de la capacidad antioxidante de la Sustancia 1 en comparación con otros materiales polifenol antioxidantes, se llevaron a cabo ensayos comparativos en modelos de rata de insuficiencia renal aguda inducida por bromato de potasio.

#### *Procedimiento*

Ratas Wistar (macho, 12 semanas de edad), divididas de la manera siguiente:

grupo de control negativo: bromato de potasio (-) (n=5),

grupo de control positivo: bromato de potasio (+) (n=5),

grupo de Sustancia 1 (derivada de semillas de uva): bromato de potasio (+) + Sustancia 1 (n=5)

grupo de Sustancia 5 (derivada de corteza de pino): bromato de potasio (+) + Sustancia 5 (n=5),

grupo de Sustancia Comparativa 2 (catequina): bromato de potasio (+) + Sustancia Comparativa 2 (n=5),

grupo de Sustancia Comparativa 3 (extracto de hoja de Ginkgo): bromato de potasio (+) + Sustancia Comparativa 3 (n=5),

grupo de Sustancia Comparativa 4 (derivado de corteza de pino): bromato de potasio (+) + Sustancia Comparativa 4 (n=5),

grupo de Sustancia Comparativa 5 (extracto de cacao): bromato de potasio (+) + Sustancia Comparativa 5 (n=5).

Se administró intraperitonealmente bromato de potasio en una dosis única de 65 mg/kg de peso corporal. Se administraron oralmente la Sustancia 1, la Sustancia 5 y cada sustancia comparativa cada día una vez al día en una dosis de 10 mg/kg de peso corporal 1 semana (día -7) antes del inicio (día 0) de la administración de bromato de potasio hasta el día posterior al día 0. En el día de la administración de bromato de potasio, las sustancias se administraron 30 minutos antes o después de la administración de bromato de potasio. Los días -7, 0 y 2, se recogió sangre de la vena cervical y se midieron los niveles de polifenol, peróxido lípido, TEAC, nitrógeno de urea y creatinina en la sangre.

#### *Resultados*

Debido a que los efectos de la Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa sobre la insuficiencia renal aguda inducida por bromato de potasio son atribuibles a la acción antioxidante, se examinó el nivel de polifenoles en sangre, la capacidad antioxidante en la sangre (TEAC) y el nivel de peróxidos lípidos sanguíneos como indicadores de antioxidación, y el nivel de nitrógeno de urea en sangre y el nivel de creatinina sanguínea como indicadores del resultado clínico en la insuficiencia renal. Las figuras 15 a 19 muestran las mediciones de los mismos.

## ES 2 330 746 T3

### (1) *Índice de antioxidación*

#### (1-1) *Nivel de polifenoles en sangre*

5 Tal como se muestra en la figura 15, el nivel inicial de polifenoles sanguíneos antes de la administración de bromato de potasio era constante para cada grupo, mientras que, tras la administración de Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa durante 7 días, el grupo de Sustancia 1 mostró el valor más alto, seguido del grupo de Sustancia Comparativa 2, el día 0 desde la administración de bromato de potasio. Se confirmó que la administración de Sustancia 1 incrementaba el nivel de polifenoles sanguíneos y la tasa de incremento de los mismos era significativamente más  
10 alta que la de cada sustancia comparativa.

#### (1-2) *Capacidad antioxidante en la sangre (TEAC)*

15 Tal como se muestra en la figura 16, la preadministración de Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa durante 1 semana causó que la capacidad antioxidante en la sangre mostrase una tendencia a incrementarse, y el incremento de la capacidad antioxidante por la administración de Sustancia 1 fue significativo en comparación con cada uno de los grupos en los que se había administrado una sustancia comparativa.

#### (1-3) *Nivel de peróxidos lípidos sanguíneos*

20 La preadministración de Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa durante 1 semana suprimió el incremento del nivel de peróxido lípido sanguíneo causado por la administración de bromato de potasio. Tal como se muestra en la figura 17, su efecto fue más alto en el grupo de Sustancia 1, y el grupo de Sustancia 1 mostró un valor significativamente inferior al de cada sustancia comparativa.

### (2) *Índices de condición clínica*

#### (2-1) *Nivel de nitrógeno de urea en sangre*

30 Tal como se muestra en la figura 18, la administración de bromato de potasio incrementó significativamente el nivel de nitrógeno de urea en sangre en comparación con los casos en los que no se había administrado tratamiento. La administración de Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa suprimió el incremento del nivel de nitrógeno de urea en sangre causado por la administración de bromato de potasio, y la supresión del incremento del nivel de nitrógeno de urea en sangre por la administración de Sustancia 1 fue significativo en comparación con cada grupo de administración  
35 de sustancia comparativa.

#### (2-2) *Nivel de creatinina sanguínea*

40 Tal como se muestra en la figura 19, la administración de bromato de potasio incrementó significativamente el nivel de creatinina sanguínea en comparación con los casos en los que no se había administrado tratamiento. La administración de Sustancia 1 y de cada sustancia comparativa suprimió el incremento del nivel de creatinina sanguínea causado por la administración de bromato de potasio, y la supresión del incremento del nivel de creatinina sanguínea por la administración de Sustancia 1 fue significativo en comparación con cada grupo de administración de sustancia comparativa.

### *Sumario*

50 Las Sustancias Comparativas 3, 4 y 5 son materiales ricos en polímero de proantocianidina (peso molecular elevado) y muestran una actividad antioxidante elevada *in vitro*. Sin embargo, la Sustancia 1 con un peso molecular reducido presentó una actividad antioxidante más alta que cada sustancia comparativa al administrarla en un organismo. En comparación con la Sustancia Comparativa 2, que es un monómero (catequina), la Sustancia 1 mostró una actividad todavía más alta. A partir de la cantidad de polifenol en sangre se demostró que la Sustancia con un peso molecular reducido presentaba una excelente absorbabilidad en un cuerpo vivo y mostraba actividad antioxidante en el organismo. La preadministración de Sustancia 1 incrementó la capacidad antioxidante en sangre y mostró actividad  
55 antioxidante. Como resultado, lo anterior suprimió el incremento del nivel de peróxidos lípidos sanguíneos causado por la administración de bromato de potasio, suprimió la insuficiencia renal y de esta manera suprimió la fuga de nitrógeno de urea y de creatinina hacia la sangre. El efecto fue significativamente más alto que el de cada sustancia comparativa, y presentó una propiedad antioxidante excelente al administrarla en un organismo en comparación con los materiales de polifenol basados en polifenol de elevado peso molecular y monómero (catequina) conocidos hasta  
60 el momento.

### *Seguridad de la sustancia inventiva*

65 Se evaluó la seguridad mediante ensayos de toxicidad de administración de dosis única. Es decir, se administró por vía oral forzosamente la Sustancia 1 en dosis de 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 g por kg de peso corporal a 8, 7, 3 y 18 ratones ddY (9 semanas de edad, machos), respectivamente. Se observaron los cambios de comportamiento y las muertes tras la administración y se calculó la LC50. Se obtuvo el resultado de concentración letal al 50% (LC50) de

## ES 2 330 746 T3

la Sustancia 1 de 5,0 g/kg de peso corporal (límites de confianza al 95%: 3,5 a 6,4 g/kg de peso corporal). Además, no se observó anomalía del comportamiento tras la administración ni anomalías en la observación de la disección al completar los ensayos. Los resultados anteriores confirmaron que la Sustancia 1 es un alimento extremadamente seguro.

En el Ejemplo de ensayo 4 mencionado anteriormente (ensayo de seguimiento en seres humanos), mediante cuestionarios se recogieron los comentarios de los sujetos de ensayo. De entre los mismos, la Tabla 10 muestra los resultados relativos al sueño, y la Tabla 11 muestra los resultados de fatiga, claridad de pensamiento y función estomacal mediante la evaluación en 5 etapas.

