

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 223**

51 Int. Cl.:

| | | |
|---------------------|----------------------------|-----------|
| A61K 31/7028 | (2006.01) A61P 1/16 | (2006.01) |
| A61K 36/31 | (2006.01) | |
| A61K 33/06 | (2006.01) | |
| A61K 31/19 | (2006.01) | |
| A61K 31/194 | (2006.01) | |
| A61K 31/26 | (2006.01) | |
| A61K 31/357 | (2006.01) | |
| A61K 31/375 | (2006.01) | |
| A61K 31/716 | (2006.01) | |
| A61K 36/28 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2013 PCT/US2013/049261**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14008361**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2013 E 13812796 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2849736**

54 Título: **Composiciones que comprenden el precursor de sulforafano glucorafanina, una glucosidasa, ácido ascórbico y extracto o polvo de cardo mariano**

30 Prioridad:

05.07.2012 US 201261668328 P
 05.07.2012 US 201261668342 P
 05.07.2012 US 201261668364 P
 05.07.2012 US 201261668374 P
 05.07.2012 US 201261668386 P
 05.07.2012 US 201261668396 P
 15.03.2013 US 201361794417 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2019

73 Titular/es:

UTRAMAX LABORATORIES, INC. (100.0%)
 946 Quality Drive
 Lancaster, SC 29720, US

72 Inventor/es:

CORNBLATT, BRIAN;
CORNBLATT, GRACE;
BZHELYANSKY, ANTON y
HENDERSON, ROBERT W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 223 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

Composiciones que comprenden el precursor de sulforafano glucorafanina, una glucosidasa, ácido ascórbico y extracto o polvo de cardo mariano

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la combinación de un precursor del sulforafano que comprende glucorafanina, una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano que comprende una glucosidasa, preferentemente una tioglucosidasa, más preferentemente mirosinasa, un potenciador de enzima que comprende ácido ascórbico, y un extracto o polvo de cardo mariano. Únicamente con fin ilustrativo, no parte de la invención, también se describe la combinación de un sulforafano o un derivado del mismo y un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe la combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de cardo mariano. La presente invención proporciona composiciones relacionadas con estas combinaciones.

10

15

Antecedentes de la invención

El uso de productos naturales está llegando a ser cada vez más popular con seres humanos y animales de compañía. Algunos de estos productos naturales están siendo incorporados en los complementos dietéticos y alimentos de uso médico. Hay una necesidad en la técnica de complementos que sean útiles como agentes quimioprotectores y/o antioxidantes. Además, hay una necesidad en la técnica de composiciones farmacéuticas y complementos dietéticos que sean útiles para afecciones y trastornos asociados con el glutatión. La quimioprotección por el uso de productos naturales está evolucionando como una manera segura, eficaz, económica, fácilmente accesible, y práctica para prevenir o reducir la ocurrencia de muchas afecciones que afectan a seres humanos y animales domesticados. Se sabe que los carcinógenos que pueden dañar células al nivel molecular con frecuencia se ingieren e inhalan como precursores no tóxicos. A continuación, estos precursores no tóxicos se pueden convertir en sustancias carcinógenas en el cuerpo. Los agentes quimioprotectores, tales como las sustancias naturales que pueden activar enzimas de detoxificación o sus cofactores, pueden contrarrestar y permitir la eliminación de los carcinógenos. Estas mismas sustancias naturales pueden potenciar otras defensas existentes de manera natural tales como el sistema inmune.

20

25

30

Algunos productos naturales tienen actividad antioxidante. El estrés oxidativo juega un papel principal en el envejecimiento, la progresión de enfermedades neurodegenerativas, así como el trauma fisiológico, tal como isquemia. Los agentes antioxidantes pueden reducir o inhibir la oxidación de biomoléculas vitales y pueden jugar un papel en el tratamiento, prevención o reducción de la ocurrencia de afecciones afectadas por el estrés oxidativo.

