

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 828**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/198</b>	(2006.01)	<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/353</b>	(2006.01)	<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/7048</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/50</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/12</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/105</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)	<b>A61K 36/73</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/04</b>	(2006.01)	<b>A61K 36/87</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)	<b>A23L 2/52</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 15/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015 PCT/GB2015/052148**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012806**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015 E 15744311 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3179996**

54 Título: **Composiciones de polifenol**

30 Prioridad:

**25.07.2014 GB 201413228**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.03.2021**

73 Titular/es:

**NUGERONTIX LIMITED (100.0%)  
The Glades Festival Way, Festival Park  
Stoke-on-Trent, Staffordshire ST1 5SQ, GB**

72 Inventor/es:

**CORDER, ROGER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 813 828 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## 5 Composiciones de polifenol

La presente solicitud se refiere a composiciones de polifenol y al uso de tales composiciones para prevenir o tratar la disfunción endotelial.

## 10 Antecedentes

Los compuestos de polifenol son una clase de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de múltiples unidades estructurales fenólicas. Se conocen miles de compuestos de polifenol de origen natural, y la amplia clase de compuestos de polifenol se puede descomponer en subgrupos, tales como los flavonoides, que contienen un andamio de 15 átomos de carbono que comprende dos anillos aromáticos enlazados por un puente de tres carbonos. Los flavonoides de la subclase se pueden descomponer adicionalmente para incluir compuestos tales como las procianidinas, que son compuestos oligoméricos formados principalmente a partir de moléculas de catequina y epicatequina. Una clase importante de polifenoles no flavonoides son los ácidos fenólicos tales como el ácido gálico, precursor de los taninos hidrolizables, tales como los elagitaninos.

Las fuentes naturales de polifenoles incluyen productos alimenticios comunes tales como té, café, cacao, vino tinto, cerveza, sidra, frutas, verduras y nueces (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4959-69). Otras fuentes de polifenoles incluyen plantas que generalmente no se consideran como productos alimenticios, pero que pueden usarse como medicinas tradicionales a base de hierbas, tales como las plantas con flores del género *Epilobium*, comúnmente conocidas como salicaria.

El endotelio es una capa única de células que recubre todos los vasos sanguíneos. Mantener una función endotelial saludable es fundamental para la salud y el bienestar en general. La disfunción endotelial es una característica común de la función cardiovascular alterada que conduce a enfermedad coronaria y, más generalmente, a enfermedades aterotrombóticas que incluyen apoplejía y enfermedad vascular periférica. Todos los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular - colesterol LDL elevado, diabetes, tabaquismo, presión arterial alta (hipertensión), edad avanzada y falta de ejercicio - se han relacionado con la disfunción endotelial. La disfunción endotelial se reconoce ampliamente como un precursor de la formación de lesiones ateroscleróticas. Las características comunes de la disfunción endotelial incluyen: aumento de la inflamación; reducciones en las funciones antitrombóticas saludables del endotelio; aumento de la síntesis de mediadores que estimulan la remodelación y la rigidez vascular; y vasoconstricción aumentada con vasodilatación reducida.

La disfunción endotelial no solo está asociada con los mecanismos subyacentes que conducen a la enfermedad cardiovascular, sino también como un factor de riesgo de eventos cardiovasculares, incluido el infarto de miocardio. La gravedad de la disfunción endotelial está estrechamente asociada con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Aunque las estatinas y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina provocan mejoras modestas en la función endotelial, actualmente no existen medicamentos farmacéuticos que traten específicamente la disfunción endotelial.

El óxido nítrico (NO) juega un papel crucial en la función endotelial normal, incluido el mantenimiento de la homeostasis vascular, la modulación del tono vasodilatador, la regulación del crecimiento celular local y la protección del vaso contra las consecuencias perjudiciales de las plaquetas y las células que circulan en la sangre. El NO se sintetiza continuamente en las células endoteliales por la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS). Sin embargo, en pacientes con disfunción endotelial, la producción de NO puede verse afectada y la disfunción endotelial a menudo se observa experimental y clínicamente como una vasodilatación reducida dependiente de NO.

La eNOS sintetiza óxido nítrico utilizando el aminoácido L-arginina en presencia del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). Las metodologías recientes para el tratamiento de la disfunción endotelial han utilizado suplementos tanto de BH4 como de L-arginina en un intento de impulsar la producción de NO. Sin embargo, ambas metodologías tienen inconvenientes y carecen de reproducibilidad. En particular, BH4 se oxida fácilmente a una forma inactiva, lo que dificulta calcular qué cantidad de una dosis determinada de BH4 está realmente biodisponible para un paciente que la necesita (Antioxidants and Redox Signaling, 2014, 20: 3040-77). La importancia de BH4 se ha documentado adicionalmente mediante la sobreexpresión de eNOS en modelos de ratón, en los que se encontró que el desequilibrio de BH4-eNOS resultante conducía a una formación aumentada de lesiones ateroscleróticas (Journal of Clinical Investigation, 2002, 110: 331-40). Además, el uso de suplementos de L-arginina se ha relacionado con una mayor mortalidad después del infarto, probablemente como consecuencia de la deficiencia endotelial de BH4 (Journal of the American Medical Association, 2006, 295: 58-64).

Una característica adicional de la disfunción endotelial es el aumento de la síntesis del péptido vasoconstrictor endotelina-1. Los antagonistas de la endotelina-1 causan vasodilatación y mejoran las respuestas vasodilatadoras

dependientes del endotelio en personas mayores (Clinical Science, 2011, 120: 485-9) y en pacientes con aterosclerosis (Circulation, 2010, 122: 958-66).

La investigación sobre la reversión de la disfunción endotelial ha identificado el factor de transcripción factor 2 tipo Kruppel (KLF2) como un regulador clave del endotelio sano, que brinda protección contra la aterosclerosis. Se ha propuesto que los agentes que aumentan KLF2 en el endotelio podrían usarse para tratar la disfunción endotelial (Cardiovascular Pathology, 2013; 22: 9-15). Se sabe que algunas procianidinas aumentan el KLF2 de forma transitoria durante unas pocas horas (Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010; 58: 4008-4013). La identificación de agentes que podrían mantener esta inducción tendría una mayor utilidad terapéutica para restaurar o mantener la función endotelial.

Los efectos de los polifenoles dietéticos sobre la función vascular se han investigado durante más de 50 años. El extracto de baya de espino se ha utilizado durante siglos como tratamiento para enfermedades cardiovasculares, incluida la insuficiencia cardíaca crónica (Journal of Clinical Pharmacology, 2002, 42: 605-12). Los efectos beneficiosos sobre la función cardíaca se han atribuido al alto contenido de flavonoides, principalmente procianidinas. Se ha descubierto que las bebidas de cacao con alto contenido de flavanol y el chocolate negro con alto contenido de flavanol mejoran la función endotelial en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad de las arterias coronarias y diabetes ((European Heart Journal, 2012, 33: 2172-80; Journal of the American College of Cardiology, 2008, 51: 2141-9; Journal of the American College of Cardiology, 2010, 56: 218-24). El extracto de semilla de uva, que también se compone principalmente de procianidinas, también reduce la presión arterial (Metabolism Clinical and Experimental, 2009, 58: 1743-6) y mejora la función vascular (Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, 5: 272-8). La mejora en la función cardiovascular con productos que contienen altas cantidades de procianidinas es consistente con estudios en vasos aislados que muestran que las procianidinas purificadas causan vasodilatación dependiente del endotelio a través de la liberación de NO (US 6,706,756 B1) e inhiben la síntesis de endotelina-(Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4008-13).

Se ha informado de las acciones anti-ateroscleróticas del zumo de granada (Punica Granatum) (US 8,221,806 B2). El zumo de granada y el extracto de fruta de granada promueven la vasodilatación dependiente del endotelio de los vasos aislados (Nitric Oxide, 2007, 17: 50-4). No se han descrito los componentes responsables de estos efectos.

Los estudios previos en pacientes y voluntarios humanos que se centraban específicamente en los polifenoles de la dieta y su impacto en la disfunción endotelial no se han realizado correctamente. Los estudios que han reivindicado investigar tales compuestos y sus efectos sobre la salud cardiovascular han utilizado mezclas de compuestos complejas y mal definidas, de tal manera que era imposible atribuir ningún beneficio general para la salud a un componente en particular. Además, muchos estudios solo han medido los efectos indirectos, tales como la presión arterial, en lugar de analizar la producción de óxido nítrico o la síntesis de endotelina-1. Por ejemplo, Basu et al. investigaron el efecto de las bayas en la salud cardiovascular (Nutrition Reviews 2010, 68: 168-177), mientras que Asgary et al. investigaron los efectos del zumo de granada sobre la presión arterial (ARYA Atherosclerosis, 2013, 9: 326-31). Sin embargo, tanto las bayas como el zumo de granada contienen una amplia variedad de compuestos, que incluyen no solo compuestos de polifenoles tales como las proantocianidinas o elagitaninos, sino también otras sustancias que se sabe que tienen beneficios para la salud, tales como vitaminas, minerales y fibra. Por lo tanto, es imposible sacar conclusiones claras de estos estudios con respecto a los efectos de los polifenoles dietéticos sobre la producción de óxido nítrico y la disfunción endotelial.

