

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
27 de Marzo de 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 03/024951 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>:  
C07D 311/32, A61K 31/353

Gran Vía de las Cortes Catalanas, 585, E-08007 Barcelona  
(ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00438

(74) Mandatario: **REPRESA SÁNCHEZ, Domingo**; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Oficina de Transferencia y Tecnología, C/ Serrano, 113 - 2ª planta, E-28006 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:  
17 de Septiembre de 2002 (17.09.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 0102081  
17 de Septiembre de 2001 (17.09.2001) ES

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*):  
**CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE BARCELONA** [ES/ES]; c/ Gran Vía de las Cortes Catalanas, 585, E-08007 Barcelona (ES).

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **TORRES SIMÓN, Josep Lluís** [ES/ES]; Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales "Josep Pascual Vila", C/ Jorge Girona, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **LOZANO PÉREZ, Carles** [ES/ES]; Instituto Investigaciones Químicas y Ambientales "Josep Pascual Vila", C/ Jorge Girona, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). **CASCANTE SERATOSA, Marta** [ES/ES]; Universidad de Barcelona, C/

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: FLAVONOL AND CYSTEINE CONJUGATES

(54) Título: CONJUGADOS DE FLAVANOLES Y CISTEÍNA

(57) Abstract: The invention relates to novel products produced from the conjugation of flavonols with cysteine. The novel molecules are obtained from polyphenolic plant extracts by means of conjugation with the natural cysteine amino acid. In this way, novel products with antioxidant/antiradical properties are generated which can be used as agents to protect the body against disorders such as cancer, cardiovascular diseases and premature ageing. The resulting pure molecules are more effective antioxidants than the individual components (flavonols and cysteine) thereof. The concept of novel products derived from cysteine having antioxidant properties extends from the pure molecules to mixtures thereof, thiolysis crudes and partially purified fractions. The invention also relates to the method of isolating and purifying the novel compounds using complex mixtures.

(57) Resumen: Conjugados de flavanoles y cisteína. La presente invención se refiere a nuevos productos que resultan de la conjugación de flavanoles con cisteína. Las nuevas moléculas se obtienen a partir de extractos polifenólicos de plantas por conjugación con el aminoácido natural cisteína. De esta manera se generan nuevos productos con propiedades antioxidantes/antiradicalarias con aplicación como agentes protectores del organismo contra trastornos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro. Las moléculas resultantes puras son antioxidantes más eficientes que sus componentes (flavanoles y cisteína) por separado. El concepto de nuevos productos derivados de cisteína con propiedades antioxidantes se extiende desde las moléculas puras hasta sus mezclas, los crudos de tiólisis y fracciones parcialmente purificadas. La invención se refiere también al método de aislamiento y purificación de los nuevos compuestos a partir de mezclas complejas.

WO 03/024951 A1

## Conjugados de flavanoles y cisteína

### Sector de la técnica

- 5 En la presente invención se describen nuevos productos con propiedades antioxidantes con aplicación como agentes protectores del organismo contra trastornos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro. Tales productos resultan de la conjugación de flavanoles con cisteína. Las nuevas moléculas se obtienen a partir de extractos polifenólicos de plantas, los cuales son ricos en procianidinas y prodelfinidinas oligoméricas y poliméricas, por conjugación con el aminoácido natural
- 10 cisteína. Los nuevas moléculas son conjugados que constan de dos tipos de componentes –catequinas y cisteína- con propiedades antioxidantes complementarias. La invención se refiere también a la obtención de estos nuevos agentes a partir de materia prima residual proveniente de la industria agroalimentaria.
- 15 Los compuestos resultantes son antioxidantes más eficientes que sus componentes (catequinas y cisteína) por separado y que las mezclas de tales componentes. Aparte de esto las mezclas de las nuevas moléculas puras así como las mezclas parcialmente purificadas presentan también propiedades antioxidantes/antiradicalarias y son aplicables en los campos citados anteriormente. El concepto de nuevos productos
- 20 derivados de cisteína con propiedades antioxidantes se extiende desde las moléculas puras hasta sus mezclas, los crudos de tiólisis y fracciones parcialmente purificadas.

### Antecedentes y Estado de la Técnica

- Los flavanoles son miembros de una familia más amplia de compuestos llamados
- 25 polifenoles. Éstos contienen más de un grupo hidroxilo (OH) enlazado al correspondiente anillo bencénico. Los flavonoles oligoméricos incluyen las procianidinas y prodelfinidinas según presenten dos o tres grupos hidroxilo en el anillo B de la estructura flavanólica, respectivamente. La Figura 1 muestra la estructura general de las procianidinas y prodelfinidinas. Los polifenoles y, en particular, los
- 30 flavanoles están presentes en todas las partes aéreas de las plantas y se encuentran en altas concentraciones en piel, corteza y semillas. Fuentes ricas en polifenoles son las hojas de te, piel / pepita de uva y corteza de pino. La acción antioxidante/antiradicalaria

de los polifenoles los hace útiles como productos dedicados a la prevención de enfermedades y la promoción del estado de salud.

La cisteína es un aminoácido natural que forma parte de las proteínas y del glutatión. Entre sus funciones está la estabilización de la estructura terciaria de muchas proteínas y su participación en mecanismos de protección antioxidante/antiradicalaria basados en el glutatión.

Las células del cuerpo están expuestas constantemente a las llamadas especies reactivas oxidantes (ROS) tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y radicales peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ), los cuales poseen potencial para causar daño celular. Por ejemplo, el deterioro del material genético (ADN) puede conducir a mutaciones y cáncer, y el deterioro de proteínas de la sangre (lipoproteínas de baja densidad, LDL) puede conducir a la acumulación de lípidos, acumulación de macrófagos ricos en LDL alterado y consiguiente bloqueo de arterias. En la piel, la oxidación de lípidos de la pared celular está relacionada con cambios en la permeabilidad que causan sequedad y envejecimiento prematuro. La mayoría de ROS se producen en el curso de procesos biológicos ordinarios y el organismo evita sus efectos nocivos con sus propios mecanismos de defensa (p.e. superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa frente a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos, respectivamente). Sin embargo, los sistemas de defensa no son perfectos y parte de las especies reactivas oxidantes pueden llegar a eludirlos. Además, algunas enfermedades, el envejecimiento, o factores externos como la contaminación ambiental, el tabaco y las radiaciones ultravioleta, pueden producir concentraciones de ROS que llegan a sobrepasar la capacidad de los mecanismos de defensa. En tales casos se requiere una acción suplementaria de tipo preventivo, mediante antioxidantes exógenos. Para información sobre ROS, daño oxidativo, mecanismos de defensa y la función de los polifenoles así como de otros antioxidantes, ver [Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J., Br. J. Nutr., 80 Suppl. 1, S77-S112 (1998)]. Se han descrito extractos naturales de procianidinas con actividad antioxidante [Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P., J. Agric. Food Chem., 46 (11), 4487-4490 (1998); Masquellier, J., US4,698,360; Frangi, E., Bertani, M., Mustich, G., Tuccini, G., US5484594; Nafisi-Movaghar, K.,

Seroy, W. A., Svanoe, T. T., US5912363] y algunos de ellos se encuentran actualmente en el mercado.

