

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 173**

21 Número de solicitud: 202330418

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/191 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

26.05.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.11.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.11.2023

Fecha de concesión:

01.04.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.04.2025

73 Titular/es:

FUNDACION GAIKER (50.00%)
Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia,
Edificio 202
48170 Zamudio (Bizkaia) ES y
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.00%)

72 Inventor/es:

ANDRÉS JUAN, Celia;
PÉREZ LEBEÑA, Eduardo y
GOÑI DE CERIO, Felipe

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **COMPLEJO DE INCLUSIÓN CUATERNARIO DE HIDROXITIRO SOL, TRIPTÓFANO, ARGININA Y GLUCONATO DE ZINC, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USO**

57 Resumen:

Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, triptófano, arginina y gluconato de zinc, método de obtención y uso.

Es objeto de la invención un complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc en solución acuosa, caracterizado por que comprende: (a) entre 5% y 9% en peso del polifenol hidroxitirosol, (b) entre 6% y 12% en peso de arginina, (c) entre 3% y 5% en peso de triptófano, (d) entre 1,4% y 2,3% en peso de gluconato de zinc y (e) agua, en el porcentaje necesario hasta completar el 100% en peso, y donde dicho complejo de inclusión cuaternario en solución acuosa no comprende ningún disolvente orgánico, surfactante o emulsionante químico en su composición. Es asimismo objeto de la invención su método de obtención y su uso en aplicaciones farmacológicas o nutraceuticas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 990 173 B2

DESCRIPCIÓN

COMPLEJO DE INCLUSIÓN CUATERNARIO DE HIDROXITIRO SOL, TRIPTÓFANO, ARGININA Y GLUCONATO DE ZINC, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USO

5

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se encuadra en el ámbito general de la Química, más en concreto en la Química Orgánica, y tiene su aplicación en el sector farmacológico. De forma más particular, se encuadra en el sector de composiciones que actúan como estimuladores del sistema inmunitario y también sirve para el control y regulación de las células supresoras de origen mieloide (MDSC, por sus siglas en inglés).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Las células supresoras de origen mieloide (MDSC, por sus siglas en inglés) se descubrieron hace 50 años en pacientes con cáncer, y su función en el sistema inmunitario se centra en la regulación a la baja de las respuestas inmunitarias durante el cáncer y otras enfermedades de tipo infeccioso.

20 Los primeros estudios sobre la acumulación de células mieloides inmunosupresoras asociada a la progresión tumoral se publicaron a partir de principios de los años setenta. Durante los años ochenta y principios de los noventa, los trabajos de los laboratorios de Diana López, Jim Talmadge, M. Rita Young y Hans Schreiber demostraron que varios tipos de células mieloides inhibían la función inmunitaria durante la progresión de las células neoplásicas.

Las células MDSC están presentes en prácticamente todas las personas que padecen cáncer, deterioran la inmunidad adaptativa e innata antitumoral y promueven la progresión de la enfermedad a través de mecanismos no inmunitarios. Su presencia generalizada, combinada con una multitud de actividades peritumorales, las convierte en un importante obstáculo para los tratamientos de estimulación inmunoterápica, así como los tratamientos con anticuerpos.

35 Son una población heterogénea de células que se expanden más allá de su regulación fisiológica durante patologías como el cáncer, la inflamación y las infecciones bacterianas y víricas, y su característica clave es su notable capacidad para suprimir las respuestas de las

células T y las células NK asesinas. Las MDSC regulan el sistema inmunitario y las respuestas asociadas en el contexto de diversas enfermedades. Aunque la función principal de las MDSC polimorfonucleares es amortiguar la respuesta de las células T y las células asesinas NK, también producen especies reactivas de oxígeno ROS y especies reactivas de nitrógeno RNS.

Las células MDSC se forman a partir de células progenitoras de la médula ósea cuando los procesos mielopoyéticos se ven alterados y proliferan en condiciones patológicas. Se diferencian de otros tipos de células mieloides en que presentan una actividad inmunosupresora, en contraposición a propiedades inmunoestimuladoras, e interactúan con otras células inmunitarias como las células T, las células dendríticas, los macrófagos y las células asesinas naturales NK, e incluso regulan sus funciones.

Los principales objetivos de las MDSC son las células T y los principales factores implicados en la supresión inmunitaria incluyen la arginasa ARG1, la iNOS, el TGF- β , la IL-10, la COX2, el secuestro del triptófano por la indolamina 2,3-dioxigenasa IDO, la disminución de la expresión de L-selectina por las células T y varios otros. Las M-MDSCs y las PMN-MDSCs utilizan diferentes mecanismos de supresión inmunitaria, las primeras (tipo M) suprimen las respuestas de las células T tanto específica como inespecíficamente utilizando mecanismos asociados al óxido nítrico NO y a la producción de citoquinas. Las PMN-MDSC suprimen las respuestas inmunitarias mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que resultan esenciales para mantener esta capacidad.