TABLA 10

Grupo	Edad	Sexo	Comentarios tras la utilización
Sustancia 1	49	Macho	Facilidad para levantarse
Sustancia 1	43	Macho	Mejóro la calidad del sueño
Sustancia 1	57	Macho	Despertar agradable durante la mañana
Sustancia comparativa 1	27	Hembra	Fatiga al despertarse
Sustancia comparativa 1	34	Macho	Somnolencia y dificultad para levantarse
Sustancia comparativa 1	43	Macho	Dificultades para levantarse

TABLA 11

	Puntuación media del cuestionario mediante evaluación en 5 etapas		
	Sensación de fatiga	Claridad de pensamiento	Función del estómago
Sustancia comparativa 1	2,8(3,2)	3,7(3,3)	3,9(3,5)
Sustancia 1	3,2(2,9)	3,7(3,3)	3,8(3,5)

(un número mayor indica mejores condiciones; los números entre paréntesis corresponden a antes de la administración).

REIVINDICACIONES

5 1. Composición que comprende un oligómero de proantocianidina azufrado como componente principal, en la que el oligómero se obtiene mediante concentración y secado de una solución de reacción preparada haciendo reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o su extracto con un compuesto que contiene grupo SH, que es por lo menos uno seleccionado de entre un grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen grupo SH y sus sales.

10 2. Composición de oligómero de proantocianidina azufrado según la reivindicación 1, en la que el oligómero es uno seleccionado de entre un dímero a pentámero de la proantocianidina.

15 3. Composición de oligómero de proantocianidina azufrado según la reivindicación 1, en la que la planta que contiene proantocianidinas es una o más seleccionada de entre un grupo constituido por verduras, frutas, té, hierbas, especias, maderas y cortezas.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir las enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una composición farmacéutica para prevenir el envejecimiento.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una composición alimenticia natural destinada a aliviar y/o prevenir las enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una composición alimenticia natural destinada a prevenir el envejecimiento.

30 8. Oligómero de proantocianidina azufrado, que se obtiene mediante fraccionamiento de componentes que contienen un oligómero de proantocianidina azufrado preparado haciendo reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o su extracto con un compuesto que contiene grupo SH tal como se describe en la reivindicación 1.

9. Oligómero de proantocianidina azufrado según la reivindicación 8, en el que el oligómero es uno seleccionado de entre un dímero a pentámero de proantocianidina.

35 10. Procedimiento para producir una composición de oligómero de proantocianidina azufrado, en el que se hace reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o su extracto con un compuesto que contiene grupo SH bajo una condición ácida y la solución de reacción se concentra y se seca, en el que el compuesto que contiene grupo SH es por lo menos uno seleccionado de entre un grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen grupo SH y sus sales.

40 11. Procedimiento para producir una composición de oligómero de proantocianidina azufrado, en el que se hace reaccionar una planta que contiene proantocianidinas o su extracto con un compuesto que contiene grupo SH bajo una condición ácida y la solución de reacción se concentra y se fracciona, en el que el compuesto que contiene grupo SH es por lo menos uno seleccionado de entre un grupo constituido por cisteína, cistina, glutatión, péptidos que contienen grupo SH y sus sales.

45 12. Procedimiento de producción según la reivindicación 10 u 11, en el que la planta que contiene proantocianidinas es una o más seleccionadas de entre un grupo constituido por verduras, frutas, té, hierbas, especias, maderas y cortezas.

13. Procedimiento de producción según la reivindicación 10 u 11, en el que la condición ácida se obtiene mediante la utilización de uno o ambos de entre un ácido inorgánico y un ácido orgánico.

50 14. Procedimiento de producción según la reivindicación 13, en el que se utiliza por lo menos uno seleccionado de entre un grupo constituido por ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico.

60

65

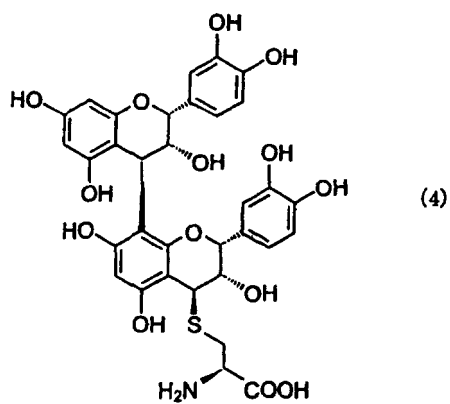
15. Compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (4).

5

10

15

20



16. Compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (5).

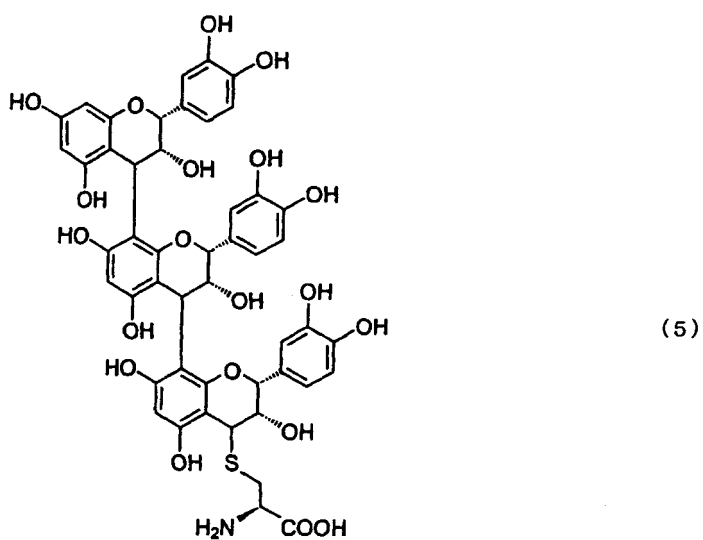
25

30

35

40

45



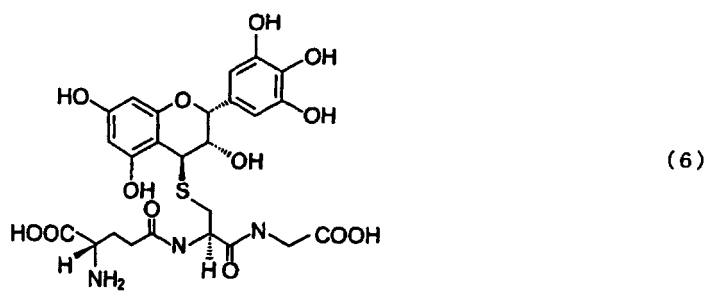
17. Compuesto representado por la fórmula (6).