35

Algunos productos naturales son útiles para mejorar la salud del hígado. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es la enfermedad del hígado más común en los EEUU, afectando a aproximadamente el 30 % de la población. NAFLD también es conocida como lipidosis hepática. En el 10 % de aquellos con NAFLD, la enfermedad progresará a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), de los cuales el 25 % desarrollarán cirrosis. Potencialmente el 10 a 25 % de aquellos pacientes con cirrosis desarrollarán carcinoma hepatocelular. Al ritmo actual y sin modos de tratamiento eficaces, en 2030 el carcinoma hepatocelular se proyecta que sea el cáncer diagnosticado número uno en los Estados Unidos. NAFLD se da cuando la grasa se deposita en el hígado (esteatosis), pero no como resultado del uso de alcohol en exceso. NAFLD está asociada con la inflamación crónica, resistencia a insulina, diabetes y obesidad. NAFLD presenta pocos o ningún síntoma y es la más comúnmente detectada después de resultados anormales obtenidos durante análisis de sangre rutinarios (es decir, niveles de ALT y AST en suero elevados) y confirmada por un ultrasonido o una biopsia. Actualmente no hay tratamientos quirúrgicos o farmacológicos para NAFLD. Las recomendaciones para controlar NAFLD incluyen modificaciones del estilo de vida tales como comer una dieta sana, ejercicio, pérdida de peso, descenso del colesterol y control de la diabetes.

40

45

50

NAFLD con frecuencia está asociada a un descenso en los niveles de glutatión. El glutatión es un tripéptido con un enlace peptídico gamma entre el grupo amina de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato. El glutatión juega un importante papel en el cuerpo, ya que puede servir como antioxidante, detoxificante, y potenciador de la inmunidad. El glutatión puede conjugarse a metabolitos y toxinas, tales como procarcinógenos, para la excreción del cuerpo. Los niveles de glutatión se pueden reducir en pacientes por un número de razones, incluyendo dieta pobre, contaminación, exposición a toxinas y/o ciertos medicamentos, estrés, trauma, envejecimiento, infecciones y radiación. Niveles bajos de glutatión pueden causar que un paciente sea susceptible al estrés oxidativo, enfermedad, y cáncer. Por ejemplo, niveles reducidos de glutatión están asociados con afecciones relacionadas con el hígado, próstata, cerebro, pulmón, riñones, colon, pecho, esófago, páncreas, ovarios, etc. Ejemplos de trastornos asociados con niveles reducidos de glutatión y deficiencia de glutatión incluyen, pero no se limitan a: NAFLD, cáncer (pulmón, próstata, colon, pecho, cerebro, hígado, ovario, esófago, pancreático, nasofaríngeo, osteosarcoma), leucemia, fibrosis cística, VIH, deficiencia de glutatión sintetasa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, esclerosis múltiple, fibromialgia, fatiga crónica, autismo y diabetes.

55

60

65

Un ejemplo de un producto natural que se cree que tiene propiedades quimioprotectoras y antioxidantes es sulforafano. El sulforafano es un compuesto de organoazufre que también se conoce como 1-isotiocianato-4-metilsulfonilbutano. El precursor de sulforafano, glucorafanina, se puede obtener de vegetales de la familia *Brassicaceae*, tal como brócoli, coles de Bruselas, y repollo. Sin embargo, se deben consumir cantidades copiosas de los vegetales para obtener los niveles adecuados para la quimioprevención. La glucorafanina se convierte en sulforafano por una enzima tioglucosidasa denominada mirosinasa, la cual se da en una diversidad de fuentes exógenas tales como vegetales de *Brassicaceae* y endógenamente en la microflora intestinal. Sin embargo, tras la ingestión de glucorafanina, no todos los animales son capaces de conseguir su conversión a sulforafano, lo más probable debido a variaciones en las poblaciones de la microflora y la salud general. Además, en ambientes ácidos tales como el estómago, la glucorafanina se puede convertir a metabolitos inertes. El metabolito activo, el sulforafano es capaz de inducir el factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) el cual, una por una, regula al alza la producción de las enzimas de detoxificación Fase II y las enzimas citoprotectoras tales como glutatión S-transferasas, NAD(P)H:quinina oxidoreductasa (NQO1), y hemo-oxigenasa-1 (HO-1). Se ha creído que el sulforafano induce la producción de estas enzimas sin cambiar significativamente la síntesis de las enzimas citocromo P-450. Se cree que la regulación al alza de las enzimas Fase II juega un papel en la diversidad de las actividades biológicas, incluyendo la protección del cerebro de la citotoxicidad, la protección del hígado de los efectos tóxicos de la acumulación grasa, y la detoxificación de una diversidad de otros tejidos.