La activación de las MDSC está mediada por la expresión de citocinas inflamatorias y por reguladores transcripcionales. Los tumores en crecimiento producen citocinas y otras sustancias que favorecen el desarrollo de las MDSC, como los factores estimulantes de colonias G-CSF y GM-CSF y la interleucina IL-6 promotora de MDSC, impidiendo la activación de las células T y limitando la disponibilidad de aminoácidos necesarios para la proliferación de células T, como la arginina, o produciendo sustancias que bloquean el reconocimiento de antígenos. Las MDSC producen arginasa 1 ARG1, que compite por el consumo del sustrato arginina, agotándolo, lo que resulta en la pérdida de la cadena del receptor de células T, que resulta esencial para su activación. Resultados recientes en ratones con tumores y en pacientes humanos con cáncer indican que el metabolismo aumentado de ARG1 por las MDSC es un factor principal en la inhibición de las respuestas de las células T.

La inmunidad tumoral ha revolucionado la terapia oncológica en los últimos años y representa una nueva vía para mejorar la terapia del cáncer restaurando la respuesta inmunitaria, pero la evasión del sistema inmunitario es una característica clave de los tumores. Para establecerse con éxito en un huésped y seguir creciendo, las células tumorales utilizan señales bioquímicas para ocultarse de la respuesta inmunitaria del huésped y pasar desapercibidas. Las células MDSC siguen siendo un obstáculo importante para la inmunoterapia y contribuyen al fracaso del tratamiento, a la reducción de la esperanza de vida y al mal pronóstico. La inmunoterapia de bloqueo de puntos de control CBI ha supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer porque el sistema inmunitario adaptativo del paciente puede erradicar las células malignas una vez neutralizados los mecanismos inmunosupresores. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios han mejorado con éxito los resultados en varios tipos de tumores, y la terapia basada en células inmunitarias también está ganando atención. Sin embargo, este tratamiento sólo es eficaz en un reducido grupo de pacientes con cáncer, ya que otros mecanismos inmunosupresores bloquean la inmunidad antitumoral inducida por células T.

Recientes evidencias indican que la mayoría de dichas terapias se hallan amenazadas por una compleja red de mecanismos inmunosupresores que dominan el microambiente tumoral. Estas estrategias de inmunosupresión incluyen la expansión selectiva y el reclutamiento de una amplia diversidad de células regulatorias entre las cuales las células MDSC juegan un papel preferente.

La producción excesiva de estas células se considera un factor importante en el éxito o el fracaso de la inmunoterapia contra el cáncer. Los niveles elevados de MDSC en el microambiente tumoral se correlacionan con una peor supervivencia en pacientes con tumores sólidos y pueden mediar en la resistencia a la inmunoterapia. Aunque su función principal es suprimir la respuesta de las células T y las células asesinas NK, las PMN-MDSC pueden generar especies reactivas de oxígeno ROS y especies reactivas de nitrógeno RNS.

En definitiva, actualmente está claro que el éxito de la inmunoterapia del cáncer sólo será posible con una estrategia que implique la eliminación de los factores supresores, ya que representan un obstáculo crítico para el éxito de estas nuevas estrategias.

Como antecedentes de la invención se pueden mencionar los siguientes documentos:

Pérez de la Lastra J.M. et al.: "*Hydroxytyrosol and Arginine as Antioxidant, Anti-Inflammatory and Immunostimulant Dietary Supplements for COVID-19 and Long COVID*", Foods, 2023,

Vol. 12, ISSN 2304-8158, describe la utilización conjunta de arginina e hidroxitirosol para tratar los problemas relacionados con la COVID 19. Si bien dicha publicación se refiere a la mejora en la respuesta inmune frente a determinados procesos patológicos que cursan con un aumento de MDSCs y, por consiguiente, con un debilitamiento de la respuesta inmune, no divulga ni sugiere la posibilidad de crear un complejo de inclusión que, adicionalmente a la arginina e hidroxitirosol, comprenda triptófano y gluconato de zinc, lo cual se ha demostrado que permite mejorar, de manera sorprendente, la biodisponibilidad del hidroxitirosol y del triptófano, evitando la necesidad de emplear disolventes orgánicos, surfactantes o emulsionantes.