Los polifenoles presentan también otras actividades interesantes, algunas de las cuales están relacionadas con sus propiedades adhesivas/antiadhesivas. Así, los polifenoles, en particular los flavanoles oligoméricos y los flavonoles glicosilados presentan actividad antimicrobiana, al menos en parte debida a la inhibición de la adhesión bacteriana [Walker, E. B., Mickelsen, R. A., Mickelsen, J., US5646178; Walker, E. B., Mickelsen, R. A., Mickelsen, J., US5650432; Hamada, S., Kontani, M., Hosono, H., Ono, H., Tanaka, T., Ooshima, T., Mitsunaga, T., Abe, I., FEMS Microbiol. Lett., 143 (1), 35-40 (1996)]. Los polifenoles y sus derivados son también utilizados en la industria de la alimentación como conservantes.

Por su parte, la cisteína forma parte de la molécula de glutatión (L- $\gamma$ -glutamil, L-cisteil, glicina), el cual participa en sistemas endógenos de protección antioxidante y en el control del plegamiento de proteínas [Meister, A., Anderson, M. E., Ann. Rev. Biochem., 52, 711-760 (1983)].

Gran parte de los extractos polifenólicos en el mercado son mezclas de muchas especies con diferente grado de polimerización. Se desconoce, para la mayoría de los productos, la manera como los diferentes componentes de las mezclas se absorben y distribuyen en los diferentes sistemas y tejidos biológicos. Se considera que las especies más interesantes son las que consisten en oligómeros de grado de polimerización menor que siete, aproximadamente. Los especies más polimerizadas son consideradas de menor interés e incluso indeseables debido a su poder astringente (aglutinante de proteínas). Por ello algunas preparaciones pueden resultar irritantes para las mucosas así como tener un efecto antinutritivo. Además, parte de las moléculas activas pueden perderse, tanto en la piel como en el sistema digestivo, debido a su tendencia a la agregación con polímeros mayores. Además, la concentración de oligómeros en una mezcla compleja es baja. Los compuestos poliméricos constituyen la fracción mayoritaria de la mayor parte de extractos polifenólicos totales.

30

La tioacidólisis de procianidinas y prodelphinidinas se usa para determinar el grado de polimerización de mezclas oligoméricas [Rigaud, J., Pérez-Ilzarbe, J., Ricardo da Silva,

J. M., Cheynier, V., *J. Chromatogr.*, 540, 401-405 (1991); Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M., *Phytochemistry*, 36 (3), 781-784 (1994); Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M., *Phytochemistry*, 43 (2), 509-512 (1996); Souquet, J. M., Labarbe, B., LeGuerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M., *J. Agric. Food Chem.*, 48 (4), 1076-1080 (2000)]. Tolueno- $\alpha$ -tiol es utilizado como fuente de tioles. Los flavan-3-oles terminales se liberan como tales mientras que las unidades internas del polímero son liberadas en forma de benziltioéteres en la posición 4 del sistema flavánico. Las mezclas son analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC). El método es útil desde el punto de vista analítico. No se han descrito aplicaciones para los derivados resultantes y, además, el posible producto de degradación, tolueno- $\alpha$ -tiol, es tóxico, irritante y lacrimógeno.

Hay también ejemplos de compuestos antioxidantes obtenidos por incorporación de mercaptoetanol y de cadenas alquílicas a flavanoles [Tanaka, T., Kusano, R., Kouno, I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 (14), 1801-1806 (1998)]. Éstos son derivados que no contienen ni el grupo amino ni el grupo carboxilo y son de naturaleza amfifílica.

Más recientemente se han descrito conjugados de flavan-3-oles y cisteamina con actividad antiradicalaria/antioxidante [Torres, J.L. solicitud no. 200003093]. Estos conjugados presentan un grupo amino, que permite su aislamiento del resto del extracto por un procedimiento sencillo de intercambio catiónico.

### Descripción de la invención

La presente invención describe una nueva combinación de una especie que contiene un grupo tiol, además un grupo amino y un grupo carboxilo con especies que incluyen el sistema flavan-3-ol. La parte que aporta el tiol es cisteína y la parte polifenólica consiste en diferentes monómeros que provienen de procianidinas y prodelfinidinas poliméricas. La Figura 2 muestra las estructuras de los nuevos conjugados. La fuente de polifenoles puede ser cualquier material vegetal que contenga procianidinas y/o prodelfinidinas cualquiera que sea el grado de polimerización de ellas. Un aspecto de la invención usa subproducto de prensado de uva como fuente de polifenoles poliméricos. Después de un simple paso de tioacidolisis las nuevas moléculas son eficazmente aisladas de la mezcla mediante un proceso de intercambio catiónico, gracias al grupo

amino introducido con la cisteína. Ulterior purificación por cromatografía en fase reversa produce cada uno de los compuestos activos. Los conjugados flavanólicos son secados a baja presión.

Los nuevos conjugados son eficientes antioxidantes que actúan atrapando radicales libres oxidantes y que son más eficaces que las mezclas de sus componentes (cisteína y flavanoles). Además, los posibles compuestos de degradación hidrolítica son parejas de compuestos naturales que incluyen cisteína, que ejerce a su vez una importante acción protectora como componente del glutatión.

#### Breve descripción de las Figuras

**Fig. 1.** Estructuras de flavan-3-oles monoméricos y poliméricos. A: Flavan-3-oles monoméricos. B: Procianidinas y prodelphinidinas oligoméricas y poliméricas. Las flechas indican posibles posiciones de polimerización. Las moléculas enlazadas pueden ser flavanoles monoméricos u oligoméricos. Los enlaces se establecen entre el anillo tipo C central y cualquiera de las dos posiciones disponibles en los anillos de tipo A.