Existe una necesidad en la técnica de nuevos tratamientos para la disfunción endotelial. En particular, sería ventajoso proporcionar nuevos tratamientos para la disfunción endotelial que comprendan una mezcla optimizada de compuestos de polifenol purificados, ya que se anticipa que el perfil de efectos colaterales de tales composiciones sería favorable. También se espera que los compuestos que mejoran la función endotelial sean ayudas ergogénicas útiles. Por tanto, la provisión de nuevas composiciones ergogénicas es un objetivo adicional de la presente invención.

#### Sumario de la invención

En una primera realización, la invención se refiere a composiciones que comprenden, o consisten esencialmente de, enoteína B en combinación con:

al menos una proantocianidina,

citrulina o una sal de citrulina y/o ácido aspártico o un aspartato,

preferiblemente en donde dicha al menos una proantocianidina es al menos una procianidina.

En una realización adicional, la invención se refiere a composiciones que comprenden:

enoteína B;

al menos una proantocianidina, preferiblemente en donde dicha al menos una proantocianidina es al menos una procianidina;

5 citrulina o una sal de citrulina; y

ácido aspártico o un aspartato.

En una realización adicional, la presente invención está dirigida a una composición que consiste esencialmente en:

10 enoteína B;

al menos una proantocianidina, preferiblemente en donde dicha al menos una proantocianidina es al menos una procianidina;

15 citrulina o una sal de citrulina; y

ácido aspártico o un aspartato.

En una realización adicional, la presente invención está dirigida a una composición que consiste en:

20 enoteína B;

al menos una proantocianidina, preferiblemente en donde dicha al menos una proantocianidina es al menos una procianidina;

25 citrulina o una sal de citrulina; y

ácido aspártico o un aspartato.

30 En una realización adicional, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una composición de la invención como se definió anteriormente junto con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En una realización adicional, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una composición de la invención como se define anteriormente, en donde la composición es farmacéuticamente aceptable y está en forma de dosificación unitaria. Preferiblemente, en donde la forma de dosificación unitaria se selecciona de tabletas, cápsulas, tabletas bucales, tabletas que se desintegran por vía oral, tabletas orales de disolución rápida, tabletas dispersables, masticatorias, gránulos, suspensión seca, inyección, solución, formulación de liberación lenta, formulación de liberación controlada y formulación de liberación rápida.

40 En una realización adicional, la presente invención está dirigida a una composición de la invención en donde la enoteína B y la proantocianidina están microencapsuladas.

45 En una realización adicional, la invención se refiere a enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina para su uso en terapia para tratar, prevenir o retrasar la aparición de disfunción endotelial que incluye arteriosclerosis, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad de las arterias coronarias, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad periférica priérica, diabetes, insuficiencia renal crónica y disfunción eréctil.

50 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al uso de composiciones de la invención como ayudas ergogénicas.

En una realización adicional, se presentan los procesos para preparar las composiciones de la invención.

#### Definiciones

55 Un Dalton como se usa en este documento es equivalente a una unidad de masa atómica unificada (u). Es una unidad estándar que se utiliza para indicar la masa atómica y es una unidad aceptada que no pertenece al SI. Un Dalton es aproximadamente la masa de un protón/neutrón. Por lo tanto, la masa del hidrógeno es un Dalton, ya que el hidrógeno solo contiene un protón y no contiene neutrones.

60 En el contexto de la presente invención, la palabra "aproximadamente" en relación con un valor numérico o rango de valores se pretende que se refiera a más o menos el diez por ciento de ese valor ( $\pm 10\%$ ). Por lo tanto, "aproximadamente 90" debe interpretarse como un rango que abarca los valores 81-99.

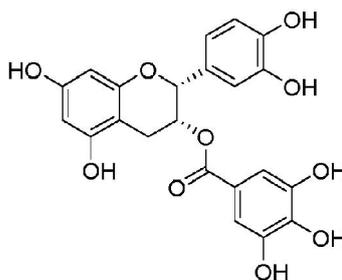
65 Ciertas características que, para mayor claridad, se describen en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas, pueden combinarse de cualquier manera. Por el contrario, diversas características que, por brevedad, se describen en el contexto de una única característica preferida, también se pueden proporcionar por



presente invención contienen una cantidad aumentada de trímeros de procianidina, tetrámeros de procianidina, pentámeros de procianidina y hexámeros de procianidina, en relación con las cantidades de otros oligómeros de procianidina.

5 En una realización, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención están enriquecidas en el rango de tamaño de trímero a hexámero y están galoiladas. Preferiblemente, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención son procianidinas, están enriquecidas en el rango de tamaño de trímero a hexámero y están galoiladas.

10 El término "galoilado" pretende significar que al menos una molécula de ácido gálico está unida a la molécula de proantocianidina. Las moléculas de ácido gálico se pueden unir en cualquier posición. Sin embargo, se encuentra comúnmente que la al menos una molécula de ácido gálico se une al núcleo de (epi)catequina a través de un enlace éster al grupo hidroxilo en la posición 3. Las proantocianidinas galoiladas se encuentran con frecuencia cuando las proantocianidinas se derivan de fuentes vegetales particulares, incluidas uvas y productos de uva. A continuación se muestra un ejemplo de una molécula de epicatequina galoilada:



20 En una realización, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención tienen un rango de peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton. Preferiblemente, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención son procianidinas y tienen un rango de peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton.

25 En otra realización, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención tienen un rango de peso molecular de aproximadamente 900 a aproximadamente 1800 Dalton o un rango de peso molecular de aproximadamente 1150 a aproximadamente 1750 Dalton. Preferiblemente, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención son procianidinas y tienen un rango de peso molecular de aproximadamente 900 a aproximadamente 1800 Dalton o un rango de peso molecular de aproximadamente 1150 a aproximadamente 1750 Dalton.

30 Cuando se describen rangos de peso molecular en esta solicitud, se pretende que se refieran al peso del ion  $[M-H]^-$  basado en la relación  $m/z$ . Para la determinación del peso molecular, se prefiere la espectrometría de masas de iones negativos. La espectrometría de masas puede realizarse como parte de HPLC, es decir, como HPLC-MS/MS. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, *Annals of the New York Academy of Science*, 2002, 957: 78-89; *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2002, 50: 5191-96; *Nature*, 2006, 444:566; *Molecules*, 2012, 17:14821-40.

40 En una realización, las proantocianidinas usadas en las composiciones de la presente invención se derivan de manzana, granos de cacao, arándano, semilla de uva, espinos, corteza de pino marítimo o sorgo.

Preferiblemente, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención se derivan de semillas de manzana o uva. Más preferiblemente, las proantocianidinas usadas en las composiciones de la presente invención son procianidinas y se derivan de semillas de manzana o uva.

45 En una realización, las proantocianidinas utilizadas en las composiciones de la presente invención se derivan de semillas de uva y están galoiladas. Preferiblemente, las proantocianidinas usadas en las composiciones de la presente invención son procianidinas derivadas de semillas de uva y están galoiladas.

50 Los elagitaninos también se conocen como taninos hidrolizables. Los elagitaninos son derivados poliméricos del ácido gálico que son ésteres de un azúcar (Natural Products Report 2009, 26:1001-1043). Ejemplos de compuestos de elagitanino son enoteína B, agrimoniina, cameliatanina H, camellioferina A, castalagina, castalin, casuarictina, degaloilrugosina F, grandinina, heterophylliin B, heterophylliin C, punicalagina, punicalina, roburina A, rugosina A, rugosina D, rugosina D, rugosina, sanguin H6, sanguin H10, tellimagrandin II, terflavin B y vescalagin.

55 Las frutas de granada, las frutas de *Punica granatum*, son una rica fuente de elagitaninos. Los elagitaninos identificados en el zumo y las semillas de granada incluyen monómeros tales como punicalagina, punicalina y

punicacorteína C, y oligómeros tales como enoteína B (dímero), eucalbanina B (dímero) y eucarpanina T<sub>1</sub> (trímero), pomegraniina A (tetramero) y pomegraniina B (pentámero).

En una realización, la enoteína B usada en las composiciones de la presente invención se deriva de frutos de granada.

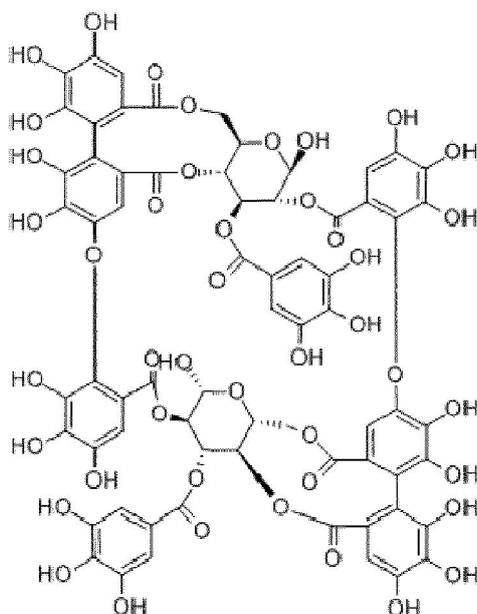
Otras fuentes de enoteína B incluyen hojas de plantas del género *Epilobium*. Como se usa en este documento, debe entenderse que el término "género *Epilobium*" incluye todas las plantas del género *Epilobium*. Esta definición también incluye especies modificadas genéticamente que tienen un mayor contenido de enoteína B. Tales especies modificadas genéticamente pueden diseñarse mediante un programa de reproducción específico (es decir, para mejorar el contenido de polifenoles) o pueden ser híbridos de origen natural. Se sabe que las plantas del género *Epilobium* tienen tendencia a hibridar, y en el Reino Unido se ha informado que las variedades híbridas son más comunes que las variedades no hibridadas. Ejemplos del género *Epilobium* incluyen *Epilobium angustifolium* (salicaria de laurel), *Epilobium montanum* (salicaria de hoja ancha) y *Epilobium parviflorum* (salicaria peluda de flor pequeña). Se prefieren particularmente los elagitaninos derivados de las hojas de *Epilobium parviflorum* (salicaria peluda de flor pequeña). Así, en una realización, los elagitaninos usados en las composiciones de la presente invención son aquellos derivados de plantas del género *Epilobium* y contienen enoteína B.