ES 2731554 describe un procedimiento para crear un complejo de inclusión que puede comprender hidroxitirosol. Este procedimiento está basado en la adición y mezcla con sonicación de los distintos componentes del complejo de inclusión. Sin embargo, ES 2731554 no divulga ni sugiere la posibilidad de desarrollar un método capaz de obtener un complejo de inclusión cuaternario de acuerdo a la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un primer objeto de la invención un complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc en solución acuosa, que comprende:

- a) entre 5% y 10% en peso del polifenol hidroxitirosol, preferentemente 7% en peso,
- b) entre 6% y 12% en peso del aminoácido arginina, preferentemente 10% en peso,
- c) entre 3% y 5% en peso del aminoácido triptófano, preferentemente 4% en peso,
- d) entre 1,4% y 2,3% en peso de gluconato de zinc, preferentemente 1,8% en peso,
- e) agua, en el porcentaje necesario hasta completar el 100% en peso,

y donde dicho complejo de inclusión en solución acuosa no comprende ningún disolvente orgánico, surfactante o emulsionante químico en su composición.

En una realización particular de la invención, el complejo de inclusión puede presentarse en forma sólida, sin incluir agua en su composición. En particular, como se describirá más adelante en relación a su proceso de obtención, una vez obtenido el complejo de inclusión en solución acuosa, éste puede ser sometido a continuación a un proceso de liofilización, dando lugar al complejo de inclusión en estado sólido, el cual es totalmente soluble en agua. Ello se debe a que el complejo de inclusión reivindicado se trata de una sal, cuyos componentes están unidos por interacciones moleculares de puente de hidrógeno, fundamentalmente, pero también con ciertas interacciones de carácter iónico y/o covalente.

- Una de las principales ventajas que ofrece el complejo de inclusión cuaternario objeto de la invención frente a otros productos descritos en el estado de la técnica es la sorprendente mejora que presenta en cuanto a la solubilidad de sus principios activos, el hidroxitirosol, el triptófano y la arginina, en agua. En particular, se ha demostrado que el complejo de inclusión cuaternario reivindicado permite multiplicar por cuatro el porcentaje de solubilización del hidroxitirosol en agua y por 50 la solubilización del triptófano en agua, que son valores absolutamente inesperados. Asimismo, se consigue alcanzar una solubilidad de la arginina en agua de hasta 200 g/l.
- Adicionalmente, ofrece la ventaja de que se trata de un complejo inocuo, basado en compuestos naturales y que no requiere en su formulación del empleo de compuestos químicos, como disolventes (glicerina, propilenglicol, etc.), emulsionantes (como lecitina de soja) o surfactantes (como, por ejemplo, lípidos o proteínas, entre otros), a diferencia de otros productos habituales del estado de la técnica. Es importante señalar que los componentes del complejo de inclusión cuaternario reivindicado son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), favoreciendo así su empleo en compuestos nutracéuticos, farmacológicos o cosméticos. Se trata, por tanto, de un producto que respeta el medio ambiente y que no deteriora los ecosistemas, y no comprende sustancias tóxicas, basándose en compuestos naturales y de grado alimentario humano.
- Asimismo, gracias al empleo de agua como disolvente, se consigue una gran eficacia en el proceso de absorción gastrointestinal, a diferencia de los productos basados en disolventes orgánicos, surfactantes o emulsionantes químicos, los cuales presentan una peor solubilidad en agua, absorción intestinal y pobre biodisponibilidad.
- Los linfocitos T son extremadamente sensibles a la escasez de triptófano, ya que provoca la detención de su ciclo celular. Al agotar el triptófano en los entornos tisulares locales, la enzima Indoleamina 2,3-dioxigenasa IDO1 (catabolizadora del mismo), induce a las células T a la apoptosis. Por otra parte, la privación de triptófano bloquea la diferenciación de células T en células efectoras citolíticas. Una vez que se han diferenciado en células efectoras, los linfocitos T pueden permanecer en los órganos linfáticos para ayudar a los linfocitos B o bien migrar a los lugares de infección o al entorno peritumoral, donde pueden realizar varias funciones, entre ellas la activación de los macrófagos. Por esta razón es importante que los linfocitos maduren y adquieran la diferenciación.
- La actividad metabólica está íntimamente relacionada con el destino y la función de las células T y, en concreto, el metabolismo es esencial en su diferenciación, polarización y

supervivencia. Una elevación de los niveles de L-arginina induce el cambio de la glucólisis a la fosforilación oxidativa en las células T activadas y promueve la generación de células similares a la memoria central, dotadas de una mayor capacidad de supervivencia y de actividad antitumoral. Así pues, las concentraciones intracelulares de L-arginina influyen directamente en la aptitud metabólica y la capacidad de supervivencia de las células T, que son cruciales para las respuestas antitumorales. De hecho, las células T cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de L-arginina conservan la capacidad de diferenciarse en células efectoras Th1 y, adicionalmente, la suplementación con L-arginina aumenta significativamente la supervivencia de las células CD4⁺ y CD8⁺ activadas, lo que indica que una menor disponibilidad de L-arginina intracelular afecta negativamente a su supervivencia.