15

**Fig. 2.** Estructuras de los nuevos cisteíil-derivados de flavan-3-oles. El símbolo  $\xi$  significa que la configuración en la posición 4 puede ser  $\alpha$  o  $\beta$ .

**Fig. 3.** Eficacia antioxidante/antiradicalaria de los compuestos fenólicos en el ensayo de DPPH. La absorbancia (A) a 517 nm es una medida de la cantidad de radical libre que queda en solución.  $(1-A/A_0) \times 100$  representa el porcentaje de DPPH que ha reaccionado con el antioxidante. La cantidad de antioxidante se expresa como micromoles por micromol de DPPH inicial para corregir la posible variabilidad día a día en la cantidad inicial de DPPH. La concentración inicial de DPPH se calcula a partir de su absorbancia (A) y una recta de calibrado. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

- ◆ Trolox
- Epicatequina
- 4 $\beta$ -(S-cisteíil)epicatequina (compuesto I, isómero beta)
- ▼ 4 $\beta$ -(S-cisteíil)catequina (compuesto II, isómero beta)
- ▲ 4 $\beta$ -(S-cisteíil)epicatequin-3-O-galato (compuesto III, isómero beta)

30

Fig. 4. Eficacia antioxidante/antiradicalaria del compuesto I y de sus componentes por separado, en el ensayo de DPPH. El procedimiento es el que se indica para la Figura 3.

■ Cisteína

▲ Epicatequina

5 ▼ Epicatequina + Cisteína

◆ 4β-(S-cisteíl)epicatequina (compuesto I, isómero beta)

### Descripción detallada de la invención

La presente invención describe la conjugación de polifenoles poliméricos con cisteína para producir los productos I-VI. La fuente primera de flavanoles oligoméricos y poliméricos es tratada con agua/etanol para obtener la fracción polifenólica cruda. No es necesario efectuar posteriores fraccionamientos dado que la tioacidolisis funciona con el primer extracto. Tal cosa no excluye la utilización de otras fracciones de pureza variable obtenidas a partir del primer extracto o en el transcurso de cualquier otro proceso similar. En un caso típico, una vez obtenida la fracción oligomérica del primer extracto, la cual se puede utilizar como extracto natural antioxidante, queda una fracción acuosa residual compuesta por polímeros que no son de utilidad debido a su actividad astringente. En el curso de la presente invención los cisteíl-derivados I-VI han sido generados a partir de tal fracción polimérica. Después de eliminar el agua y disolventes de extracción, el residuo se suspende en metanol en presencia de ácido clorhídrico y la cantidad adecuada de cisteína. La mezcla es calentada hasta 65°C y pasados 15 min, es enfriada y diluida con agua. Esta solución diluida se carga directamente en una columna de intercambio catiónico equilibrada a un pH ácido. El pH tiene que ser suficiente para mantener una carga neta positiva en la molécula. Teniendo en cuenta que la cisteína posee un grupo carboxilo y un grupo amino, la acidez ha de mantener ambos grupos protonados, tal como se muestra en la Figura 2. Los flavan-3-oles conjugados con cisteína son retenidos por la resina mientras que el resto del material, es decir, flavan-3-oles monoméricos, otros polifenoles tales como flavonoles y ácidos fenólicos, y otras especies tales como azúcares, son eliminados en el lavado. Luego, los productos derivatizados son recuperados de la columna en presencia de la cantidad adecuada de sal (cloruro sódico) y disolvente orgánico de forma eficiente y sencilla. La mezcla resultante, que contiene una cantidad de productos mucho menor que el crudo de

reacción, se somete a ulterior purificación mediante cromatografía líquida en fase reversa y subsiguiente liofilización, para obtener cada una de las nuevas moléculas con una pureza superior al 99.5% por HPLC analítico.

Las nuevas moléculas son potentes antioxidantes con una excelente capacidad de capturar radicales libres. Los conjugados son más eficientes que Trolox (análogo de Vitamina E soluble en agua) en el ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) [Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Lebensm.-Wis. u.-Technol., 28, 25-30 (1995)]. Los conjugados son también más eficientes que las correspondientes especies no derivatizadas.

10

El método de la presente invención comprende un número de fases que se presentan a continuación de forma separada para favorecer la claridad de la exposición.

#### *Fase de extracción*

El primer paso en la preparación de los nuevos conjugados es la extracción de polifenoles a partir de la fuente primera vegetal. En una de las realizaciones de la invención los polifenoles son extraídos a partir del residuo de prensado de uva (piel, pepitas y lías) con agua/etanol (3:7) para dar un extracto crudo C. El mismo procedimiento puede usarse con otras fuentes tales como vainas, pieles/semillas de otras especies y hojas. Se pueden utilizar otros disolventes de extracción miscibles con agua tales como metanol y acetona. En otra de las realizaciones de la invención, el primer extracto crudo (C) se fracciona mediante reparto líquido/líquido usando etil acetato y agua acidificada con ácido acético. La mezcla se separa en dos capas, la orgánica (O, mayoritariamente acetato de etilo) y la acuosa (A, mayoritariamente agua). La fracción orgánica O contiene mayoritariamente flavan-3-oles monoméricos ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequin-3-O-galato), procianidinas y prodelfinidinas oligoméricas y flavonoles glicosilados. La fracción acuosa A contiene mayoritariamente procianidinas y prodelfinidinas de grado de polimerización elevado así como flavonoles y otras especies no flavonoicas como azúcares. Todos los crudos y fracciones son analizados/as por HPLC en fase reversa con elución mediante mezclas de agua y acetonitrilo en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético con detección a 214, 280 y 320 nm.



*Fase tiolisis*

El segundo paso es la tioacidolisis del primer extracto y las fracciones, según el caso. Varias de estas mezclas han sido usadas en la realización de la invención, a saber, el extracto etanólico crudo *C*, la fracción de acetato de etilo *O* y la fracción acuosa *A* obtenidas en la fase anterior. Es de un interés especial para la presente invención que los productos finales se pueden obtener eficientemente con independencia de la pureza de las fuentes de procianidinas/prodelphinidinas. Todas las mezclas de partida en esta fase son liofilizadas antes del tratamiento de hidrólisis. Se ha descrito que la reacción de tiolisis es completa en 10-15 min a 65°C en presencia de 0.2 M de ácido clorhídrico en metanol y un exceso de tiol de aproximadamente 1:50 (peso/peso). En la presente invención, se ha utilizado una razón de reactivos de solamente 1:5, con consumición de los polímeros iniciales en 15 min. No se ha detectado formación de antocianinas, como pone de manifiesto la ausencia de señales en el registro del cromatograma analítico de HPLC a 525 nm. Los conjugados mayoritarios en la mezcla resultante de la tiolisis son los tioéteres de epicatequina (I), epicatequingalato (III) y catequina (II), por orden de abundancia. Otros productos minoritarios son los derivados de epigalocatequina (IV), epigalocatequingalato (VI) y galocatequina (V). La configuración de los compuestos en la posición 4 en el anillo C puede corresponder a cualquiera de las dos posibilidades (4 $\alpha$ , 4 $\beta$ ). En la Figura 2 la configuración en este carbono se expresa como 4 $\xi$ .