En una realización, la enoteína B usada en las composiciones de la presente invención se deriva de las hojas de la especie *Epilobium angustifolium* (salicaria de laurel), *Epilobium montanum* (salicaria de hoja ancha) y *Epilobium parviflorum* (salicaria peluda de flor pequeña). Se prefiere particularmente la enoteína B derivada de las hojas de *Epilobium parviflorum* (salicaria peluda de flor pequeña).

La enoteína B también se puede obtener de otras fuentes, incluida *Oenothera erythrosepala* (onagra) y una variedad de plantas de myrtaceous, incluidas plantas de las familias Myrtaceae, Lythraceae, Onagraceae, Melastomataceae y Combretaceae (International Journal of Molecular Sciences 2010, 11: 79-106).

Como se indicó anteriormente, una metodología para el tratamiento de la disfunción endotelial es mediante la inducción de KLF2 para mejorar la función vascular. Se sabe que algunas procianidinas aumentan los niveles de ARNm de KLF2 y se ha sugerido que los inductores de KLF2 tendrían utilidad como agentes para prevenir la aterosclerosis (Cardiovascular Pathology, 2013; 22: 9-15). Sin embargo, no se ha demostrado en la literatura el uso de un elagitanino para aumentar KLF2. El Solicitante ha encontrado sorprendentemente que la combinación de procianidinas con elagitaninos da como resultado una inducción inusualmente sostenida de KLF2. Este efecto es particularmente marcado cuando el elagitanino es enoteína B (véase Figura 2 discutida más adelante).

Enoteína B tiene la siguiente estructura:



El peso molecular del ion (M-H) de enoteína B es 1567.

En una realización, la enoteína B usada en las composiciones de la presente invención se deriva de las hojas de especies de *Epilobium*.

Incluso más preferiblemente, en las composiciones de la invención, la al menos una proantocianidina es una mezcla que comprende trímeros de procianidina, tetrámeros de procianidina, pentámeros de procianidina y/o hexámeros de procianidina.

5 En una realización, en las composiciones de la invención, la relación en peso de la enoteína B a la al menos una proantocianidina está en el rango de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1, tal como aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1. Preferiblemente, la al menos una proantocianidina es al menos una procianidina.

10 Preferiblemente, en las composiciones de la invención, la relación en peso de enoteína B a la al menos una proantocianidina está en el rango de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, incluyendo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 4:1 y de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1 y de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 2:1. Preferiblemente, la al menos una proantocianidina es al menos una procianidina.

15 Como se indicó anteriormente, las fuentes naturales de polifenoles incluyen alimentos comunes tales como té, café, cacao, vino tinto, cerveza, sidra, frutas, verduras y nueces, así como diversidad de plantas que pueden usarse como hierbas medicinales. Los polifenoles usados en las composiciones, usos y métodos de la presente invención se pueden extraer de por ejemplo frutas enteras, nueces y hojas. Sin embargo, también es posible utilizar "productos de desecho" con el fin de extraer los compuestos de polifenol deseados. Los "productos de desecho" típicos incluyen cualquier residuo sólido que quede después de por ejemplo exprimir frutas enteras, tales como piel, semillas y pulpa. El aislamiento de compuestos de polifenol de los productos de desecho tiene considerables ventajas comerciales.

Las composiciones de la presente invención también comprenden citrulina o una sal de citrulina y/o ácido aspártico o un aspartato.

25 La citrulina, como subproducto de la síntesis de óxido nítrico, se recicla rápidamente intracelularmente a L-arginina por la argininosuccinato sintasa. El reciclado de citrulina por la argininosuccinato sintasa también requiere ácido aspártico o aspartato como cosustrato. Sin desear estar ligado a teoría alguna, se cree que las composiciones que comprenden citrulina o una sal de citrulina y/o ácido aspártico/aspartato potenciarán los niveles de L-arginina disponible para la producción de NO, ya que se cree que la síntesis de argininosuccinato sintasa está sobre regulada por proantocianidinas, y en particular, por procianidinas.

30 En una realización particularmente preferida, las composiciones de la invención comprenden enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato, en donde la proantocianidina tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton.

35 En una realización más preferida, las composiciones de la invención comprenden enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato, en donde la al menos una proantocianidina es al menos una procianidina y tiene un peso molecular de alrededor de 800 a alrededor de 1900 Dalton.

40 En una realización más preferida, las composiciones de la invención comprenden enoteína B en combinación con al menos una procianidina en donde al menos una procianidina es una mezcla de trímeros de procianidina, tetrámeros de procianidina, pentámeros de procianidina y/o hexámeros de procianidina, y la composición comprende además citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato.

45 En otra realización, las composiciones de la invención consisten esencialmente en enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato, en donde la proantocianidina tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton.

50 En otra realización, las composiciones de la invención consisten esencialmente en enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato, en donde la al menos una proantocianidina es al menos una procianidina y tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton.

55 En una realización adicional, las composiciones de la invención consisten esencialmente en enoteína B, al menos una proantocianidina que es una mezcla de trímeros de procianidina, tetrámeros de procianidina, pentámeros de procianidina y/o hexámeros de procianidina, citrulina o una sal de citrulina y ácido aspártico o un aspartato.

60 En una realización, las composiciones de la presente invención se pueden usar en terapia para prevenir o tratar enfermedades asociadas con disfunción endotelial que incluyen arteriosclerosis, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad de las arterias coronarias, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad de las arterias periféricas, diabetes, insuficiencia renal crónica y disfunción eréctil.

65 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de la arterioesclerosis de las arterias coronarias, arterias carótidas o arterias periféricas. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la hipertensión.

- Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la hipertensión pulmonar.
- 5 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la enfermedad de arterias coronarias.
- Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la insuficiencia cardíaca crónica.
- 10 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la enfermedad arterial periférica.
- Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la diabetes.
- 15 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica.
- Preferiblemente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la disfunción eréctil.
- 20 En un aspecto, las composiciones de la presente divulgación pueden usarse para permitir efectos ergogénicos, que preferiblemente conducen a un rendimiento atlético más sostenido. Por tanto, en un aspecto, las composiciones de la divulgación pueden usarse como ayudas ergogénicas.
- 25 En una realización, las composiciones de la presente invención se pueden usar como profilácticos para prevenir o retrasar la aparición de disfunción endotelial en pacientes con riesgo de la misma.
- En una realización adicional, la presente invención se refiere a enoteína B para su uso en terapia para tratar, prevenir o retrasar la aparición de disfunción endotelial en donde el tratamiento, la prevención o el retraso comprende la administración de enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina de forma simultánea o secuencial y en cantidades terapéuticamente efectivas.
- 30 La presente invención está dirigida además a un proceso para preparar las composiciones de proantocianidina y enoteína B que comprenden además citrulina o una sal de citrulina y/o ácido aspártico o un aspartato de la invención.
- 35 Así, en una realización, la presente invención está dirigida a un proceso para preparar una composición que comprende enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina y ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina, en donde dicho proceso comprende mezclar al menos una proantocianidina, enoteína B y ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina, en cualquier orden. Preferiblemente, la al menos una proantocianidina es al menos una procianidina.
- 40 La adición de ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina puede ocurrir simultáneamente con, o por separado, de la mezcla de la enoteína B y dicha proantocianidina, y en cualquier orden.
- 45 En un aspecto, el proceso de la presente invención implica además la adición de al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La adición del excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ocurrir simultáneamente con, o por separado de, la mezcla de la enoteína B y dicha proantocianidina, y en cualquier orden.
- En un aspecto, una primera composición que comprende al menos una proantocianidina se prepara mediante las siguientes etapas:
- 50 (a) elución del extracto de polifenol crudo que contiene proantocianidina a través de una matriz adsorbente; y luego
- (b) enjuagar dicha matriz para eliminar el material no unido; y luego
- 55 (c) eluir un extracto de polifenoles enriquecido utilizando un solvente adecuado.
- En un aspecto, se prepara una segunda composición que comprende enoteína B mediante las siguientes etapas:
- (d) elución del extracto de polifenol crudo que contiene enoteína B a través de una matriz adsorbente bajo condiciones que permitan la unión del polifenol a la matriz; y luego
- 60 (e) enjuagar dicha matriz para eliminar el material no unido; y luego
- (f) eluir un extracto de polifenoles enriquecido utilizando un solvente adecuado.
- 65

De acuerdo con una realización del proceso de la invención, dicha primera composición y dicha segunda composición se pueden mezclar luego con ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina para preparar una composición de la invención.