El polifenol hidroxitirosol pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como tirosoles, que contienen una fracción de alcohol alifático con uno o dos grupos hidroxilos en el grupo bencénico y se encuentra principalmente en las aceitunas (*Olea europaea*), el aceite de oliva, la piel de la uva (*Brassica napus var. napus*) y el vino, pero también se ha detectado en alimentos como el clavo (*Syzygium aromaticum*) y las frutas. El hidroxitirosol es un orto-difenol con una importante actividad biológica, bien en forma libre o en forma de éster (oleuropeina) y proporciona al aceite de oliva una elevada estabilidad, debido a la gran actividad antioxidante que posee. También tiene capacidad antiinflamatoria, propia de los polifenoles en general.

El hidroxitirosol se considera seguro (como nuevo alimento) para el consumo humano, hasta un nivel de 50 mg diarios por kg de peso corporal, según la evaluación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En Estados Unidos, el hidroxitirosol también se considera un ingrediente seguro (GRAS).

En el contexto de la presente invención, se entiende por inmunomoduladora una sustancia o complejo que favorece y mejora el rendimiento del sistema inmune, tanto del innato como del adaptativo, en particular regulando a la baja la expresión de las células MDSC. En particular, el complejo de inclusión cuaternario reivindicado (así como cualquier composición que lo comprenda) tiene la capacidad de modular y reducir la aparición de las células MDSC en el entorno del tumor, de una infección o de una inflamación crónica, y de esta manera reducir la anulación de las células T y NK, que son células fundamentales en los mecanismos de defensa del sistema inmunitario humano.

Una de las ventajas principales de la invención es que se trata de un complejo de inclusión cuaternario basado en sustancias naturales, seguras y biodegradables, al tiempo que mejora la biodisponibilidad del hidroxitirosol, y de manera muy significativa la del triptófano, lo que nos permite eliminar la presencia de disolventes orgánicos, surfactantes o emulsionantes.

Es asimismo objeto de la invención una composición caracterizada por que comprende el complejo de inclusión cuaternario reivindicado, bien en solución acuosa o bien en estado sólido, una vez sometido a un proceso de liofilización el complejo de inclusión en solución acuosa que, al tratarse de una sal, conserva su solubilidad en agua.

Adicionalmente, es objeto de la invención un método para obtener un complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, triptófano, arginina y gluconato de zinc en solución acuosa que comprende las siguientes etapas:

- a) añadir entre 5% y 10% en peso del polifenol hidroxitirosol, preferentemente 7% en peso, en agua preferentemente desionizada o destilada y agitar preferentemente a una velocidad de agitación de entre 300 y 1000 rpm hasta obtener una mezcla dispersada, parcialmente solubilizada en el medio;
- b) añadir, bajo agitación (preferentemente a una velocidad de agitación de entre 300 y 1000 rpm), entre un 6% y un 12% en peso del aminoácido arginina, preferentemente un 10% en peso, a la mezcla obtenida en la etapa (a);
- c) añadir, bajo agitación (preferentemente a una velocidad de agitación de entre 300 y 1000 rpm), entre un 3% y un 5% en peso del aminoácido triptófano, preferentemente un 4% en peso, a la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) añadir, bajo agitación (preferentemente a una velocidad de agitación de entre 300 y 1000 rpm), entre un 1,4% y un 2,3% en peso de gluconato de zinc, preferentemente un 1,8% en peso, a la mezcla dispersada obtenida en la etapa (c);
- e) calentar hasta una temperatura de entre 40°C y 60°C, preferentemente entre 45°C y 55°C, manteniendo la agitación preferentemente a una velocidad de entre 300 y 1.000 rpm, detener la agitación una vez alcanzada dicha temperatura y aplicar ultrasonidos con una frecuencia preferentemente comprendida entre 15 y 25 kHz, y más preferentemente entre 20 y 25 kHz, hasta completar la disolución total del hidroxitirosol y la formación del complejo de inclusión cuaternario. De manera preferente, la aplicación de ultrasonidos (sonicación) puede llevarse a cabo durante periodos de 2 minutos cada uno, durante un tiempo total de 10 minutos; y

f) opcionalmente, dejar enfriar el complejo de inclusión en solución acuosa hasta alcanzar una temperatura comprendida entre 20°C y 25°C, y donde dicho método se lleva a cabo sin adicionar disolventes orgánicos, surfactantes o emulsionantes químicos.