20

*Aislamiento*

Un aspecto crucial de la presente invención es el aislamiento de los derivados de flavanoles a partir de mezclas de reacción complejas. En esta etapa es una ventaja importante haber introducido un grupo amino durante la formación de los conjugados. Los nuevos derivados son retenidos electrostáticamente a una resina de intercambio catiónico mientras que el resto del material se elimina en el lavado de la resina. Esta operación es importante porque permite el trabajo con primeros extractos sin posterior fraccionamiento. El aislamiento de los nuevos productos puede ser realizado en presencia de gran cantidad de materiales de diferente naturaleza físico-química, los cuales, mientras no queden retenidos en la resina mediante una carga positiva, son eliminados fácilmente en el lavado. Ha de ser resaltado que una mayoría de posibles compuestos en las mezclas crudas es de naturaleza no iónica o aniónica (carga negativa

30

en el pH de trabajo). La purificación de los componentes individuales a partir de la mezcla de tiolisis se facilita enormemente con este paso. Este proceso de lavado a través de resina presenta una gran eficacia que es independiente del extracto o fracción utilizado en las fases previas. La composición de las mezclas de tiolisis presenta algunas variaciones según sea el material de partida, siendo los productos mayoritarios esencialmente los mismos en todos los casos.

Diferentes resinas de intercambio catiónico pueden usarse en esta etapa de aislamiento o lavado. Las resinas incluyen preferentemente un grupo sulfónico incorporado a un soporte polimérico. Hay varios tipos de soporte que pueden ser utilizados en esta fase de la invención. Entre ellos se incluyen agarosa, co-polímeros de estireno-divinilbenceno, polieter y metacrilato. Todas las resinas mencionadas son intercambiadores fuertes (el anión es un ácido fuerte). Sin embargo, las posibilidades no se limitan a estos soportes ni tampoco al anión intercambiador, que puede ser también, por ejemplo, un grupo carboxilo (ácido débil) incorporado a un soporte insoluble. Preferentemente, los conjugados se aíslan sobre intercambiadores fuertes SP Sepharose®, proporcionado por Amersham-Pharmacia Biotech y MacroPrep HighS®, proporcionado por BioRad. Las resinas, empaquetadas en columna, son equilibradas con tampón de fosfato sódico a pH 2.26 en presencia de una cantidad de disolvente soluble en agua, escogido entre metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Los crudos de tiolisis se cargan en la columna después de diluir la mezcla de reacción con agua (factor de dilución 1/5). Después la resina se lava con 5 volúmenes de columna del sistema de eluyentes tampón/disolvente de equilibrado. Los productos conjugados con cisteína son eluidos de la resina mediante un tampón fosfato que contiene las cantidades apropiadas de disolvente y sal (NaCl). La cantidad de disolvente orgánico miscible en agua y sal han sido ajustadas para que la mezcla de derivados sea eluida en el mínimo volumen posible.

### *Purificación*

A partir de la mezcla de derivados de cisteína obtenida en la fase de aislamiento, cada una de las especies químicas individuales se purifica extensivamente mediante HPLC preparativo en fase reversa, preferentemente en cartuchos de 25 x 5 cm empaquetados con fase estacionaria VYDAC® C18 proporcionada por The Separations Group. La

solución obtenida después del lavado/aislamiento es diluida con agua (factor de dilución 1/3), cargada en el cartucho, equilibrado previamente con agua en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y fraccionada con un gradiente de acetonitrilo. Los diferentes productos objeto de la presente invención se purifican en el mismo cartucho mediante gradientes de acetonitrilo en tampón de fosfato de trietilamina pH 2.25 y trietilamina pH 5.54, sucesivamente. Los productos puros son desalados posteriormente mediante recarga en el mismo cartucho y elución con agua/acetonitrilo en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético. Las preparaciones finales se obtienen por liofilización.

#### 10 *Ensayo de poder antioxidante/antiradicalario*

Los nuevos productos puros son potentes antioxidantes/captadores de radicales libres. La Figura 3 presenta los resultados del test de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil). Los valores de  $EC_{50}$  (concentración eficaz 50) se calculan a partir de las curvas.  $EC_{50}$  es la cantidad de antioxidante necesaria para hacer disminuir hasta la mitad la concentración inicial (alrededor de 60  $\mu$ M) de DPPH. Esta cantidad se expresa como micromoles de antioxidante/micromoles de DPPH inicial. Los valores de  $EC_{50}$  correspondientes a compuestos significativos para la presente invención son: Trolox (análogo soluble en agua de la Vitamina E), 0.26; (-)-epicatequina, 0.19; 4 $\beta$ -(S-cisteíl)epicatequina I $\beta$ , 0.12; 4 $\beta$ -(S-cisteíl)catequina II $\beta$ , 0.12; 4 $\beta$ -(S-cisteíl)epicatequingalato III $\beta$ , 0.06. Según la definición de  $EC_{50}$  un compuesto es más efectivo cuanto más baja es la concentración eficaz. Los nuevos conjugados son más eficaces que sus componentes (cisteína y flavanol) por separado y que mezclas equimolares de tales componentes (Figura 4), lo cual demuestra que su conjugación ha producido un nuevo tipo de antioxidante más eficaz.