50

55

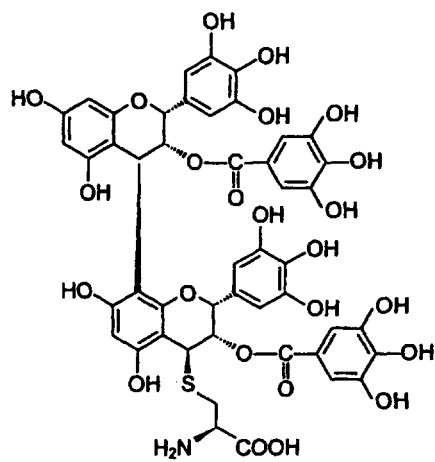
60

65



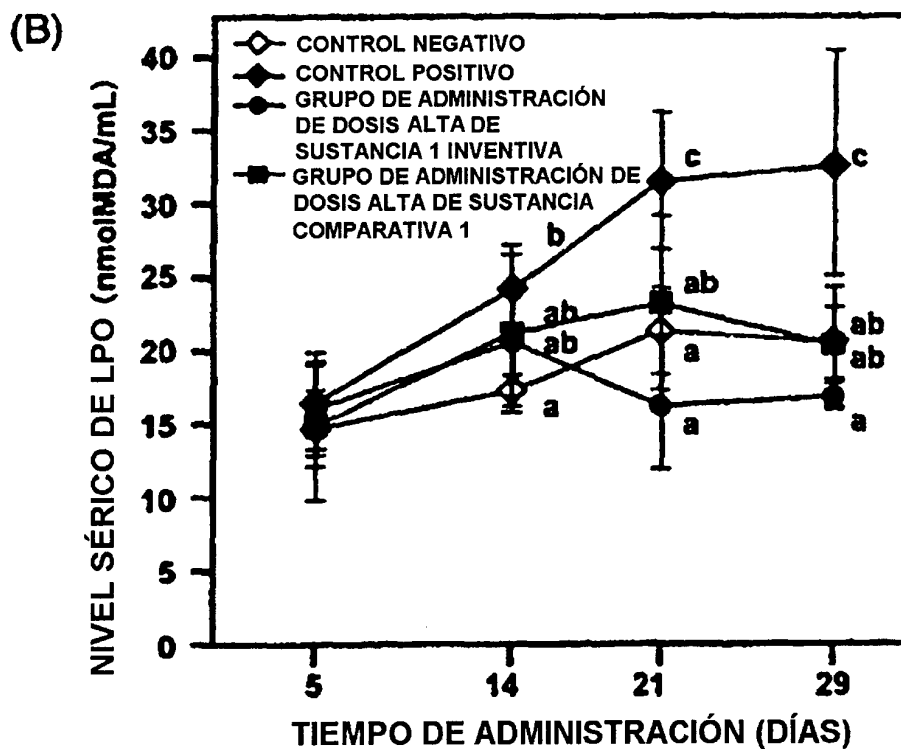
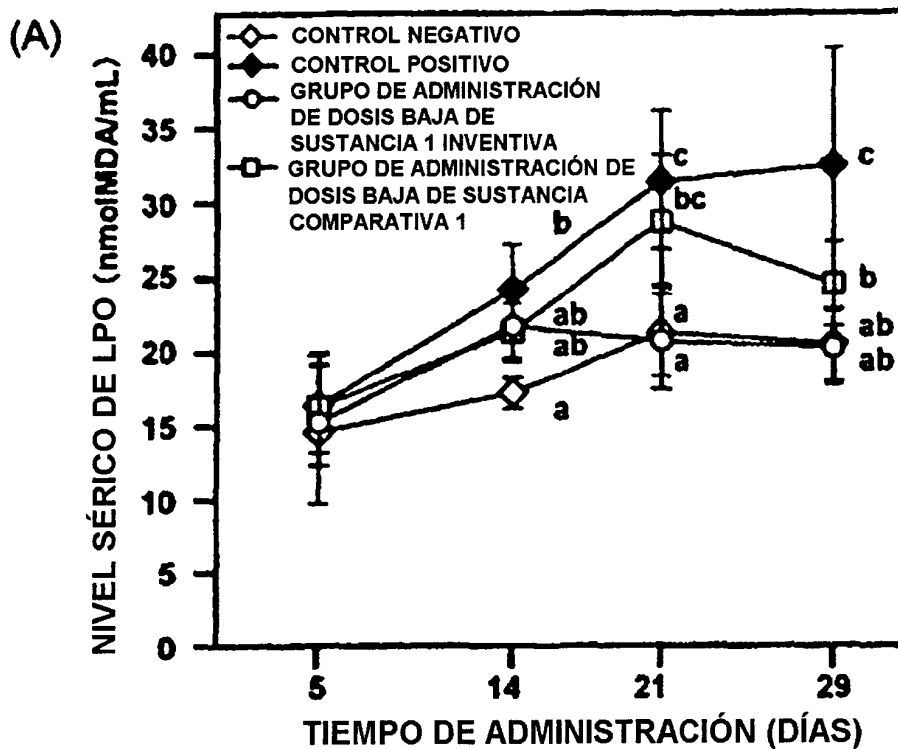
18. Compuesto de proantocianidina representado por la fórmula (8).

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



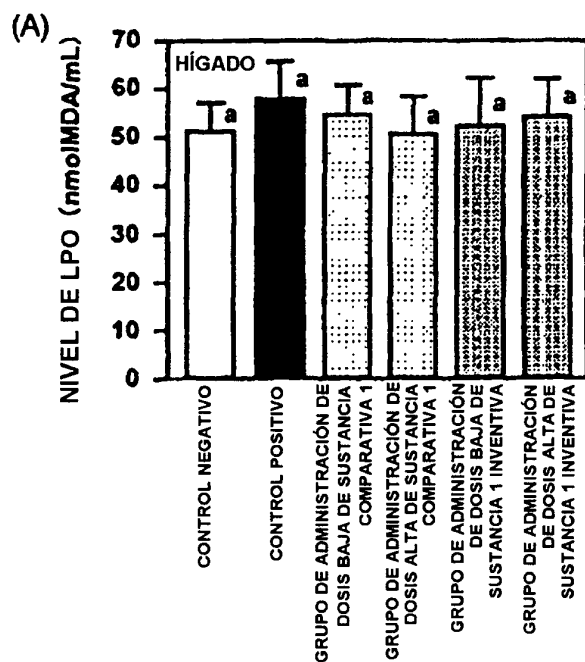
(8)

Fig.1

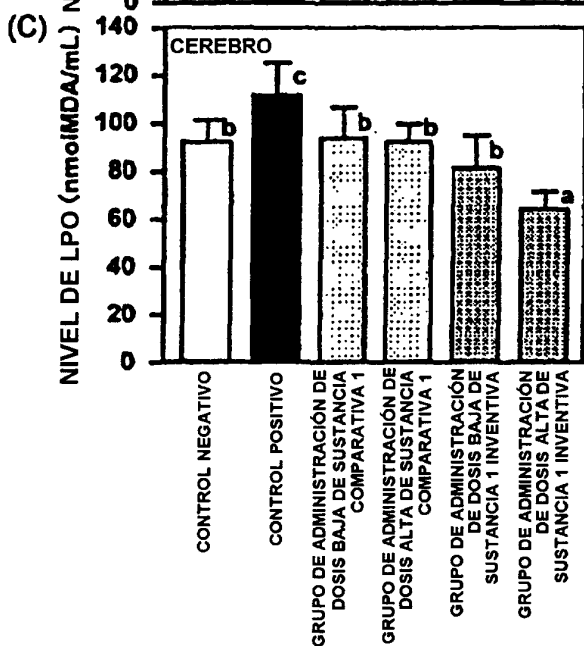
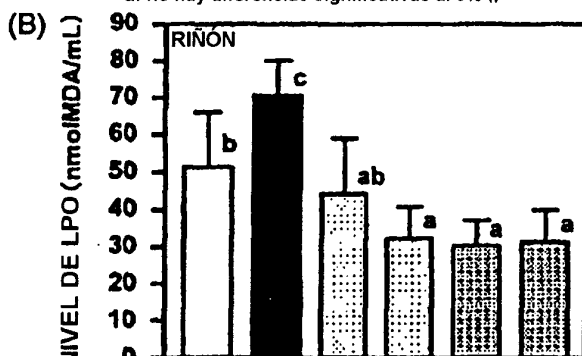


a,b,c: diferencias significativas al 5% entre grupos con diferente letra (prueba múltiple de Duncan)

Fig.2

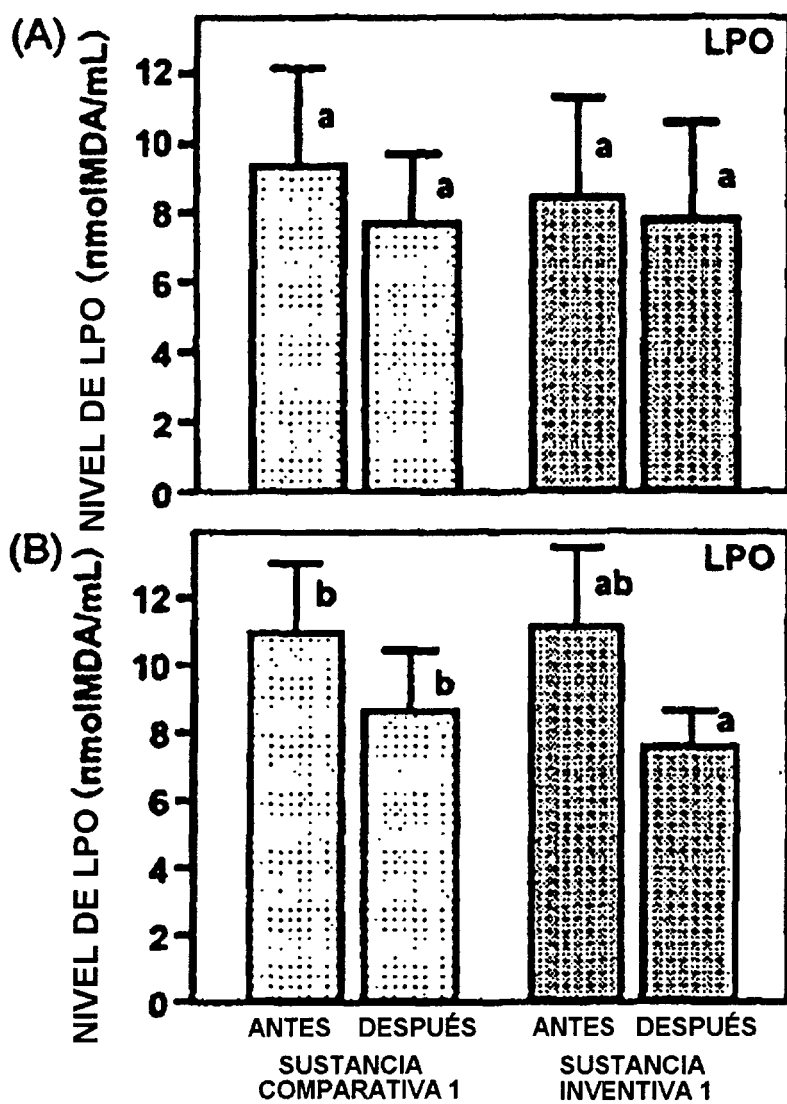


a: no hay diferencias significativas al 5% (prueba múltiple de Duncan)