5 La matriz absorbente para uso en las etapas (a) y (d) puede tomar cualquier forma adecuada. Sin embargo, se prefiere que la matriz absorbente sea un medio formado por perlas, por ejemplo, un medio formado por perlas de dextrano o acrílico. Sephadex® LH20 (disponible de Sigma Aldrich) es un ejemplo de un medio preferido formado por perlas de dextrano. Las perlas de matriz absorbente se empaquetan típicamente en una columna o almohadilla de filtro, sobre la cual se carga el extracto que contiene polifenol crudo y se realiza la elución. La elución puede tener lugar bajo  
10 gravedad. Sin embargo, por razones de eficiencia del proceso, es preferible usar una cantidad baja de presión para forzar el eluyente a través de la columna/almohadilla de matriz absorbente. Es probable que las etapas (a) y (d) se realicen a temperatura ambiente. Sin embargo, el experto en la técnica podría seleccionar fácilmente las condiciones de elución adecuadas (es decir, solvente, temperatura y presión) basándose, por ejemplo, en la escala del proceso, el producto polifenólico deseado y la estabilidad química del mismo.

15 En una realización preferida, la matriz absorbente para uso en las etapas (a) y (d) es Sephadex® LH20.

En una realización preferida, el solvente de elución para las etapas (a) y (d) es un solvente orgánico acuoso ácido.

20 Preferiblemente, dicho solvente orgánico acuoso es acetona acuosa. Preferiblemente, la acidificación se lleva a cabo con ácido acético. Por tanto, en una realización preferida, el solvente de elución para uso en las etapas (a) y (d) es una solución acuosa de ácido acético/acetona.

25 En una realización preferida, el solvente de enjuagado para uso en las etapas (b) y (e) es un ácido acuoso orgánico. Preferiblemente, dicho ácido acuoso orgánico es ácido acético.

En una realización adicional, los procesos para preparar la primera y segunda composiciones pueden comprender una etapa de enjuague adicional después de las etapas (b) y (e) usando una solución acuosa de ácido acético/acetona.

30 En una realización preferida, el solvente de elución para uso en las etapas (c) y (f) es acetona acuosa, que puede tener un pH reducido debido a la adición de un ácido apropiado. Por tanto, el solvente de elución para uso en las etapas (c) y (f) puede ser una solución acuosa de ácido acético/acetona.

35 En una realización adicional, las condiciones de elución para las etapas (c) y (f) pueden seleccionarse para permitir un enriquecimiento adicional de los polifenoles deseados, por ejemplo aquellos con mayor actividad biológica.

En una realización adicional, la purificación adicional de las composiciones de polifenoles obtenidas mediante los procesos descritos anteriormente se puede llevar a cabo mediante métodos generales conocidos en la técnica, tales como HPLC (fase normal o fase inversa).

40 **Dosificación y formulación**

La presente solicitud proporciona composiciones que comprenden ciertos compuestos de polifenol que se pueden usar para la prevención o el tratamiento de la disfunción endotelial. El régimen de dosificación para las composiciones de la presente invención variará, por supuesto, dependiendo de factores tales como la ruta de administración, la edad, el sexo, la salud, la condición médica y el peso del receptor; la naturaleza y extensión de los síntomas; la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; la ruta de administración y el efecto deseado. En particular, se observa que las composiciones de la presente invención pueden formularse para su uso en terapia, o para su uso como profiláctico o como ayuda ergogénica.

50 Las composiciones de esta invención pueden administrarse en una sola dosis diaria, o la dosis diaria total puede administrarse en dosis divididas dos, tres o cuatro veces al día.

55 En una realización de la invención, los compuestos de polifenol deseados se microencapsulan, ya sea por separado o juntos, para aumentar la estabilidad o biodisponibilidad o para enmascarar el sabor. Preferiblemente, la microencapsulación se lleva a cabo usando tecnología de microencapsulación de agua en aceite para formulaciones líquidas (véase US 8,685,446 B2) o usando una mezcla de microencapsulación de tres componentes de maltodextrina, goma de mezquite y zeína, que se seca por aspersión para formulaciones sólidas o en polvo (véase Food and Bioprocess Technology, 2013, 6: 941-51).

60 En una realización de la invención, las composiciones pueden estar en forma de cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, tales como tabletas, cápsulas, tabletas bucales, tabletas que se desintegran oralmente, tabletas orales de disolución rápida, tabletas dispersables, masticatorios, gránulos, suspensión seca, inyección, solución, formulación de liberación lenta, formulación de liberación controlada, formulación de liberación rápida, etc.

65

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención también incluyen uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización de la invención, las composiciones se pueden preparar como parte de un producto nutracéutico, por ejemplo, como tentempiés en barra o una fórmula de bebida preparada previamente/en polvo.

10 En una realización de la invención, las composiciones de la invención pueden comprender ventajosamente componentes adicionales tales como vitaminas, minerales y/o fibra. Las vitaminas y minerales adecuados incluyen, pero no se limitan a, las vitaminas B, vitamina C, ácido fólico, calcio, hierro, magnesio, zinc, selenio, niacina, vitamina D, vitamina A, vitamina E, cromo, cobre, manganeso, boro, molibdeno, ácidos grasos omega y coenzima Q10. Pueden resultar ventajosas mezclas de tales componentes adicionales. Por ejemplo, en pacientes con deterioro cognitivo, puede resultar ventajoso combinar las composiciones de la invención con una fuente de ácidos grasos omega 3 y vitamina B12. Cuando las composiciones estén destinadas a ser utilizadas como coadyuvantes ergogénicos, puede ser deseable una formulación con una fuente de proteína, tal como suero en polvo.

15 A modo de ejemplo, la dosificación diaria de proantocianidinas (preferiblemente procianidinas) en las composiciones de la invención es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg. La dosificación diaria de enoteína B en las composiciones de la invención es de aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg.

20 Cuando está presente citrulina o una sal de citrulina en las composiciones de la presente invención, la dosificación diaria es preferiblemente de aproximadamente 850 mg a aproximadamente 18000 mg, más preferiblemente de aproximadamente 3750 a aproximadamente 8750 mg por día.

25 Cuando está presente ácido L-aspartico o aspartato en las composiciones de la presente invención, la dosificación diaria es preferiblemente de aproximadamente 650 mg a aproximadamente 14000 mg, más preferiblemente de aproximadamente 2600 a aproximadamente 6700 mg.

30 Preferiblemente, las composiciones de la invención pueden comprender L-citrulina y L-aspartato en una cantidad total de aproximadamente 1500 mg a aproximadamente 32000 mg, preferiblemente de aproximadamente 5800 a aproximadamente 14500 mg, donde las cantidades en mg representan la dosificación diaria total.

35 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Actividad biológica de la enoteína B y efecto de la enoteína B sobre la unión de las procianidinas a las células endoteliales.

40 Figura 2: Efecto de la enoteína B, extracto de elagitanino de semilla de frambuesa, procianidinas y mezclas de los mismos sobre la endotelina-1, un vasoconstrictor y biomarcador asociado con disfunción endotelial.

Figura 3: Caracterización por HPLC de enoteína B y extractos de semillas de uva y manzana enriquecidos con procianidina.

45 Figura 4: Efecto de la enoteína B, procianidinas y mezclas de las mismas sobre biomarcadores asociados con la reversión de la disfunción endotelial.

### Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la presente invención.

Para facilitar la referencia, aquí se utilizan las siguientes abreviaturas:

55	$A_{263}$	- absorbancia a 263 nm
	ANOVA	- prueba estadística de análisis de varianza
	Ap-OPC	- procianidinas oligoméricas de manzana
60	Biotin-Ap-OPC	- Procianidinas oligoméricas de manzana biotiniladas
	cm	- centímetro
	dp	- grado de polimerización (1 = monómeros a 10 = decámeros)
65	EllagiTs	- elagitaninos

	em	- emisión
5	eNOS	- óxido nítrico sintasa endotelial
	ET-1	- endotelina-1
	ex	- excitación
10	g	- gramo
	GS-OPC	- procianidinas oligoméricas de semillas de uva
15	h	- hora
	HPLC	- cromatografía líquida de alto rendimiento
	kg	- kilogramo
20	KLF2	- factor 2 tipo Kruppel-
	l	- litro
25	LC-MS/MS	- cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
	mg	- miligramo
	µg	- microgramo
30	min	- minuto
	ml	- mililitro
35	mM	- milimolar
	µm	- micrómetro
	µmol	- micromolar
40	mRNA	- ácido ribonucleico mensajero
	mV	- milivoltios
45	NO	- óxido nítrico
	nm	- nanómetro
	n.s.	- No significativo
50	OPC	- procianidinas oligoméricas
	OTb	- enoteína B
55	P	- valor p, significación estadística
	PTFE	- politetrafluoroetileno
	qRT-PCR	- reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
60	Rb-ET	- elagitaninos de frambuesa
	SD	- Desviación Estándar
65	TMB	- 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, sustrato cromogénico
	UHPLC	- cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento

UV - ultravioleta

Ejemplo 1: Extracción y purificación parcial de elagitaninos de frambuesa (ejemplo de referencia)