5

En una realización particular de la invención, el método reivindicado puede comprender una etapa adicional final de secado o liofilización (preferentemente, mediante evaporación a vacío a una temperatura de entre 20 y 25°C), dando lugar a un complejo de inclusión liofilizado, en estado sólido. Como se ha descrito anteriormente, puesto que el propio
10 complejo de inclusión se trata de una sal, una vez liofilizado mantiene la propiedad de ser completamente soluble en agua.

Adicionalmente, es objeto de la invención un complejo cuaternario tal y como ha sido reivindicado, bien en solución acuosa o bien en estado sólido, así como cualquier
15 composición que lo comprenda, para su uso como medicamento, preferentemente de administración por vía oral, aunque también puede ser suministrado por vía parenteral.

Adicionalmente, es objeto de la invención un complejo cuaternario tal y como ha sido reivindicado, bien en solución acuosa o bien en estado sólido, así como cualquier
20 composición que lo comprenda, para su uso como inmunomodulador (es decir, capaz de estimular el sistema inmunitario), como regulador del sistema vascular y/o para regular a la baja de la concentración de células MDSC.

Finalmente, es objeto de la invención el uso del complejo cuaternario reivindicado (así como
25 cualquier composición que lo comprenda) como nutracéutico (entendiendo como tal un producto alternativo a un medicamento con beneficios fisiológicos) o como cosmético, particularmente, para uso tópico en cremas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 Figura 1.- FIG. 1A. Imagen de la estructura de las formas resonantes del grupo guanidinio; y FIG. 1B. Estructura promedio espacial del guanidinio.

Figura 2.- FIG. 2A. Estructura molecular del hidroxitirosol y FIG. 2B. Estructura espacial del hidroxitirosol. Contenido energético de -5,91 kcal/mol.

35

Figura 3.- FIG. 3A. Estructura molecular de la arginina y FIG. 3B. Estructura espacial de la arginina. Contenido energético de 7.2 kcal/mol.

Figura 4.- FIG. 4A. Estructura molecular del triptófano y FIG. 4B. Estructura espacial del triptófano. Contenido energético de 3,76 kcal/mol.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal y como se ha descrito previamente, la presente invención ofrece un nuevo desarrollo para incrementar la solubilización del hidroxitirosol, el triptófano y la arginina en agua, que no ha sido descrito hasta el momento en la literatura técnica. El nuevo complejo de inclusión cuaternario reivindicado consigue aumentar hasta 4 veces la solubilidad del hidroxitirosol en agua y 50 veces la solubilidad del triptófano en agua. Adicionalmente, permite aumentar la solubilidad de la arginina en agua hasta 200 g/l y está especialmente indicado para su empleo en la elaboración de composiciones inmunomoduladoras y reguladoras del sistema vascular.

En el contexto de la presente invención, la formación del complejo se produce como consecuencia de la pérdida del protón por parte de un hidroxilo fenólico del anillo aromático del hidroxitirosol, el cual se traslada desde esta molécula hasta la estructura resonante del grupo guanidinio, que queda cargada positivamente. El hidroxilo fenólico tiene mayor acidez que el del grupo alifático y, por lo tanto, es más reactivo, con mayor tendencia a ceder el protón y quedar cargado con un radical libre que se deslocaliza por resonancia a lo largo del anillo aromático bencénico.

La eficacia del producto objeto de la presente invención, unido a su elevada biodisponibilidad, hace que sea un producto realmente ventajoso en comparación con los compuestos nutracéuticos, farmacológicos y cosméticos conocidos en el mercado, que apenas llegan a disolver un 0,012% del triptófano y un 3% de hidroxitirosol en agua. Junto a esto, el complejo de inclusión cuaternario reivindicado está constituido por componentes naturales eficaces, evitando así el uso de químicos responsables de efectos tóxicos para el medioambiente o con consecuencias secundarias indeseadas en el cuerpo humano.

Como se ha descrito anteriormente, cabe destacar que, gracias a la composición química del complejo de inclusión cuaternario reivindicado, se ha incrementado de manera sorprendente e inesperada la solubilidad del triptófano, así como la del hidroxitirosol, aunque en menor medida. De hecho, se ha demostrado que la solubilidad del hidroxitirosol se

incrementa con la concentración de la arginina, presente entre un 6% y un 12% en peso, facilitando así la formación del complejo de inclusión cuaternario entre los tres compuestos por interacciones moleculares débiles o de corto alcance entre las moléculas de dichos compuestos en agua. En particular, dichas interacciones consisten en enlaces por puentes
5 de hidrógeno entre los compuestos descritos, es decir, los solubles en agua (arginina y gluconato), el insoluble (triptófano) y el parcialmente soluble (hidroxitirosol). El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática que proporciona gran estabilidad, pero menor que el enlace covalente o el iónico. En la aparición de estos enlaces es esencial la acción de los ultrasonidos que se aplican durante el método de obtención del complejo de inclusión
10 cuaternario.