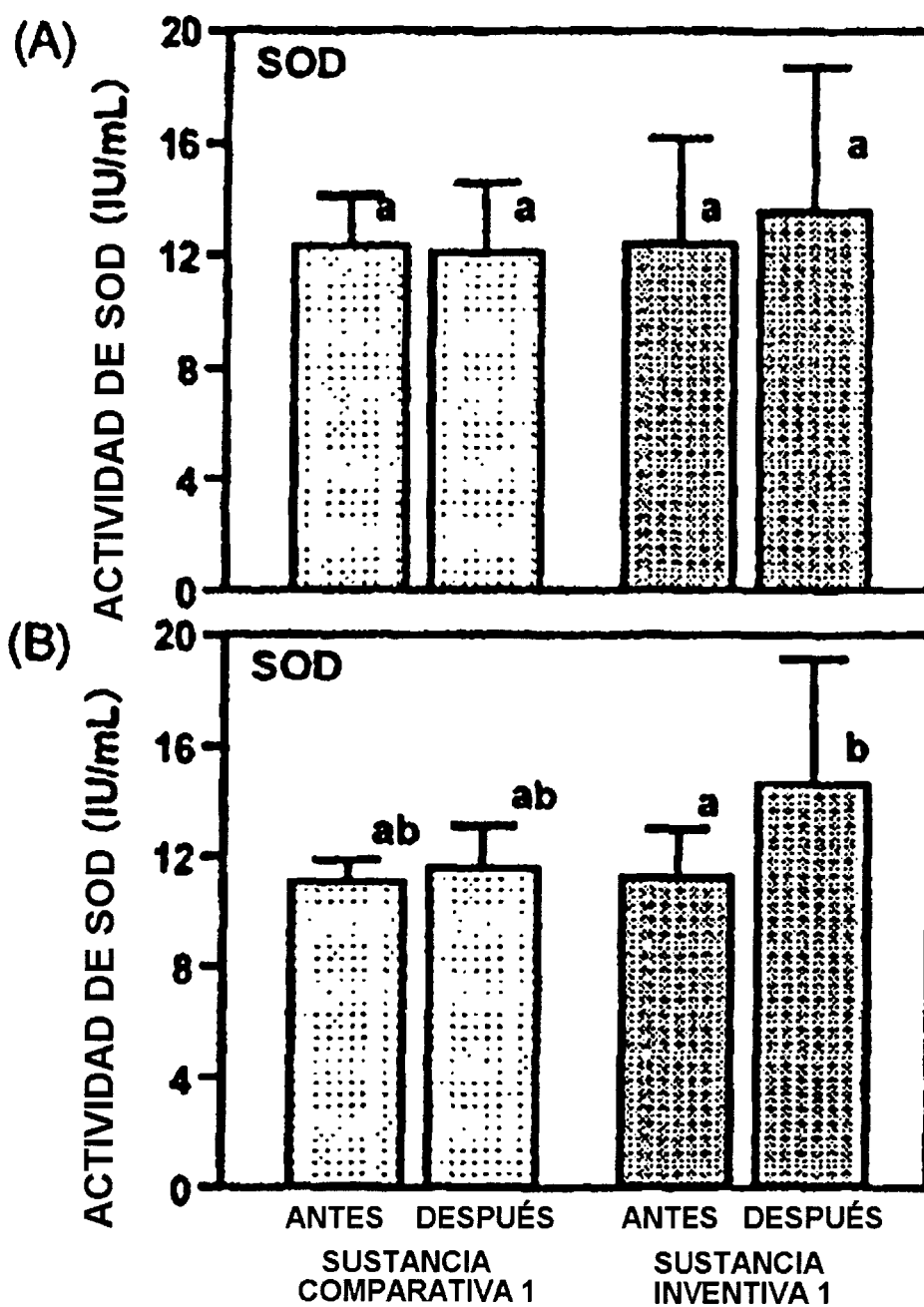
a,b,c: diferencias significativas al 5% entre grupos con diferente letra (prueba múltiple de Duncan)

Fig.3



a,b: diferencias significativa al 1% entre grupos con diferente letra (prueba múltiple de Duncan)

Fig.4



a,b: diferencias significativa al 1% entre grupos con diferente letra (prueba múltiple de Duncan)