25

#### **Ejemplo**

En una realización de la presente invención, el compuesto I $\beta$ , 4 $\beta$ -(S-cistenil)epicatequina se obtiene por tioacidolisis a partir de una fracción soluble en agua (A). La fracción A contiene una concentración de polifenoles de 10 g/L, medidos mediante el método de Folin-Ciocalteu y expresados como equivalentes en ácido gálico. Una alícuota de la fracción A (400 mL, 4 g equivalentes ácido gálico) se evapora al vacío y el residuo se suspende en metanol (400 mL). Luego se añade una solución de

30

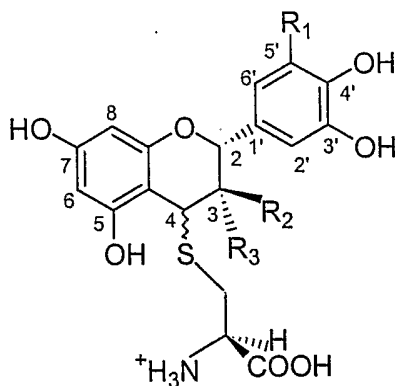
ácido clorhídrico (HCl) 37% (10 mL) y cisteína (20 g) en metanol (400 mL) y la mezcla (800 mL) se mantiene a 65°C durante 20 min con agitación. Al final de la reacción se añade agua (3.2 L) y la mezcla se guarda a 5°C.

El aislamiento de los derivados de flavan-3-oles y cisteína se consigue mediante intercambio catiónico en columna. La columna cromatográfica (1.25 x 21 cm, 105 mL de volumen de lecho), empaquetada con MacroPrep High S® se equilibra con tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 2.26/etanol(EtOH) (7:3) (30% EtOH). La mezcla (en alícuotas de 500 mL) se carga en la columna y el material no derivatizado, que no contiene el grupo amino, se eluye con 4.75 volúmenes de lecho (500 mL) del tampón de equilibrado. El compuesto I se eluye con 4.75 volúmenes de lecho (500 mL) de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 2.26/etanol(EtOH) (13:7) (35% EtOH), 100 mM NaCl. La columna se lava con 7.14 volúmenes de lecho (750 mL) de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 2.26/etanol(EtOH) (3:2) (40% EtOH) 1M NaCl. El proceso cromatográfico se repite hasta un total de 7 veces hasta agotar el total de la mezcla de tiolisis. Las fracciones se analizan por HPLC en fase reversa en una columna C18 en la que los eluyentes son mezclas de agua/CH<sub>3</sub>CN en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético. Las fracciones que contienen el compuesto I se reúnen (3.5 L para el total de las siete cargas), la mayor parte del EtOH se elimina al vacío hasta un volumen de 1.8 L y se añade agua hasta un volumen de 2.6 L. Una alícuota (900 mL) de la mezcla de compuestos derivados de cisteína, que contiene, aproximadamente, 1 g de polifenoles (expresados como equivalentes de ácido gálico) más 2.5 g de cisteína total (libre más enlazada a flavanol) se carga en un cartucho preparativo empaquetado con VYDAC® C18 (fase reversa) y se fracciona mediante un gradiente de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) en 0.1 % ácido trifluoroacético acuoso. El gradiente es de 2-14% CH<sub>3</sub>CN en 45 min y el compuesto I eluye al principio del gradiente. La operación se repite hasta agotar la mezcla inicial. La reunión de las fracciones que contienen el compuesto I se reúnen (6.7 L volumen total), el acetonitrilo se evapora al vacío y la solución acuosa (5 L) resultante se introduce en el mismo cartucho preparativo equilibrado esta vez con tampón fosfato de trietilamina pH 2.25. Los componentes de la mezcla se eluyen con un gradiente de 0 a 12% de CH<sub>3</sub>CN, a lo largo de 60 min. El compuesto I eluye a un valor de 4-7% CH<sub>3</sub>CN. Las fracciones que contienen I se reúnen, se diluyen con agua y se vuelven a cargar en el mismo cartucho, equilibrado esta vez con 0.1% ácido

trifluoroacético acuoso. El compuesto I se eluye con un gradiente de 2 a 11% de CH<sub>3</sub>CN. Las fracciones que contienen el compuesto I más puro se reúnen y se someten a liofilización. El sólido resultante (0.9 g) se disuelve en tampón de fosfato de trietilamina pH 5.54 y se carga en el cartucho preparativo equilibrado en este mismo  
5 tampón. El compuesto I se eluye con un gradiente de 0 a 12% de CH<sub>3</sub>CN, a lo largo de 90 min. Las fracciones puras se reúnen y desalan mediante un gradiente rápido de CH<sub>3</sub>CN en 0.1% ácido trifluoroacético en el mismo cartucho. La solución que resulta (300 mL) se liofiliza hasta que se consigue un sólido (0.55 g). La pureza del producto final es mayor de 99.5% por HPLC analítico con detección a 215 nm. Mediante la  
10 técnica de la Espectroscopía de masas con ionización por electrospray se detecta un ión molecular (M+1) de 410.0 unidades de masa, cuando el teórico para esta estructura es de 410.1. El producto final se caracteriza también por Resonancia Magnética Nuclear de protón (<sup>1</sup>H-NMR). Asignaciones (δ<sub>H</sub>) a 300 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO + D<sub>2</sub>O: 3.98 (1H, d *J*=1.8 Hz, 3-H); 4.08 (1H, d *J*=2.1 Hz, 4-H); 4.45 (1H, m, S-CH<sub>2</sub>CH<); 5.09 (1H, s, 2-  
15 H); 5.89 (1H, d *J*=2.1 Hz, 6-H); 6.10 (1H, d, *J*=2.1 Hz, 8-H); 6.77-6.86 (2H, m, 5'-H, 6'-H); 7.07 (1H, d *J*=2.1 Hz, 2'-H). Los datos cromatográficos son compatibles con el isómero 4β-(S-cisteíl)epicatequina.