En realizaciones particulares de la presente solución, el complejo de inclusión cuaternario está formado por los compuestos descritos, dando lugar a una composición en solución acuosa con un pH comprendido entre 8 y 11, de carácter catiónico por la presencia del
15 grupo guanidinio de la arginina, según se muestra en la Figura 1, con gran tendencia a captar el protón del grupo hidroxilo fenólico del hidroxitirosol y del grupo carboxilo del triptófano, y quedar cargado positivamente, dando el carácter catiónico al complejo formado. En realizaciones preferidas, el pH de la solución acuosa estará comprendido entre 9 y 10.

20 Una gran ventaja del complejo de inclusión cuaternario reivindicado es que no precisa de la incorporación de disolventes orgánicos, emulsionantes o surfactantes para mejorar su solubilidad y biodisponibilidad en solución acuosa, a diferencia de otros productos alternativos del estado de la técnica, los cuales llevan asociado un cierto riesgo de toxicidad.

25 Por lo tanto, se trata de una solución muy ventajosa con respecto a los compuestos que existen actualmente en el mercado, ya que con una simple elaboración del complejo de inclusión cuaternario se obtiene un producto muy estable, el cual se vehicula de forma más elemental que otras alternativas basadas en aceites y emulsionantes, polielectrolitos, así como otros productos más complicados de encapsulación, con el consiguiente ahorro
30 económico. Aunque es conocido que la estabilidad de las soluciones se puede mejorar mediante la adición de agentes surfactantes, por razones de sostenibilidad medioambiental el producto objeto de la invención no los contiene en su composición.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el complejo de inclusión cuaternario
35 inmunoestimulador y regulador de las células MDSC permite diluciones en cantidades sucesivas de agua, manteniendo la solubilidad de los compuestos del complejo de inclusión

cuaternario de forma sorprendente, sin precipitar dentro del agua o sin formar un polvo aislado en la superficie libre del líquido.

Debido a que la arginina forma un complejo de inclusión cuaternario que aumenta al menos 4 veces la solubilidad del hidroxitirosol y 50 veces la solubilidad del triptófano, en realizaciones particulares de la invención el complejo de inclusión cuaternario mantendrá su solubilidad en agua aún en cantidades de 1 litro de complejo de inclusión cuaternario diluido en agua en una cantidad de entre 30 litros y 100 litros. De forma sorprendente, se ha comprobado cómo el complejo reivindicado no acaba precipitando en la mezcla a medida que aumenta la cantidad de agua en la solución. Ello se debe al fenómeno que se ha descrito anteriormente, referente a la biodisponibilidad del complejo de inclusión cuaternario para poder aplicarse en las personas y poder tener un mayor efecto inmunoestimulador y regulador de las células MDSC, como es el caso de la presente invención. Esto tiene una importancia relevante, ya que cuando esta composición ingresa en el cuerpo humano se va metabolizando y diluyendo progresivamente en el plasma y en los fluidos corporales internos, manteniendo su solubilidad y su biodisponibilidad.

EJEMPLOS

1. Procedimiento de obtención y caracterización de un complejo de inclusión cuaternario según ha sido reivindicado.

Se parte de la producción del complejo entre los tres compuestos (hidroxitirosol, arginina y gluconato de zinc), de acuerdo con la siguiente composición y procedimiento:

A 772 g de agua desionizada o destilada se añaden 70 g de hidroxitirosol en polvo y, después de 5 minutos de agitación, de forma que el polvo se encuentre parcialmente solubilizado en agua y distribuido uniformemente el resto, se añaden 100 g del aminoácido arginina, 40 gramos del aminoácido triptófano y 18 g de gluconato de zinc bajo agitación (500 rpm). Se calienta hasta alcanzar una temperatura de 40°C a 45°C y se aplican ultrasonidos, siendo estas condiciones necesarias y suficientes para la formación del complejo de inclusión cuaternario en agua. Se mezclan mediante agitación los distintos componentes (hidroxitirosol, arginina y gluconato de zinc) y el complejo resultante se estabiliza y homogeneiza, introduciendo directamente en la solución el cabezal del sonicador del equipo de ultrasonidos (con una frecuencia de 20 kHz). La sonicación se lleva a cabo durante periodos de 2 minutos cada uno, y un tiempo total de 10 minutos, no dejando

que la solución se caliente por encima de 50°C. La solución resultante, protegida de la luz, cambia de color hasta adquirir un color amarillo ocre. Posteriormente, se puede envasar el complejo de inclusión cuaternario ya formado. No se puede alterar el pH de la solución resultante para evitar que se formen precipitados no deseables. La solución acuosa obtenida puede ser liofilizada para tener un polvo que puede ser compactado para formar pastillas, de acuerdo con las técnicas habituales de la farmacopea.