Se añade acetona acuosa (70% en agua), 3 l, a semillas frescas de frambuesas rojas (aprox. 2 kg) en un vaso de polipropileno de 5 l y se mezcla durante 1 h a temperatura ambiente con un agitador magnético. El extracto de semilla cruda se filtra a través de un filtro de PTFE poroso para separar el extracto de polifenol de frambuesa (aproximadamente 2.5 l) del material en partículas. La solución resultante de polifenoles de frambuesa se diluye con ácido acético 10 mM (7.5 l) y se bombea a una columna de Sephadex® LH20 (5 x 15 cm), que se ha preequilibrado con acetona al 10% en ácido acético 10 mM. La columna se enjuaga bombeando a través de 1 l de ácido acético 10 mM, seguido de 1 l de acetona al 20% en ácido acético 10 mM. La elución de elagitaninos de frambuesa se consigue bombeando 2 l de acetona al 50% en agua. Se recolectan fracciones (200 ml). Las fracciones se monitorizan para determinar el contenido de polifenoles mediante mediciones de absorción de UV a 280 nm y mediciones de ensayo colorimétrico de polifenoles utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato/fosfotungstato). También se monitoriza la actividad biológica de las fracciones en relación con la modificación de la función endotelial evaluando la potencia relativa de cada fracción para inhibir la síntesis de endotelina-1 mediante células endoteliales cultivadas.

Los principios de este método pueden adaptarse para la extracción de pericarpio de granada. Se añade acetona acuosa (70% en agua), 600 ml, a pericarpio de granada finamente picado (200 g). Después de la filtración, el filtrado (aproximadamente 500 ml) se diluye con ácido acético 10 mM (1.5 l) y se bombea a una columna de Sephadex® LH20 (5 x 15 cm). Las etapas subsecuentes son las descritas anteriormente.

Ejemplo 2: purificación por HPLC de fracciones de cromatografía de adsorción

Las fracciones pico eluidas con acetona acuosa al 50% de Sephadex® LH20 se concentran bajo vacío para eliminar la acetona. El extracto concentrado se bombea a una columna de sílica C18 (5 x 25 cm) a una tasa de flujo de 50 ml/min. La columna se enjuaga con 1 litro de metanol al 8% y luego se eluye con un gradiente lineal de 1.5 litros a metanol al 25% para obtener un extracto de elagitanino enriquecido. Se recolectan fracciones de 100 ml durante la elución. Las fracciones se monitorizan para determinar el contenido de polifenoles mediante mediciones de absorción de UV a 280 nm y mediciones de ensayo colorimétrico de polifenoles utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato/fosfotungstato). También se monitoriza la actividad biológica de las fracciones en relación con la modificación de la función endotelial evaluando la potencia relativa de cada fracción para inhibir la síntesis de endotelina-1 mediante células endoteliales cultivadas. Las fracciones pico, basadas en la capacidad para inhibir la síntesis de endotelina-1, se agrupan combinan y secan.

Ejemplo 3: Purificación de procianidinas de manzana

Se disuelven 20 g de extracto de polifenol de manzana crudo en polvo (75% de extracto de polifenoles de A.M. Todd Botanical Therapeutics, Kalamazoo, MI, EE. UU.) En 500 ml de acetona al 10% en ácido acético 10 mM. El extracto crudo se bombea a una columna de Sephadex LH20 (5 x 15 cm). Las etapas siguientes son las descritas anteriormente. Después, la columna se enjuaga y se eluye con acetona acuosa al 50% como se describe en el Ejemplo 1. El rendimiento de procianidinas es de 7 g (35%). La potencia relativa del extracto purificado en comparación con el material de partida se determina comparando los efectos inhibidores sobre la síntesis de endotelina-1 mediante las células endoteliales. La proporción de tetrámeros de procianidina a hexámeros en el extracto purificado, en comparación con el material de partida, se evalúa mediante HPLC usando una columna Develosil® 100 Diol (5 µm, 4.6 x 250 mm, disponible en [www.develosil.com](http://www.develosil.com)). Tales métodos son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009, 57: 1896-902 y Journal of Chromatography A, 2009, 1216, 4831-4840. Las procianidinas de manzana purificadas se agrupan y se secan.

Ejemplo 4: análisis HPLC y LC-MS/MS de polifenoles

El contenido de procianidina de los extractos se analiza por HPLC usando una columna Develosil 100 Diol (5 µm, 4.6 x 250 mm) con procianidinas monitorizadas por fluorescencia (ex 276 nm, em 316 nm) usando gradiente de elución con acetonitrilo/ácido acético/metanol/agua. Las identidades de las procianidinas eluidas se pueden confirmar adicionalmente conectando este sistema de HPLC a un espectrómetro de masas para análisis MS/MS.

Las composiciones de extractos de elagitanina se analizan mediante HPLC en fase reversa utilizando una columna UHPLC de sílica C18 (2 x 50 mm) conectada a un espectrómetro de masas para análisis MS/MS (según los métodos descritos en Molecules, 2012, 17: 14821-40).

Ejemplo 5: inhibición de la síntesis de endotelina-1 mediante células endoteliales

Los efectos sobre la síntesis de endotelina-1 de procianidinas y elagitaninos purificados, bien sea solos o en combinación, se prueban en células endoteliales aórticas humanas, bovinas o porcinas cultivadas en placas de pocillos múltiples. Las células se cultivan en una incubadora de CO<sub>2</sub> con medios de crecimiento específicos hasta que

confluyen. Los extractos purificados, las fracciones de cromatografía o las procianidinas y elagitaninos aislados se evalúan después de la dilución en medio de cultivo celular y luego se incuban durante hasta 24 h con las células cultivadas. Al final del período de incubación, se recolectan muestras de medios de cultivo celular y se determina la síntesis de endotelina-1 mediante inmunoensayo de las muestras de medios. La liberación de ET-1 para cada pocillo tratado se expresa como un porcentaje de la liberación basal de los pocillos de control que contienen células incubadas con medio de cultivo celular solo. Los datos se comparan y analizan en busca de diferencias estadísticamente significativas utilizando software de ciencias de la vida tal como Graphpad Prism (disponible en [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Al final del período de incubación, las células se someten a lisis para obtener ARNm para medir los cambios en la expresión génica que indican una función endotelial mejorada. Los análisis de los niveles relativos de transcritos de ARNm se llevan a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR) (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4008-13).

#### Ejemplo 6: Estimulación de la síntesis de óxido nítrico mediante células endoteliales

Se preparan cultivos confluentes de células endoteliales como se describe en el ejemplo 5. Los cambios agudos en la síntesis de óxido nítrico se pueden estimular con el ionóforo de calcio A23187 (0.1 - 1  $\mu$ M), después de que las células se hayan preincubado durante hasta 24 h con procianidinas y elagitaninos purificados, ya sea solos o en combinación. La influencia de la citrulina y el aspartato sobre la síntesis de NO se evalúa añadiendo citrulina (0.05 - 1 mM) sola o en combinación con ácido aspártico (0.05 - 1 mM) al medio de cultivo celular durante los períodos en los que se realizan mediciones de NO. Las mediciones de NO se realizan analizando el nitrito y el nitrato totales en muestras de medios acondicionados usando la reacción de Griess, monitorizada espectrofotométricamente a 540 nm; o por medición de NO por fluorescencia con DAF-2 (4,5-diaminofluoresceína) (FEBS Letters 1998, 427: 263-266). Al final de las incubaciones, las células se pueden someter a lisis para medir la proteína eNOS mediante transferencia Western como índice de actividad de eNOS.

#### Ejemplo 7: Vasodilatación de vasos sanguíneos dependiente del endotelio

Se preparan secciones de vasos sanguíneos aislados a partir de la aorta de rata y se cortan en anillos, evitando con cuidado dañar el endotelio. Los anillos vasculares se suspenden individualmente en baños de órganos y se bañan en solución de Krebs-Ringer. Los anillos vasculares están conectados a transductores isométricos para medir el tono vascular. Después de un período de equilibrio los anillos de la aorta se precontraen con fenilefrina (1  $\mu$ mol/l) y se verifica la presencia de un endotelio funcional con acetilcolina (10  $\mu$ mol/l). La eficacia relativa de las procianidinas y elagitaninos como inductores de la vasodilatación dependiente del endotelio se evalúa construyendo curvas de concentración-respuesta acumulativas con procianidinas y elagitaninos purificados, ya sea solos o en combinación. La citrulina (0.05 - 1 mM) se agrega sola o en combinación con ácido aspártico (0.05 - 1 mM) a la solución del baño de órganos antes de agregar las combinaciones de procianidina/elagitanino y se compara con las mismas concentraciones de procianidina y elagitanino sin citrulina y ácido aspártico. Los datos se comparan y analizan en busca de diferencias estadísticamente significativas utilizando software de ciencias de la vida tal como Graphpad Prism.

#### Ejemplo 8: Producto farmacéutico para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica (ejemplo de referencia)

Se elabora una formulación farmacéutica de tableta o cápsula que contiene 125 mg de elagitaninos de frambuesa purificados como en el Ejemplo 2 y 125 mg de procianidinas de manzana purificadas como en el Ejemplo 3, más excipientes farmacéuticos apropiados. Deben tomarse de dos a ocho tabletas al día. La monitorización de biomarcadores de la respuesta al tratamiento puede realizarse mediante mediciones de péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal a intervalos mensuales.