Fig.5

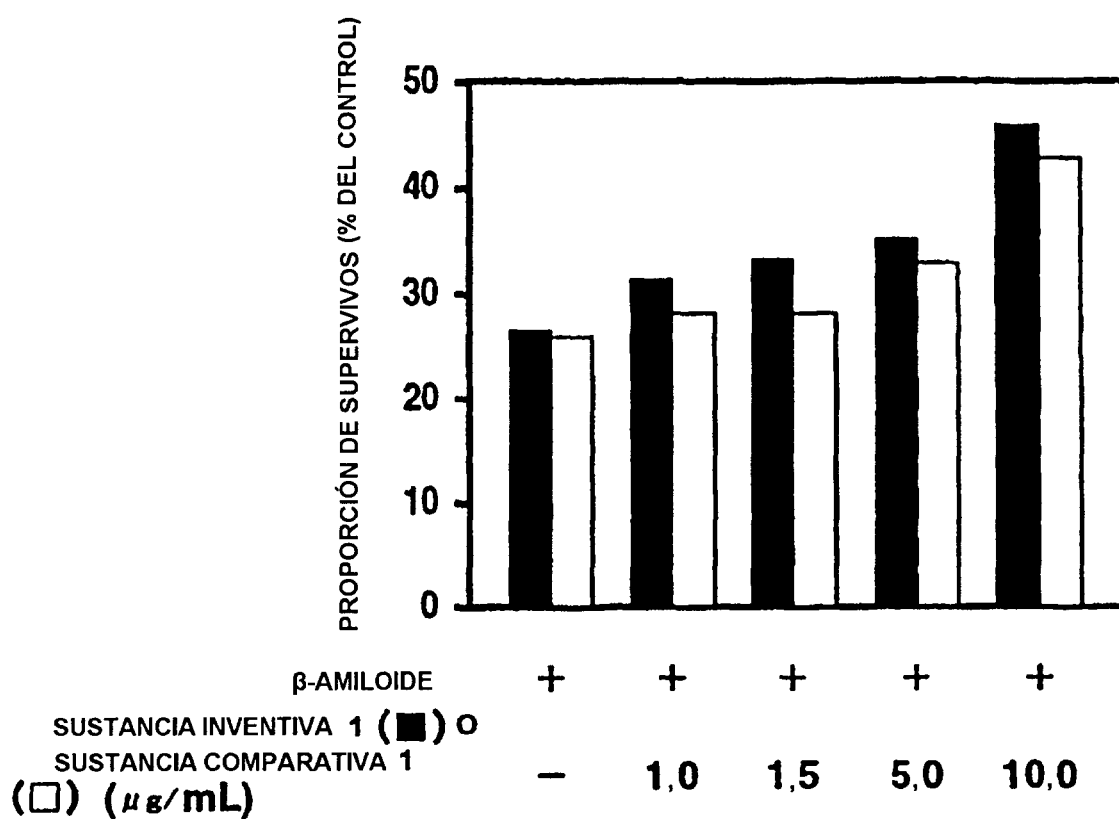
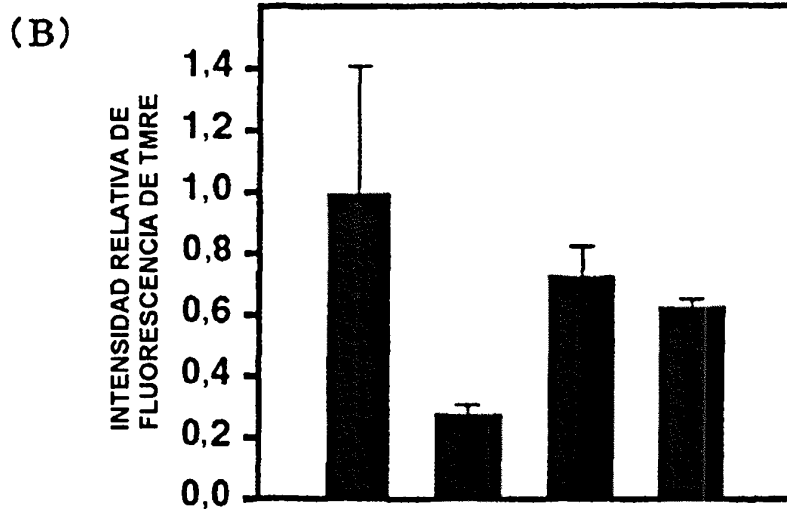
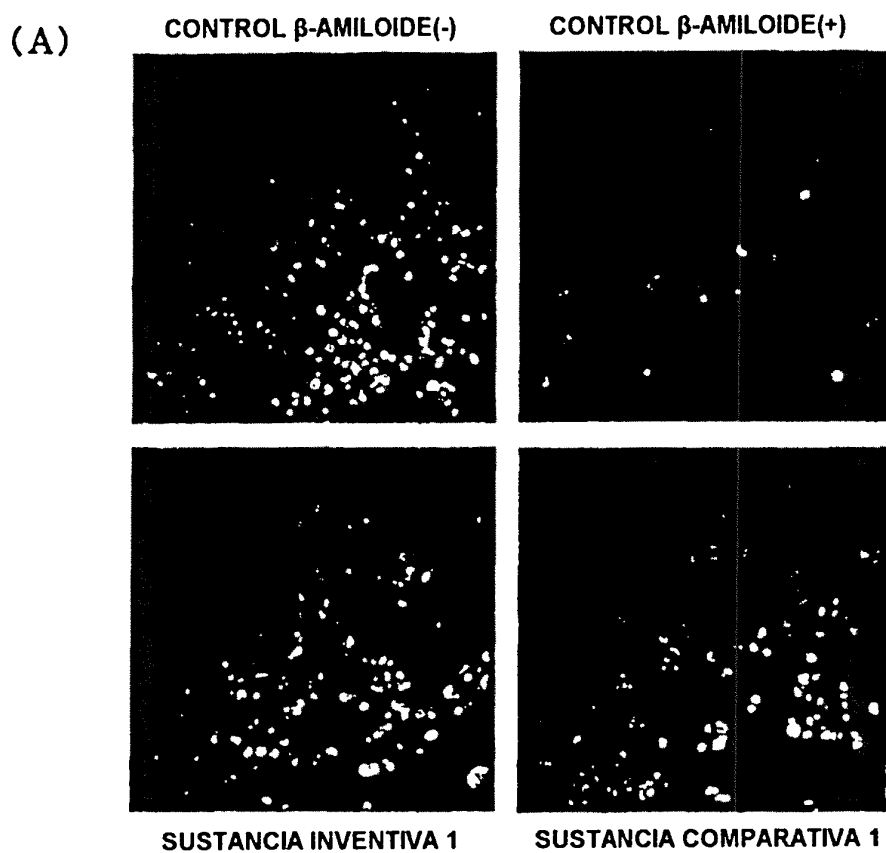
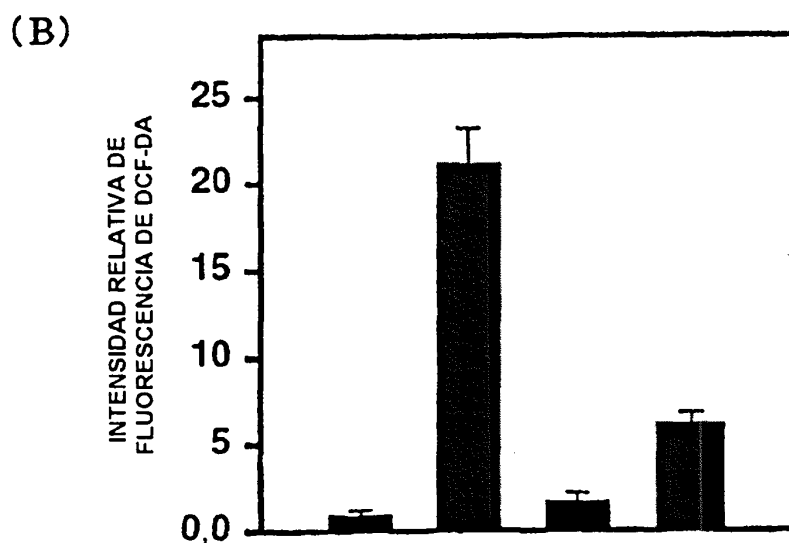
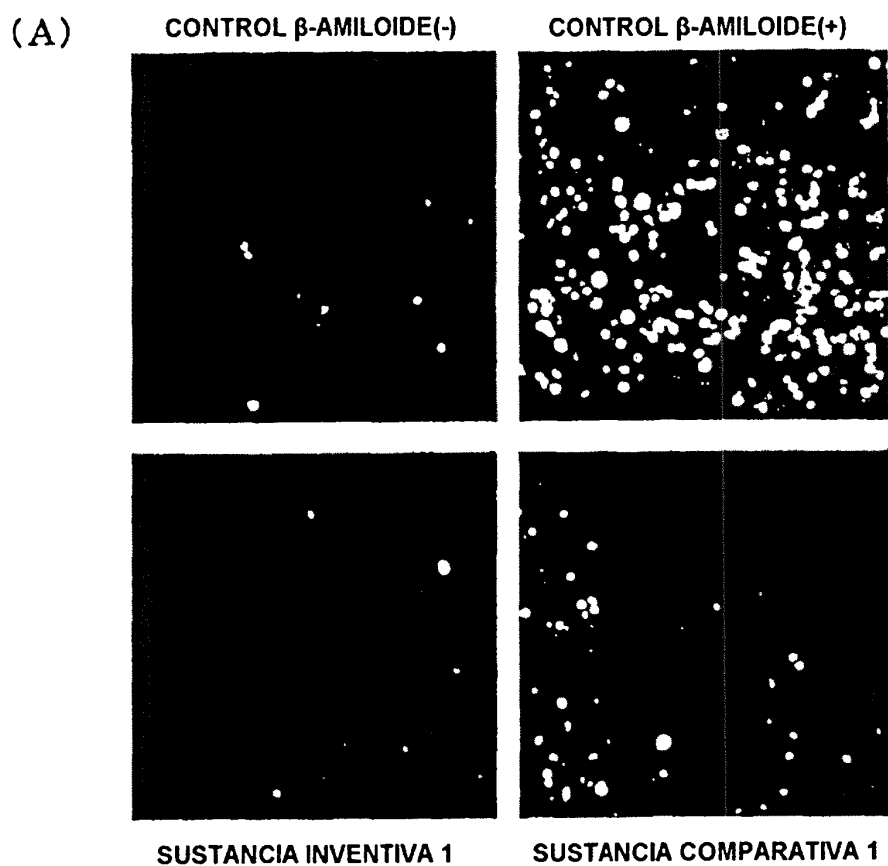