2. Análisis y determinación informática de la formación del complejo de inclusión entre el hidroxitirosol y la arginina.

La verificación informática de la formación del complejo se fundamenta en el estudio del contenido energético del mismo, que se calculó utilizando el software ChemBio3D Ultra 16.0 (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) y el método de cálculo de Mecánica Molecular (MM2). Se realizaron cálculos para obtener la energía de la estructura 3D molecular, analizando la energía del estado basal. Cuanto menor es la energía final, mayor es la estabilidad de la molécula. El MM2 es un método que sirve para determinar la geometría, energías moleculares, espectros vibracionales y entalpías de formación de moléculas en su estado basal y se utiliza habitualmente para determinar el comportamiento de grandes moléculas de importancia biológica y farmacéutica. Suele utilizarse para determinar las geometrías de grandes moléculas, como las de importancia biológica y farmacéutica, que están fuera del alcance de métodos más intensivos basados en los orbitales moleculares. Por esta razón, el MM2 no es útil para modelar estados de transición de procesos químicos con un gran espectro de pasos experimentales.

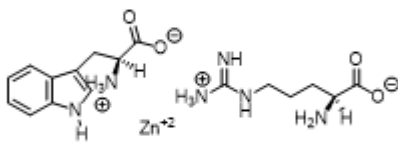
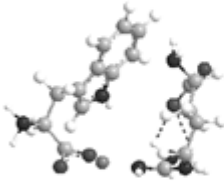
Se realizaron varios cálculos para obtener la energía de diferentes conformaciones de un mismo complejo 3D, analizando y exponiendo aquellas con menor energía de formación. Se estimaron diferentes conformaciones tridimensionales para el complejo formado. El contenido energético total, expresado en kcal/mol, de cada molécula se describe mediante la suma de las siguientes interacciones:

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Estiramiento("stretching")}} + E_{\text{Doblamiento("Bending")}} + E_{\text{Torsión("Torsion")}} + E_{\text{Interacción no vinculada("Non-bonded inte")}}$$

Para verificar el contenido energético del complejo formado entre ambos, se estudiaron su estructura conformacional y su interrelación mediante formación de puentes de hidrógeno. A continuación se expusieron diferentes posibilidades espaciales de la formación del complejo

triptófano-arginina, ya que es el más importante, dada la nula solubilidad del triptófano en agua.

Tabla 1

		-952,85
---	--	---------

5

Del estudio energético de las diferentes posibilidades de formación de la sal entre el triptófano y la arginina mediante formación de enlaces por puente de hidrógeno, se concluye que el sexto estudio es el más favorable energéticamente y por lo tanto es el que va a ocurrir, ya que ocurre la protonación del grupo guanidinio de la arginina y del grupo amino libre del triptófano, mediante la cesión de protones de los grupos carboxílicos presentes en ambos aminoácidos.

10

3. Tratamiento de enfermos de cáncer para la estimulación y mejora del sistema inmune y regulación de las células MDSC con el compuesto preparado en el Ejemplo 1

15

Se llevó a cabo un ensayo a pequeña escala, a lo largo de dos años, con cinco personas con edades comprendidas entre 50 y 75 años, pacientes de cáncer, que recibían tratamiento contra el mismo mediante quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia. El tratamiento con el compuesto descrito se ha administrado durante los intervalos entre los tratamientos clásicos convencionales. La prueba realizada fue la ingesta, tres veces al día, del complejo de inclusión según se ha descrito en el ejemplo 1. Analizando su estado general y mediante muestras de sangre, se ha verificado en los resultados un mantenimiento de las células PMN-MDSC y de las M-MDSC en concentraciones que duplican los valores habituales de personas sanas, cuando en algunos cánceres pueden llegar a multiplicarse por 10 veces. Los informes clínicos indicaron que estos pacientes tenían menos MDSC circulantes respecto a la media esperable, menor expresión de iNOS y arginasa 1 en estas células, y un mayor número de células T específicas del tumor generadas espontáneamente. Se observa una menor producción de ROS generadas por las MDSC mediante la regulación al alza del