**Reivindicaciones**

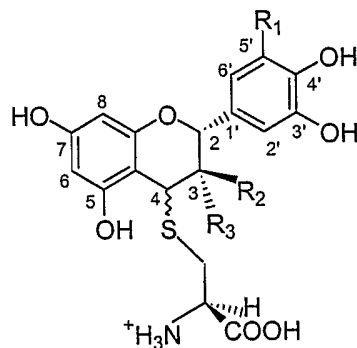
1.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura I



5

donde  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $4\xi$ -(S-cisteil)epicatequina

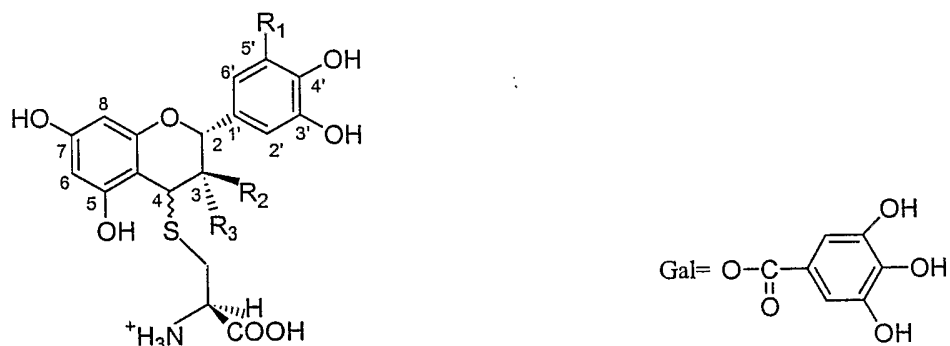
2.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura II



10

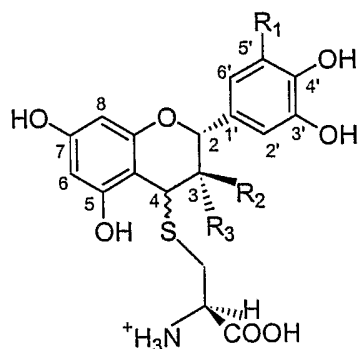
donde  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ ,  $4\xi$ -(S-cisteil)catequina

3.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura III



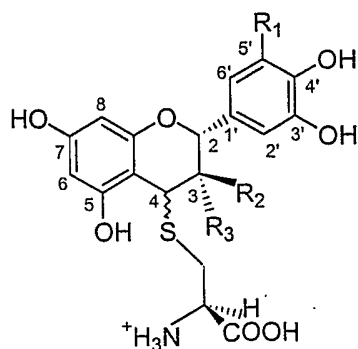
5 donde  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ ,  $4\xi$ -(S-cisteil)epicatequina-3-O-galato

4.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura IV



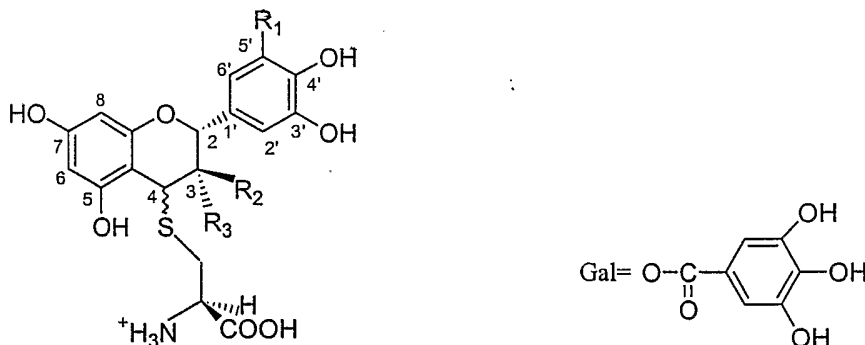
10 donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $4\xi$ -(S-cisteil)epigallocatequina

5.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura V



15 donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ ,  $4\xi$ -(S-cisteil)galocatequina

6.- Dos compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ), o cualquiera de sus sales, caracterizados por la estructura VI



donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ , 4 $\xi$ -(S-cisteíl)epigalocatequina-3-O-galato

5

7.- Cualquier mezcla de compuestos de estructura I-VI según reivindicaciones 1 a 6.

8.- Procedimiento para la preparación de los compuestos según reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque incluye el lavado de los crudos de tiólisis y el aislamiento de los compuestos activos mediante una resina de intercambio catiónico en presencia de la mínima cantidad de tampón y de disolvente orgánico miscible en agua.

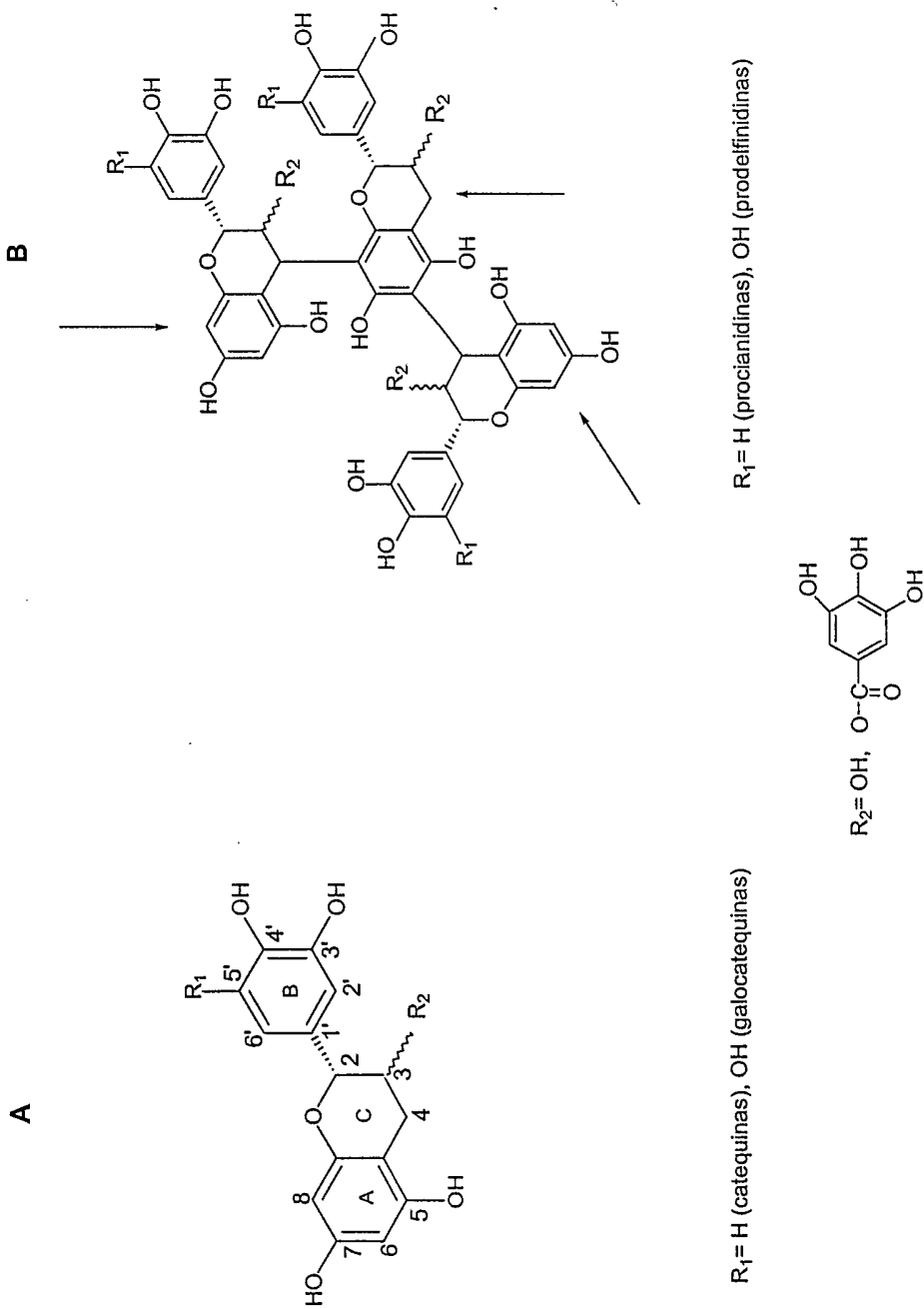
9.- Procedimiento según reivindicación 8 que utiliza mezclas de elución agua/sal/disolvente siendo el disolvente elegido entre metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano.