Fig.6



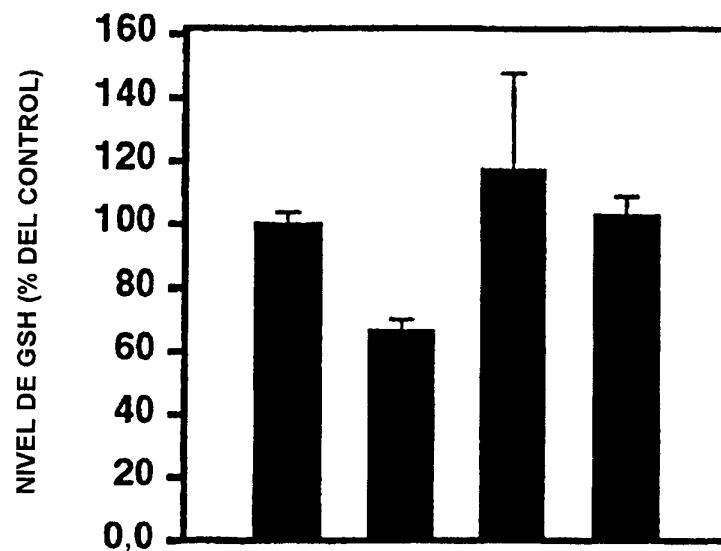
$\beta$ -AMILOIDE	-	+	+	+
SUSTANCIA INVENTIVA 1	-	-	+	-
SUSTANCIA COMPARATIVA 1	-	-	-	+

Fig.7



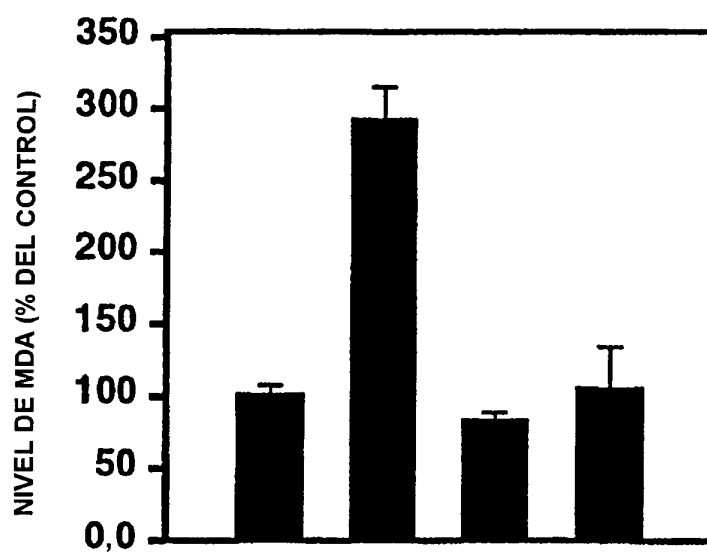
$\beta$ -AMILOIDE	-	+	+	+
SUSTANCIA INVENTIVA 1	-	-	+	-
SUSTANCIA COMPARATIVA 1	-	-	-	+

Fig.8



β-AMILOIDE	-	+	+	+
SUSTANCIA INVENTIVA 1	-	-	+	-
SUSTANCIA COMPARATIVA 1	-	-	-	+

Fig.9



β-AMILOIDE	-	+	+	+
SUSTANCIA INVENTIVA 1	-	-	+	-
SUSTANCIA COMPARATIVA 1	-	-	-	+

Fig.10

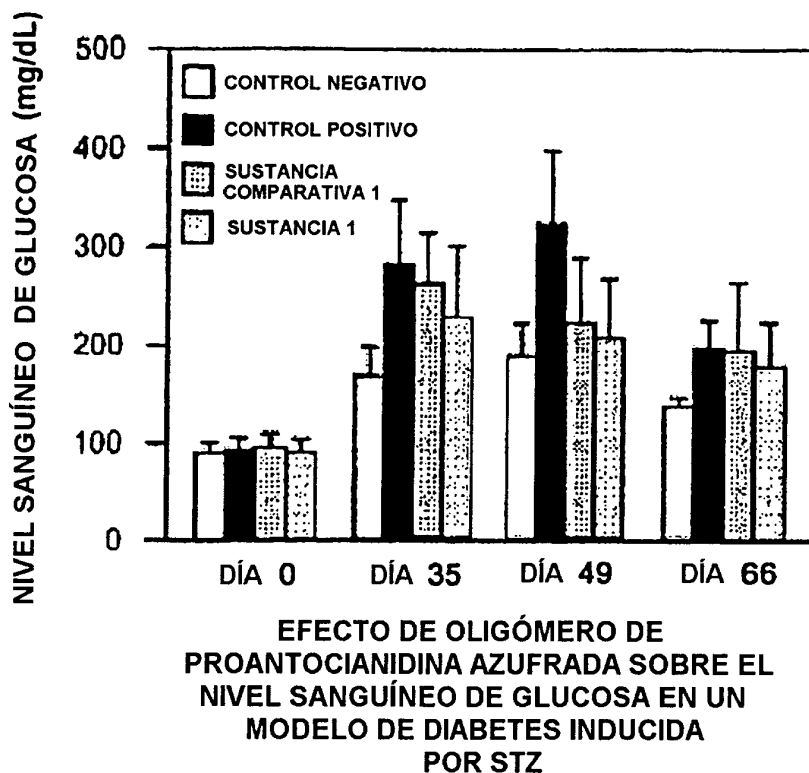


Fig.11

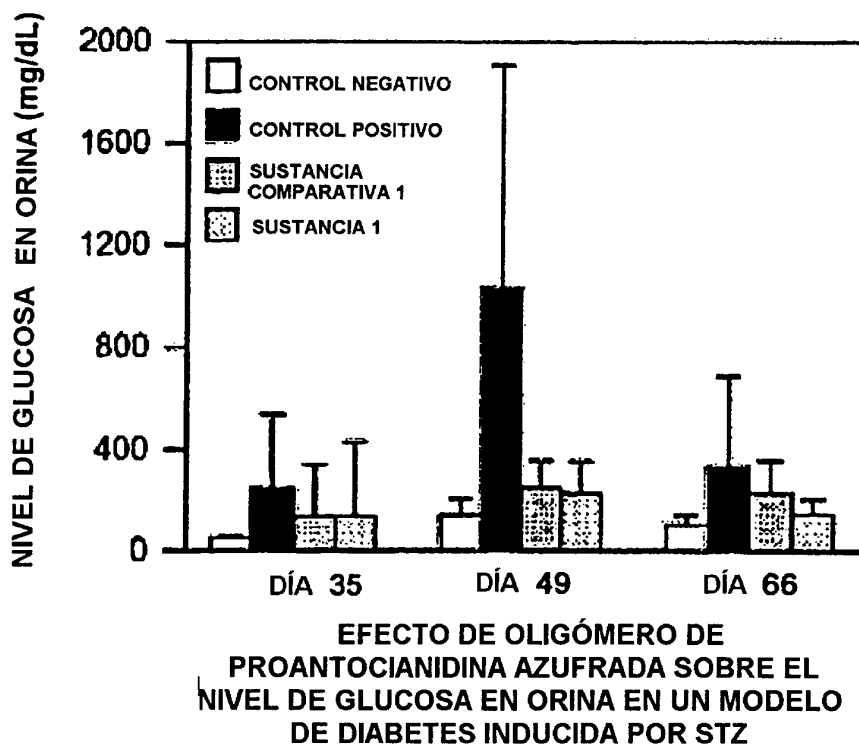
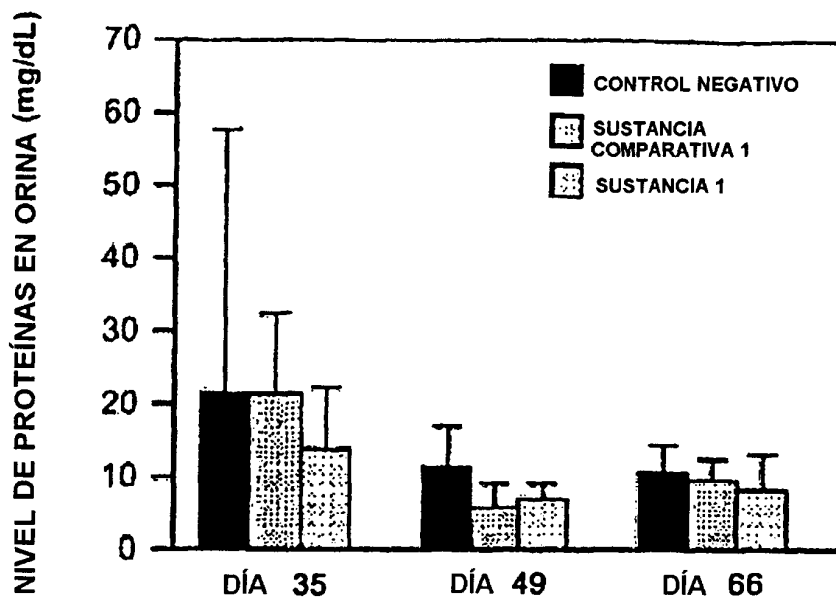
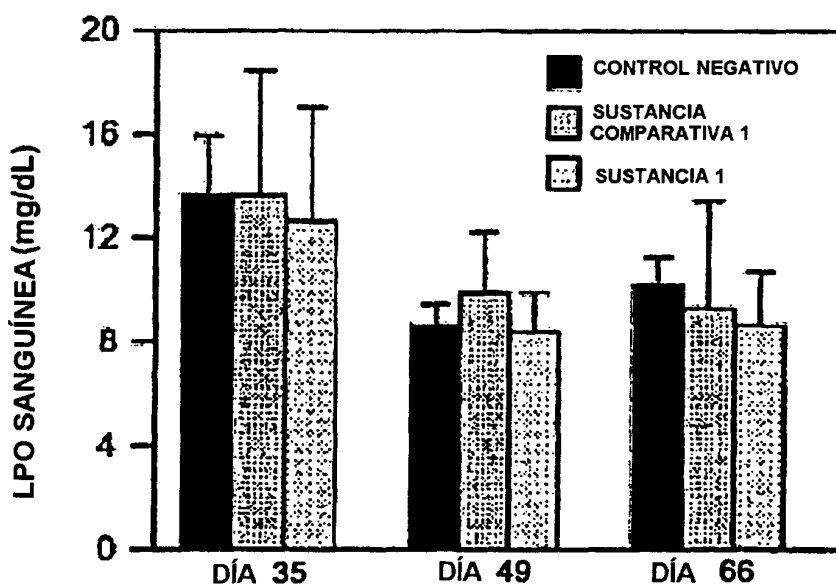