20

25

factor de transcripción Nrf2, que regula la expresión de proteínas y enzimas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo presente en el microambiente tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc en solución acuosa, caracterizado por que comprende:
 - 5 a) entre 5% y 10% en peso de hidroxitirosol,
 - b) entre 6% y 12% en peso de arginina,
 - c) entre 3% y 5% en peso de triptófano,
 - d) entre 1,4% y 2,3% en peso de gluconato de zinc,
 - e) agua, en el porcentaje necesario hasta completar el 100% en peso,
- 10 y donde dicho complejo de inclusión cuaternario en solución acuosa no comprende ningún disolvente orgánico, surfactante o emulsionante químico en su composición.
2. Complejo de inclusión según la reivindicación 1, donde dicho complejo de inclusión comprende:
 - 15 a) 7% en peso de hidroxitirosol,
 - b) 10% en peso de arginina,
 - c) 4% en peso de triptófano,
 - d) 1,8% en peso de gluconato de zinc,
 - e) agua, hasta completar el 100% en peso,
- 20 y donde dicho complejo de inclusión cuaternario en solución acuosa no comprende ningún disolvente orgánico, surfactante o emulsionante químico en su composición.
3. Complejo de inclusión según la reivindicación 1 o 2, donde dicho complejo de inclusión se encuentra liofilizado, en estado sólido, sin contener agua en su composición.
- 25 4. Composición caracterizada por que comprende un complejo de inclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Método para obtener un complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, triptófano, arginina y gluconato de zinc en solución acuosa, caracterizado por que
30 comprende las siguientes etapas:
 - a) añadir entre 5% y 10% en peso del polifenol hidroxitirosol en agua y agitar hasta obtener una mezcla dispersada, parcialmente solubilizada en agua;
 - b) añadir, bajo agitación, entre 6% y 12% en peso de arginina a la mezcla dispersada
35 obtenida en la etapa (a);

- c) añadir, bajo agitación, entre 3% y 5% en peso de triptófano a la mezcla dispersada obtenida en la etapa (b);
- d) añadir, bajo agitación, entre 1,4% y 2,3% en peso de gluconato de zinc a la mezcla dispersada obtenida en la etapa (c);
- 5 e) calentar hasta una temperatura de entre 40°C y 60°C, manteniendo la agitación, detener la agitación una vez alcanzada dicha temperatura y aplicar ultrasonidos hasta completar la disolución total del hidroxitirosol y la formación del complejo de inclusión cuaternario;

y donde dicho método se lleva a cabo sin adicionar ningún disolvente orgánico, surfactante o emulsionante químico.

6. Método según la reivindicación 5, donde la velocidad de agitación en la etapas (a) a (d) del proceso está comprendida entre 300 y 1000 rpm y donde la aplicación de ultrasonidos en la etapa (e) del proceso se lleva a cabo con una frecuencia comprendida entre 15 y 25 kHz.

7. Método según la reivindicación 5 o 6, donde dicho método comprende una etapa final de liofilización del complejo de inclusión cuaternario en solución acuosa hasta obtener un complejo de inclusión cuaternario en estado sólido.

8. Uso de un complejo de inclusión cuaternario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como nutracéutico.

9. Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.

10. Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento de administración por vía oral.

11. Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la estimulación del sistema inmunitario.

12. Complejo de inclusión cuaternario de hidroxitirosol, arginina, triptófano y gluconato de zinc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la regulación a la baja de la concentración de células MDSC.

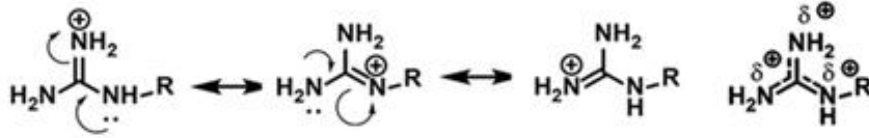


FIG. 1A

FIG. 1B

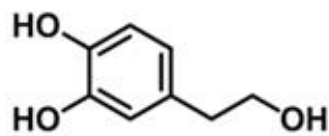


FIG. 2A

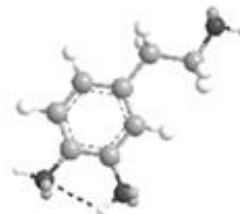


FIG. 2B

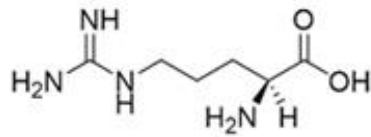


FIG. 3A

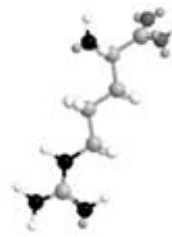


FIG. 3B

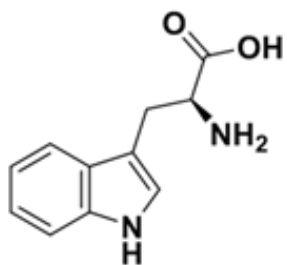


FIG. 4A

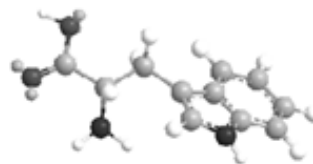


FIG. 4B