#### Ejemplo 9: producto farmacéutico para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica

Se prepara una formulación farmacéutica de tableta o cápsula que contiene 125 mg de elagitaninos de *Epilobium* purificados que incluyen enoteína B y 125 mg de procianidinas de manzana purificadas como en el Ejemplo 3, más excipientes farmacéuticos apropiados. Deben tomarse de dos a ocho tabletas por día. La monitorización de biomarcadores de la respuesta al tratamiento puede realizarse mediante mediciones de péptido natriurético de tipo pro-B de N-terminal a intervalos mensuales.

#### Ejemplo 10: Microencapsulación de procianidinas y elagitaninos (ejemplo de referencia)

Para aumentar la estabilidad, el sabor de máscara y aumentar la biodisponibilidad, los elagitaninos y procianidinas se microencapsulan utilizando tecnología de microencapsulación de agua en aceite para productos líquidos; o maltodextrina, goma de mezquite con zeína y secada por aspersion para obtener un producto en polvo. Estos polifenoles microencapsulados se pueden incorporar directamente en productos líquidos tales como en los Ejemplos 11 y 12, o los polifenoles microencapsulados secados por aspersion se pueden incorporar en productos en polvo seco tales como en los Ejemplos 13 y 14.

#### Ejemplo 11: Bebida para el tratamiento de la hipertensión (ejemplo de referencia)

5 Se microencapsulan 250 mg de elagitaninos de frambuesa obtenidos mediante el método del Ejemplo 2 y 250 mg de procianidinas de manzana obtenidas mediante el método del Ejemplo 3. A esta mezcla se le añaden 4 g de citrulina y 3 g de ácido aspártico. La mezcla se diluye con 50 ml de agua que contiene estabilizadores de pH, edulcorantes y aromatizantes. Se pueden consumir de una a dos bebidas de 50 ml al día.

Ejemplo 12: Bebida para el tratamiento de la hipertensión.

10 Se microencapsulan 250 mg de elagitaninos obtenidos de la granada (incluida la enoteína B) y 250 mg de procianidinas obtenidos del extracto de semilla de uva. A esta mezcla se le añaden 4 g de citrulina y 3 g de ácido aspártico. Para su uso, la mezcla se diluye con 50 ml de agua que contiene estabilizadores de pH, edulcorantes y saborizantes. Se pueden consumir de una a dos bebidas de 50 ml al día.

15 Ejemplo 13: Producto ergogénico para mejorar el rendimiento deportivo y la duración del rendimiento máximo (ejemplo de referencia)

20 Polvo seco en un saquito que contiene 500 mg de elagitaninos de frambuesa microencapsulados liofilizados y 500 mg de procianidinas de manzana obtenidos mediante los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 3 se mezclan en forma de polvo con 5 g de citrulina, 4 g de ácido aspártico, polvo de hidrolizado de proteína de soja 25 g, tartrato de L-carnitina 2 g, ácido ascórbico 30 mg, acetato de tocoferol 5 mg y aromatizantes y/o edulcorantes apropiados según se requiera.

25 Para su uso, el contenido completo de un saquito se mezcla con 300 ml de agua. Se pueden consumir de uno a dos saquitos al día.

Ejemplo 14: Producto ergogénico para mejorar el rendimiento deportivo y la duración del rendimiento máximo.

30 Polvo seco en un saquito que contiene 500 mg de elagitaninos microencapsulados liofilizados obtenidos de la granada (incluida la enoteína B) y 500 mg de procianidinas obtenidos del extracto de semilla de uva se mezclan en forma de polvo con citrulina 5 g, ácido aspártico 4 g, hidrolizado de proteína de soja en polvo 25 g, tartrato de L-carnitina 2 g, ácido ascórbico 30 mg, acetato de tocoferol 5 mg y saborizantes y/o edulcorantes apropiados según se requiera.

35 Para su uso, el contenido completo de un saquito se mezcla con 300 ml de agua. Se pueden consumir de uno a dos saquitos al día.

Ejemplo 15: Inhibición de la síntesis de endotelina-1 mediante la enoteína B

40 La enoteína B (> 95% de pureza) se purificó a partir de zumo de granada mediante cromatografía Sephadex LH20 y HPLC en fase reversa (etapa 1 - Columna de HPLC Apex Prepsil 8  $\mu$ m C-18 10 x 250 mm - Cromatografía Jones; etapa 2 Luna 5  $\mu$ m PFP ( 2) Columna HPLC de 4.6 x 250 mm - Phenomenex). La capacidad para modificar la función endotelial se evaluó incubando enoteína B con células endoteliales aórticas bovinas y midiendo la síntesis de endotelina-1 siguiendo los métodos descritos anteriormente (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4008-13). Como se muestra en la Figura 1 (A), se encontró que la inhibición de la síntesis de endotelina-1 por la enoteína B depende de la concentración.

45 Ejemplo 16: Inhibición de la síntesis de endotelina-1 mediante procianidinas oligoméricas de manzana biotiniladas (Biotin-OPC)

50 Se prepararon procianidinas oligoméricas de manzana marcadas con biotina biológicamente activas como sigue: se fraccionó extracto de polifenol de manzana en Sephadex LH20 para obtener una fracción enriquecida en tetrámeros de procianidinas oligoméricas de manzana (OPC) a hexámeros. La fracción se secó, se redisolvió en dimetilformamida y se hizo reaccionar con el tetrafluorofenil éster de trietilenglicol-biotina (Thermo Scientific EZ-Link™ TFP-PEG3-Biotin). El producto de OPC biotinilado resultante se purificó mediante HPLC y se confirmó la retención de la actividad biológica usando células endoteliales aórticas bovinas midiendo la inhibición de la síntesis de endotelina-1. Como se muestra en la Figura 1 (B), se observó la inhibición de la síntesis de endotelina-1 mediante procianidinas oligoméricas de manzana biotiniladas.

Ejemplo 17: Unión incrementada de OPC biotinilada a células endoteliales

60 Se incubaron células endoteliales aórticas bovinas con enoteína B ( $\mu$ g/ml) de zumo de granada durante 30 min antes de la adición de OPC biotinilada (1  $\mu$ g/ml) sola o con enoteína B ( $\mu$ g/ml) durante 30 min. Después de eliminar la mezcla de incubación, se detectó OPC biotinilada unida mediante incubación con neutravidina-peroxidasa de rábano picante durante 1 h; seguido de la adición de sustrato TMB durante 30 minutos después de que las células se hubieran enjuagado dos veces para eliminar el exceso de neutravidina-peroxidasa de rábano picante. La unión está indicada en relación con el OPC biotinilado solo después de la sustracción de la señal de fondo. (Todos los datos se muestran como media  $\pm$  SD; \* = P <0.05; \*\* = P <0.01; \*\*\* = P <0.001 indica diferencias significativas con respecto a los valores

65

basales o de control). Como se muestra en la Figura 1 (C), la unión de procianidinas aumenta a medida que aumenta la concentración de enoteína B. De esto se puede concluir que la enoteína B aumenta la afinidad de las células endoteliales mediante las procianidinas y mejora la eficacia de las procianidinas para revertir la disfunción endotelial.

5 Ejemplo 18: Efecto de la enoteína B, extractos de elagitanino, procianidinas y mezclas de los mismos sobre la síntesis de endotelina-1 en células endoteliales.

La enoteína B (OTb, > 90% de pureza) se purificó a partir de extractos de *Epilobium* mediante cromatografía en Sephadex LH20 y HPLC C-18 en fase reversa (Apex Prepsil 8 µm C-18 10 x 250 mm columna HPLC - Cromatografía Jones). El análisis de pureza se realizó mediante HPLC utilizando una columna de HPLC Luna 5 µm PFP (2) de 4.6 x 250 mm (Phenomenex) mediante elución en gradiente a 1 ml/min con metanol (0 - 10% durante 2 min, 10 - 25% durante 30 min, y 25 - 80% durante 10 min) en ácido acético 10 mM, se midió la absorbancia UV a 263 nm, Figura 3 (A). Se preparó extracto de elagitanino de frambuesa (Rsb) a partir de semillas de frambuesa (véase el Ejemplo 1). Las procianidinas del extracto de semilla de uva se prepararon a partir del extracto de semilla de uva MegaNatural Gold (Polyphenolics Inc, Madera, CA, EE. UU.), mediante fraccionamiento en Sephadex LH20, eluyendo la fracción enriquecida de procianidinas de semilla de uva (GS-OPC) con acetona al 50%. La composición de GS-OPC se determinó mediante HPLC utilizando una columna de HPLC 100Diol-5 Develosil™ (Nomura Chemical Co. Ltd, Japón) con elución en gradiente a 0.8 ml/min: la columna se equilibró con regulador A al 95%/regulador al 5% B y se eluyó con un gradiente al 40% de regulador B durante 35 min y se mantuvo al 40% de regulador B durante 10 min (regulador A - 98% de acetonitrilo/2% de ácido acético; regulador B - 95% de metanol/3% de agua/2% ácido acético) y monitorizado por fluorescencia (Ex 276 nm/Em 336 nm). La composición de GS-OPC se enriqueció en procianidinas oligoméricas en el rango de trímero a hexámero (trímero de OPC a hexámero > 50%; composición detallada: monómero 3%, dímero 18%, trímero 16%, tetrámero 16%, pentámero 12%, hexámero 8%, heptámero 6%, OPC sin resolver ≈20%) Figura 3 (B). Manzana OPC se fraccionó en Sephadex LH20 para enriquecer la composición de procianidinas oligoméricas en el rango de trímero a hexámero (trímero de OPC a hexámero 70.6%; composición detallada: monómero 1.6%, dímero 18.0%, trímero 24.9%, tetrámero 20.4%, pentámero 15.2%, hexámero 10.1%, heptámero 5.6%, octámero 2.8%, nonámero 1.1%, decámero 0.3%) Figura 3 (C); El análisis se realizó usando una columna de HPLC 100Diol-5 Develosil™ (Nomura Chemical Co. Ltd, Japón) como para GS-OPC.