Fig.12



EFFECTO DE OLIGÓMERO DE PROANTOCIANIDINA AZUFRADA SOBRE LAS PROTEÍNAS ÚRICAS EN UN MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR STZ

Fig.13



EFFECTO DE OLIGÓMERO DE PROANTOCIANIDINA AZUFRADA SOBRE LOS LPO EN SANGRE EN UN MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR STZ

Fig.14

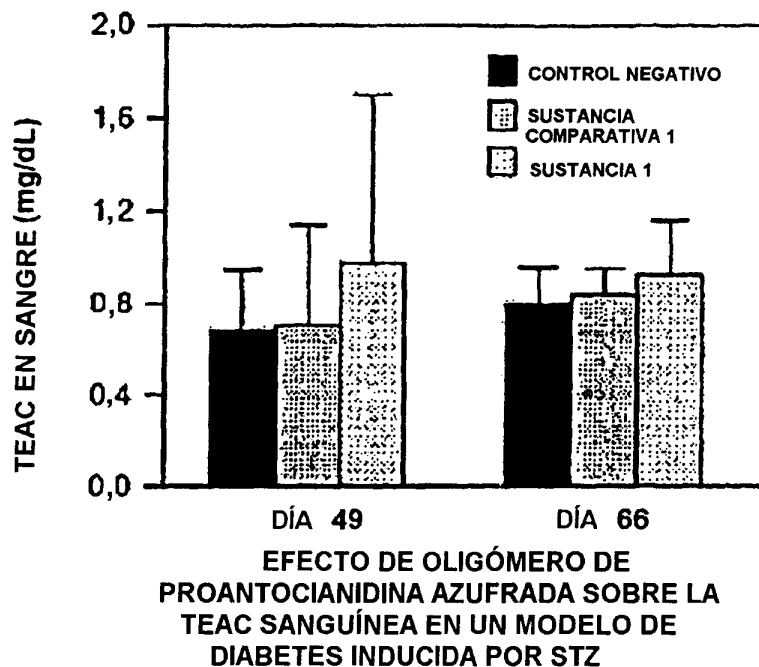


Fig.15

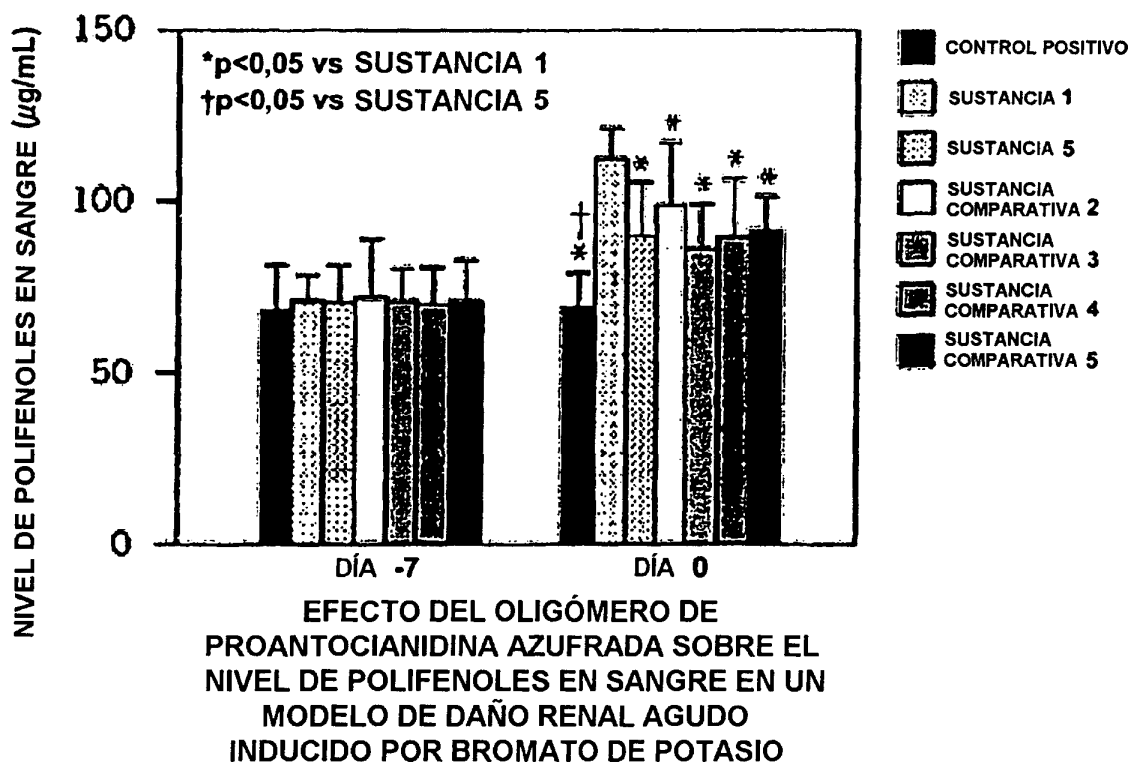


Fig.16

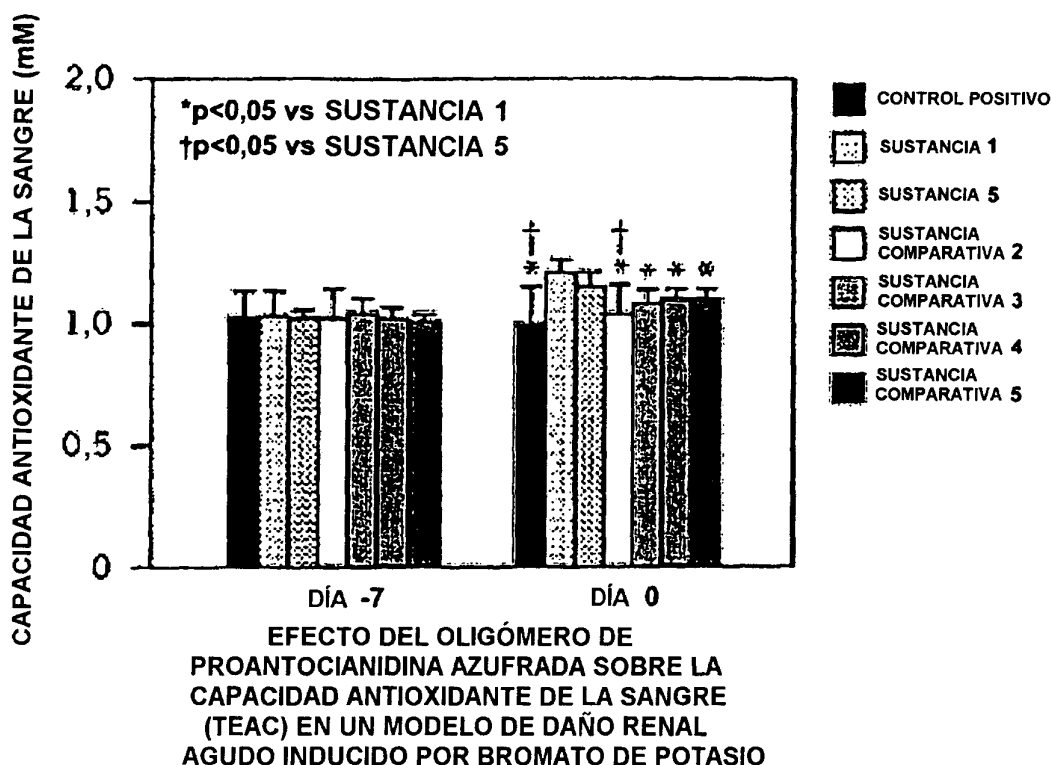