10.- Mezclas obtenidas por tiólisis de extractos vegetales en presencia de cisteína y mezclas obtenidas según reivindicaciones 8-9, que contienen los compuestos según reivindicaciones 1-6 y otros componentes que provienen de los extractos.

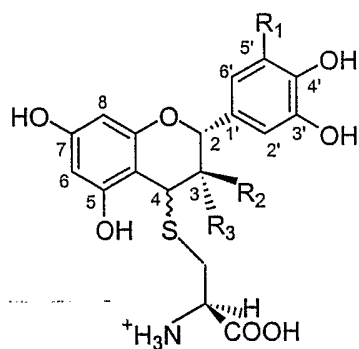
11.- Aplicación de los compuestos de estructura I-VI según reivindicaciones 1-6 y de las mezclas según reivindicaciones 7 y 10, que presentan actividad antioxidante/captadora de radicales libres, en cosmética y/o farmacia como agentes de protección y prevención de enfermedades relacionadas con procesos de oxidación (cáncer, trastornos cardiovasculares) y envejecimiento prematuro.

25

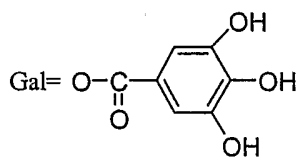




**Figura 1**



- I**  $R_1=H, R_2=H, R_3=OH$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)epicatequina
- II**  $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)catequina
- III**  $R_1=H, R_2=H, R_3=Gal$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)epicatequina-3-O-galato
- IV**  $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)epigalocatequina
- V**  $R_1=OH, R_2=OH, R_3=H$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)galocatequina
- VI**  $R_1=OH, R_2=H, R_3=Gal$ , 4 $\xi$ -(S-cisteil)epigalocatequina-3-O-galato