30 Ellagitaninos: enoteína B (OTb, 1 µg/ml), extracto de semilla de frambuesa (Rb-ET 2 µg/ml); Procianidinas oligoméricas (OPC): extracto de semilla de uva (GS-OPC, 1 µg/ml) y extracto de manzana (Ap-OPC, 1 µg/ml) purificados como se indicó anteriormente, se incubaron solos o en combinación con células endoteliales aórticas bovinas. durante 6 h y 24 h (Figuras 2 (A) y 2 (B)). Después de los respectivos períodos de incubación, se recolectaron muestras de medios acondicionados para el ensayo de endotelina-1 (véase Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4008-13). Los datos (media ± SD) se muestran como un porcentaje de los valores basales correspondientes a las 6 h o 24 h. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA (\*\* = P <0.01; \*\*\* = P <0.001 indica una diferencia significativa en comparación con los valores basales; +++ = P <0.001 en comparación con los componentes individuales de las combinaciones solas).

40 Mientras que los elagitaninos (enoteína B, extracto de semilla de frambuesa) y procianidinas oligoméricas (extracto de semilla de uva, GS-OPC y extracto de manzana, Ap-OPC) inhibieron la síntesis de endotelina-1 durante 6 h, las combinaciones tuvieron un efecto mayor que los extractos utilizados por separado (Figuras 2 (A)). Sin embargo, después de 24 h, los efectos de los extractos solos se redujeron mucho y solamente el extracto de semilla de frambuesa y el extracto de manzana causaron una reducción significativa. En comparación, las combinaciones de elagitaninos y procianidinas provocaron una reducción notablemente sostenida y aumentada en la síntesis de endotelina-1 (Figuras 2 (B)).

Estos datos muestran claramente que el uso de un elagitanino en combinación con una procianidina produce un efecto sinérgico sobre la función endotelial que tiene una magnitud de respuesta mucho mayor y una duración de acción más prolongada que los elagitaninos o las procianidinas solas. Es probable que la consecuencia de esta combinación sea una reversión mayor y más duradera de la disfunción endotelial.

50 Ejemplo 19: Efecto de la enoteína B, procianidinas y mezclas de las mismas sobre biomarcadores que indican la reversión de la disfunción endotelial.

55 La enoteína B (OTb, 1 µg/ml) y las procianidinas oligoméricas de manzana (Ap-OPC, 1 µg/ml) purificadas como anteriormente (véase Ejemplo 18), se incubaron solas o en combinación con células endoteliales aórticas bovinas durante 24 h. Después de 24 h de incubación, se recolectaron muestras de medios acondicionados para el ensayo de endotelina-1, y las células se sometieron a lisis para medir los niveles relativos de ARNm para endotelina-1, factor 2 tipo Kruppel (KLF2) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediante qRT-PCR (véase Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4008-13). Los niveles de ARNm se normalizaron a los niveles de ARNm del gen cuidador de la ARN polimerasa 2, y se muestran en la Figura 4 como relaciones para controlar los niveles de los respectivos ARNm. Los datos se muestran como media ± SD. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA (\*\* = P <0.01; \*\*\* = P <0.001 indica una diferencia significativa entre los efectos de OTB y OPC en combinación en comparación con los valores de control, enoteína B sola y OPC de manzana sola).

Si bien el uso de enoteína B o de OPC de manzana solo durante 24 h tiene algún efecto sobre los niveles de ARNm de KLF2, los efectos son relativamente insignificantes (véase Figura 4 (A)). Sin embargo, cuando se usa enoteína B en combinación con OPC de manzana, el aumento de los niveles de ARNm de KLF2 es notable y es indicativo de una interacción sinérgica entre el elagitanino y la procianidina. Se encuentran resultados similares en otros biomarcadores de la función endotelial. Por lo tanto, el uso de enoteína B o de OPC de manzana tiene poco efecto sobre los niveles de ARNm de eNOS después de 24 h (véase Figura 4 (B)). Sin embargo, cuando se utilizan enoteína B y OPC de manzana en combinación, se observa un aumento significativo en la expresión de eNOS. Volviendo a las Figuras 4(C) y 4(D), el ARNm de endotelina-1 (ET-1) y la síntesis total de endotelina-1 no se ven afectados en gran medida por el uso bien sea de enoteína B o de OPC de manzana solos durante 24 h, mientras que el uso de enoteína B en combinación con OPC de manzana da como resultado una disminución marcada en los niveles de ARNm de endotelina-1 y la síntesis total de endotelina-1.

Estos datos muestran claramente que el uso de un elagitanino en combinación con una procianidina/proantocianidina puede producir un efecto sinérgico sobre biomarcadores funcionales que indican la reversión de la disfunción endotelial.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Enoteína B para uso en terapia para tratar, prevenir o retrasar la aparición de disfunción endotelial donde el tratamiento, prevención o retraso comprende administrar enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina bien sea de manera simultánea o secuencial y en cantidades terapéuticamente efectivas.
- 10 2. Enoteína B para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento, la prevención o el retraso de la disfunción endotelial comprende además administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina.
- 15 3. Una composición que comprende enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, que comprende además citrulina o una sal de citrulina y/o ácido aspártico o un aspartato.
- 20 4. Una composición de la reivindicación 3 que comprende enoteína B en combinación con al menos una proantocianidina, que comprende además ácido aspártico o un aspartato.
- 25 5. Una composición de la reivindicación 3 que consiste esencialmente en enoteína B; al menos una proantocianidina; citrulina o una sal de citrulina; y ácido aspártico o un aspartato.
- 30 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende además al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la composición es farmacéuticamente aceptable y está en forma de dosificación unitaria, preferiblemente en donde la forma de dosificación unitaria se selecciona de tabletas, cápsulas, tabletas bucales, tabletas que se desintegran por vía oral, tabletas orales de disolución rápida, tableta dispersable, masticatoria, gránulos, suspensión seca, inyección, solución, formulación de liberación lenta, formulación de liberación controlada y formulación de liberación rápida.
- 40 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde al menos una proantocianidina es al menos una procianidina, preferiblemente en donde al menos una proantocianidina es una mezcla que comprende trímeros de procianidina, tetrámeros de procianidina, pentámeros de procianidina y/o hexámeros de procianidina.
- 45 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la proantocianidina tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 1900 Dalton.
- 50 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde dicha proantocianidina se obtiene de manzana, grano de cacao, arándano, semilla de uva, espinos, corteza de pino marítimo o sorgo, y opcionalmente está enroquecido en el rango de tamaño de trímero a hexámero y galolado.
- 55 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde la enoteína B se obtiene de frutos de granada o de cualquier planta del género *Epilobium*, preferiblemente en donde dicha planta es *Epilobium parviflorum* (salicaria peluda de flor pequeña).
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde la relación en peso de enoteína B a la al menos una proantocianidina está en el rango de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, para uso en terapia, preferiblemente para uso en la prevención, tratamiento o retraso en la aparición de disfunción endotelial.
14. Enoteína B para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la disfunción endotelial está en forma de una o más enfermedades seleccionadas de arteriosclerosis, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad arterial periférica, diabetes, insuficiencia renal crónica y disfunción eréctil.
15. Un proceso para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho proceso comprende mezclar al menos una proantocianidina, enoteína B y ácido aspártico o aspartato y/o citrulina o una sal de citrulina, en cualquier orden.