Fig.17

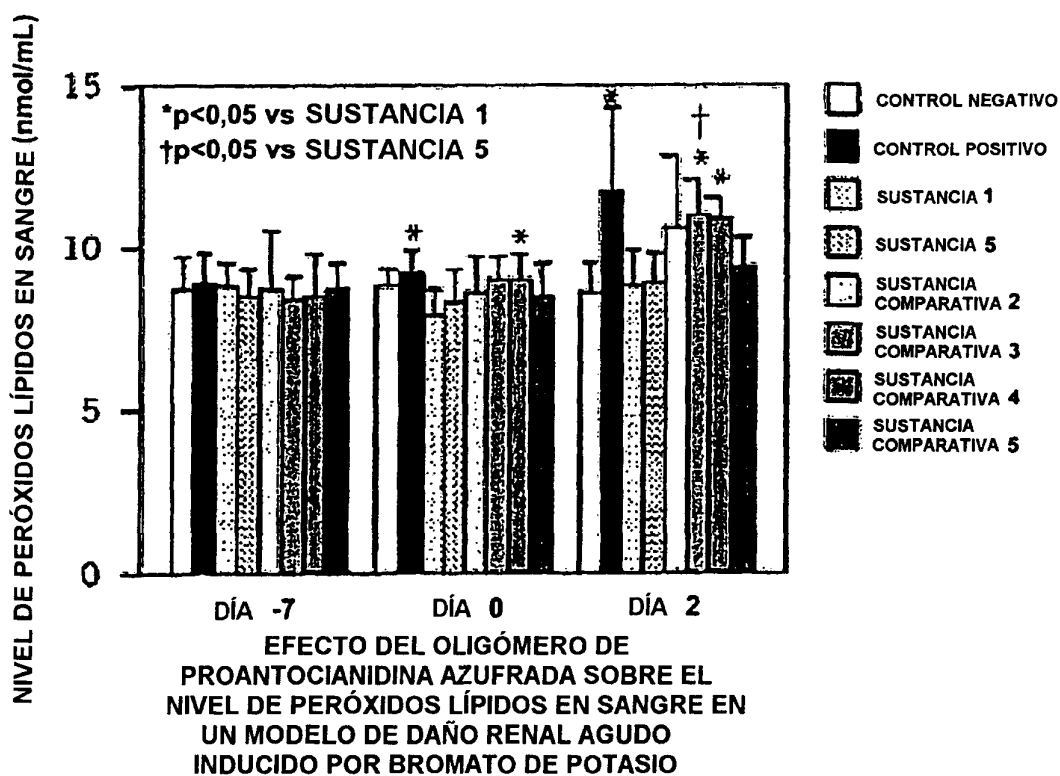
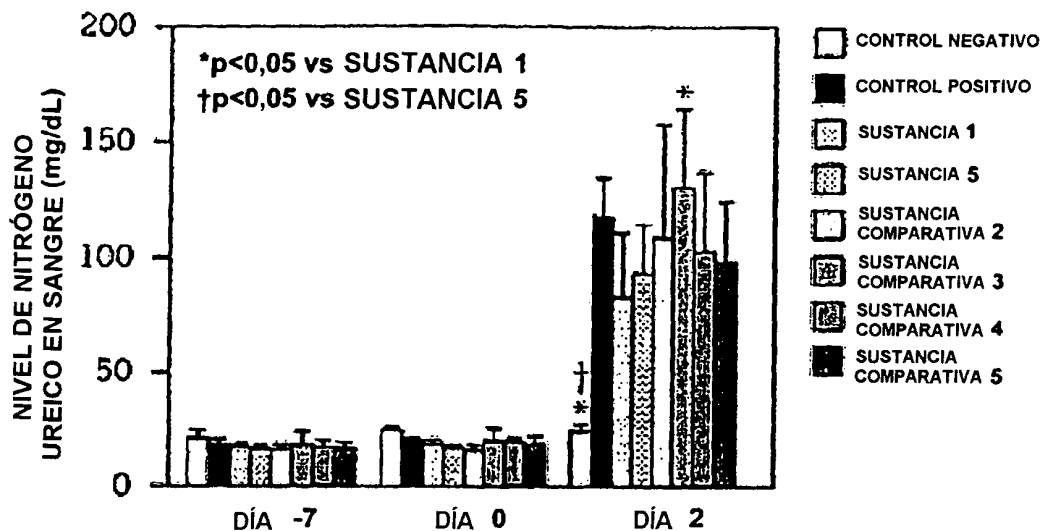
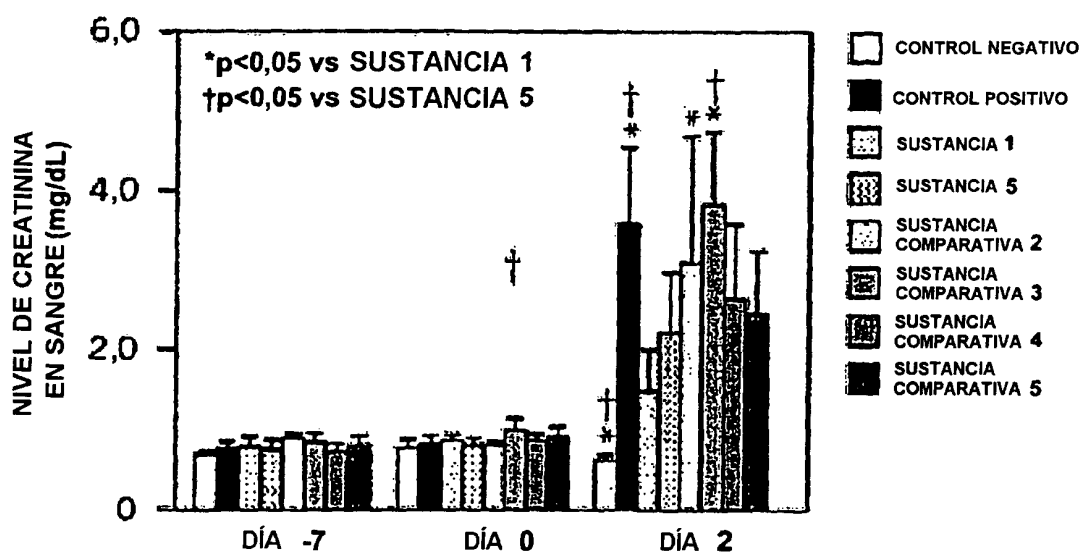


Fig.18



EFFECTO DEL OLIGÓMERO DE PROANTOCIANIDINA AZUFRAO SOBRE EL NIVEL DE NITRÓGENO UREICO EN SANGRE EN UN MODELO DE LESIÓN RENAL AGUDA INDUCIDA POR BROMATO POTÁSICO

Fig.19



EFFECTO DEL OLIGÓMERO DE PROANTOCIANIDINA AZUFRAO SOBRE EL NIVEL DE CREATININA EN SANGRE EN MODELO DE LESIÓN RENAL AGUDA INDUCIDA POR BROMATO POTÁSICO