**Figura 2**

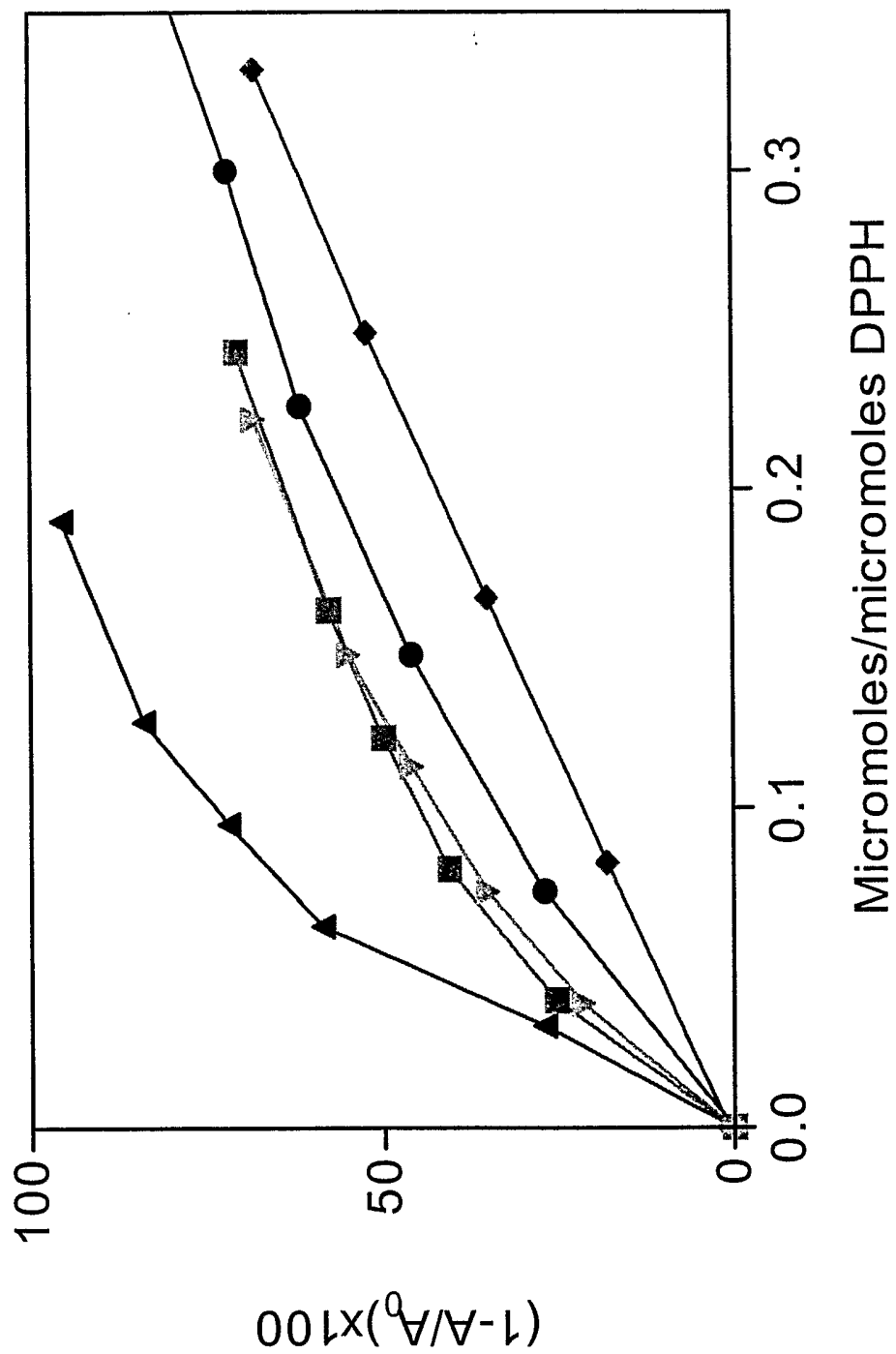


Figura 3

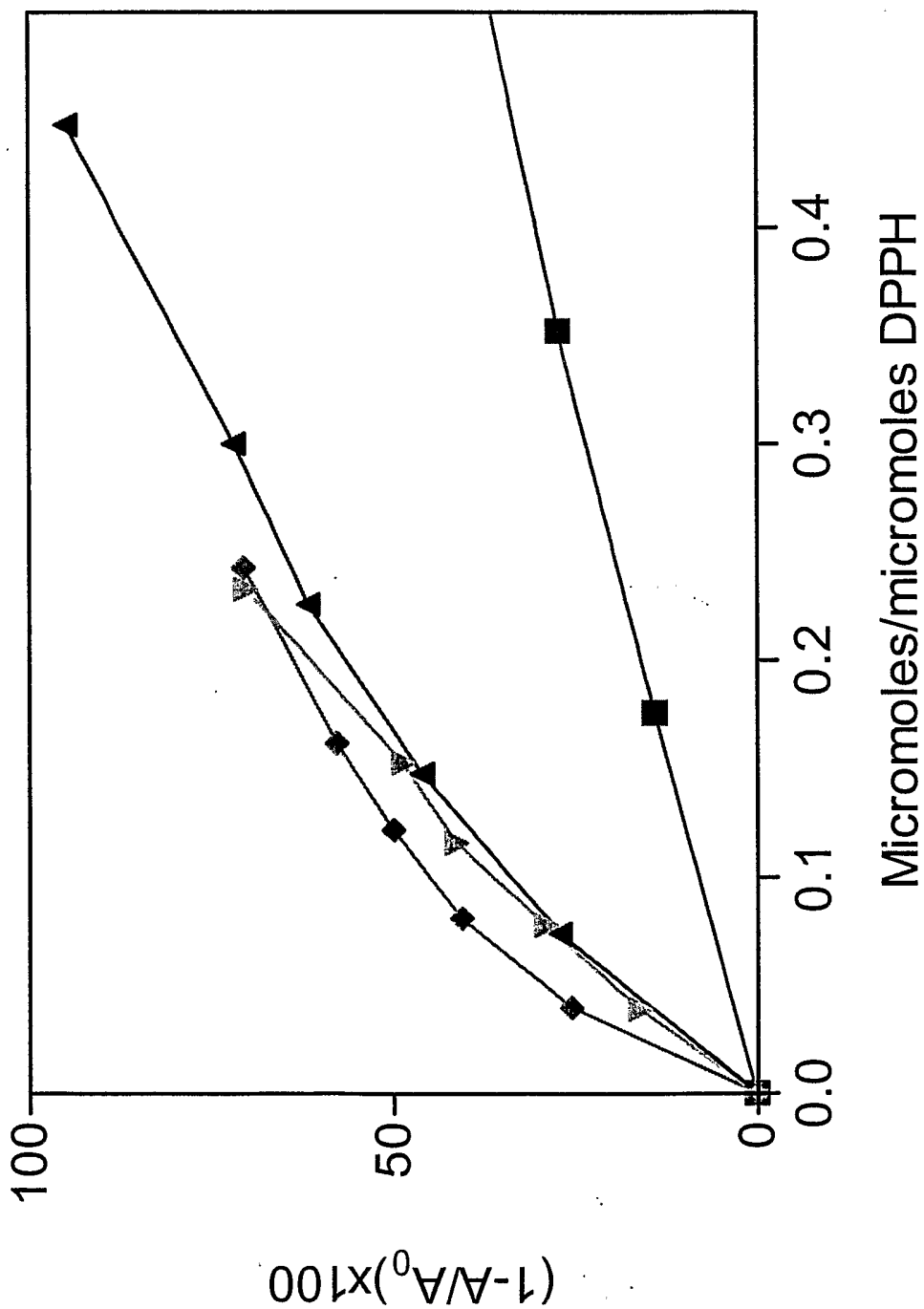


Figura 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 02/00438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
**CIP 7 C 07 D 311/32. A61K 31/353**  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
**CIP 7 C07D, A61K**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
**REGISTRY, HCAPLUS.**

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANAKA, T. et al. "Shyntesis and antioxidant activity of novel amphipathic derivatives of tea polyphenol". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1998, <b>volum 8, pag , 1801-1806, cleams fig, 1.</b>	1-11
A	LIN, Y.L y LIN, J.K. "(-) - Epigallocatechin 3- gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down regulating lipopolysaccharide induced activity of transcription factor nuclear Factor - KB. Molecular Pharmacology, 1997, <b>volum 52, 1 pag , 465-472. see the wholw document</b>	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search <b>05:november:2002</b>	Date of mailing of the international search report <b>20:november:2002</b>
Name and mailing address of the ISA/  Facsimile No. +3491 3495304	Authorized officer <b>Hortensia AYLAGAS</b> Telephone No. 34 913495473

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 02/00438

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**Although Claim 11 relates to a method for treatment of human or animal body, the search was carried out on the basis of the possible effects of the composition.**

2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES 02/00438

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C 07 D 311/32, A61K 31/353

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C07D, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

REGISTRY, HCAPLUS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	TANAKA, T. et al. "Shyntesis and antioxidant activity of novel amphipathic derivatives of tea polyphenol". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1998, volumen 8, páginas 1801-1806, Resumen. Figura 1.	1-11
A	LIN, Y.L y LIN, J.K. "(-) - Epigallocatechin 3- gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down regulating lipopolysaccharide induced activity of transcription factor nuclear Factor - KB. Molecular Pharmacology, 1997, volumen 52, páginas 465-472. Todo el documento.	1-11

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 5 noviembre 2002 (05.11.2002)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

20 NOV 2002 20. 11. 02

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O. E. P. M.

C/ Panamá 1, 28071 Madrid, España  
n° de fax +3491 3495304

Funcionario autorizado

Hortensia AYLAGAS

n° de teléfono 34 913495473

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 02/00438

## Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:  
  
La reivindicación 11 se refiere a un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. La búsqueda se ha realizado considerando los posibles efectos de la composición.
2.  Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3.  Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

## Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4.  Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la reserva  Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.