Fig. 1

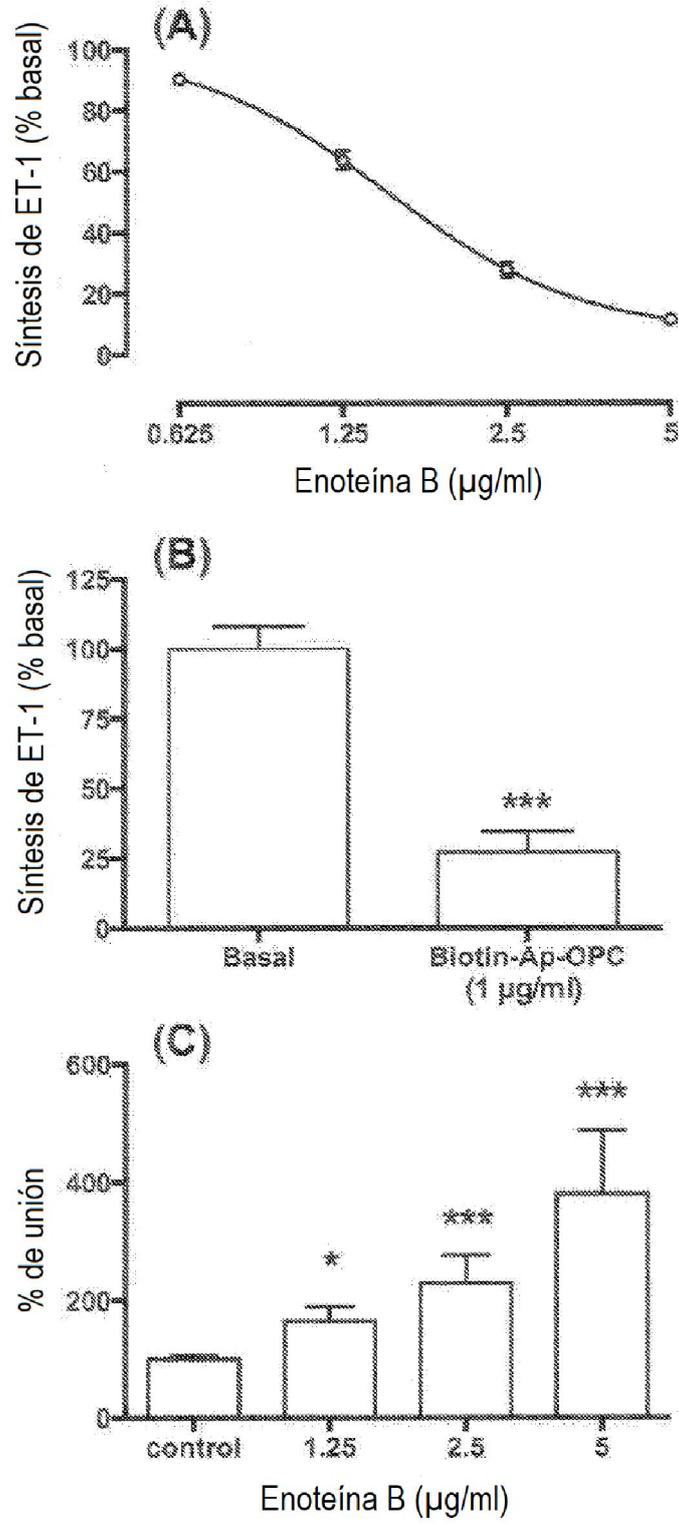


Fig. 2

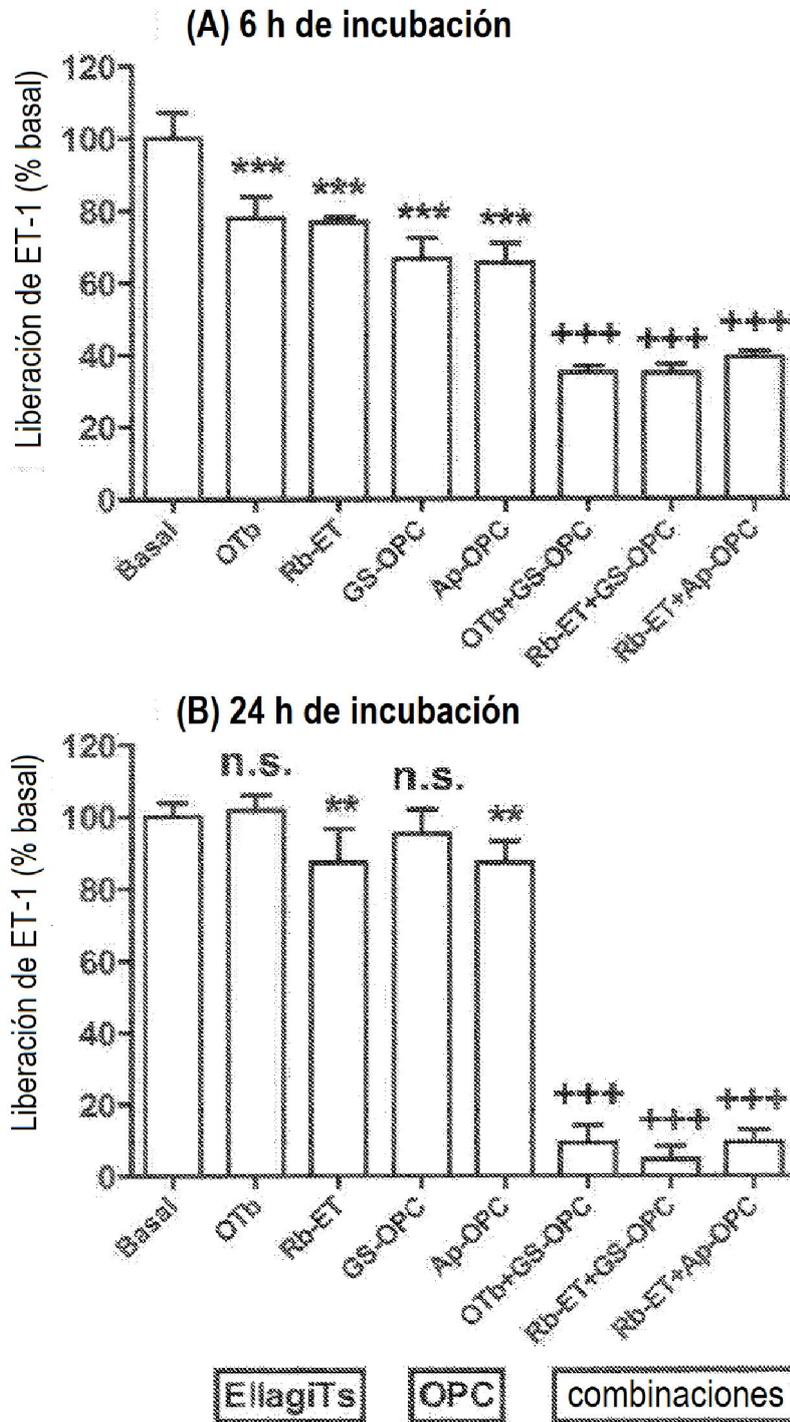


Fig. 3

(A) Enoteína B

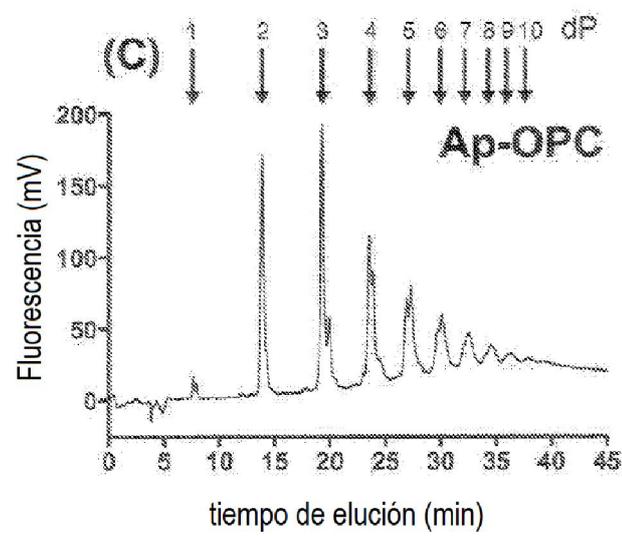
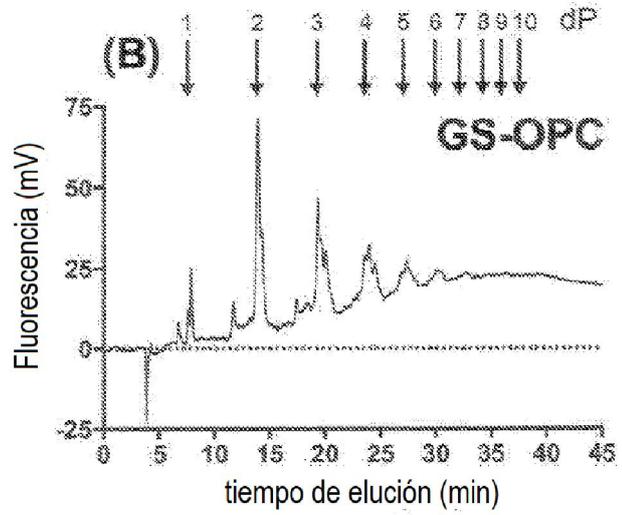
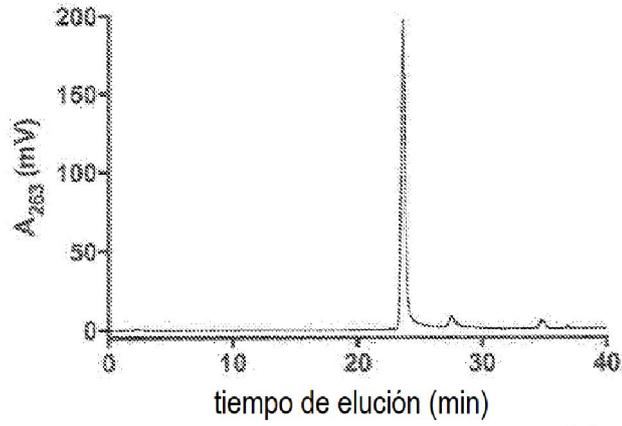


Fig. 4