El sulforafano y su precursor glucorafanina han sido ampliamente estudiado. Shapiro y col. (*Nutrition and Cancer*, (2006), Vol. 55(1), pp. 53-62) analiza un estudio Fase I clínico que determina la seguridad, tolerabilidad y metabolismo de glucosinolatos de brotes de brócoli e isotiocianatos. Shapiro y col. analizan un estudio clínico aleatorio, con ocultación doble, controlado por placebo de extractos de brotes que contienen o bien glucosinolatos tales como glucorafanina o isotiocianatos tales como sulforafano en sujetos humanos sanos. El estudio encontró que la administración de estas sustancias no daba como resultado efectos adversos sistémicos, clínicamente significantes.

El cardo mariano (*Silybum marianum*) es una planta de la familia *Asteraceae*. El cardo mariano contiene silimarina, la cual está compuesta de un número de componentes, que incluyen, pero no se limitan a flavonolignanos tales como silibinina (también conocida como silibina), isosilibinina, silicristina, silidianina, quercetina, dehidrosilibina, deoxisilicristina, deoxisilidianina, silandrina, silibinoma, siliherrina y neosiliherrina. Los componentes de silimarina pueden tener un número de efectos biológicos, incluyendo la inhibición de la formación de radical libre, la unión de especies de radical libre, la prevención de la peroxidación lipídica de membrana, el incremento en los niveles de glutatión, y quelación de hierro. La silibinina es el principal componente activo de la silimarina, y se cree que tiene propiedades hepatoprotectoras. La silimarina es analizada en la Patente Americana N.º 7.563.779.

Zhang y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1994), Vol. 91, pp. 3.147-3.150) analiza un estudio en ratas Sprague-Dawley para determinar las actividades anticarcinógenas del sulforafano y norbonil isotiocianatos sintéticos estructuralmente relacionados. El estudio determinó que la administración de sulforafano era eficaz en bloquear la formación de tumores mamarios.

Cornblatt y col. (*Carcinogenesis*, (2007), Vol. 38(7): pp. 1.485-1.490) analiza un estudio en ratas Sprague-Dawley para determinar el efecto de sulforafano en la quimioprevención en el pecho. El estudio determinó que la administración oral de o bien sulforafano o glucorafanina daba como resultado un incremento 3 veces en la actividad enzimática de NAD(P)H:quinina oxidoreductasa (NQO1) y una inmunotinción elevada 4 veces de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) en el epitelio mamario.

Munday y col. (*Cancer Res*, (2008), Vol. 68(5): pp. 1.593-1.600) analiza un estudio en relación con los efectos de un extracto acuoso liofilizado de brotes de brócoli sobre el desarrollo del cáncer de vejiga en ratas. El estudio encontró que la administración del extracto de brote de brócoli daba como resultado una inducción significativa de la glutatión S-transferasa y NAD(P)H:quinina oxidoreductasa 1 en la vejiga, las cuales son enzimas que ejercen actividad protectora frente a oxidantes y carcinógenos.

Aghazadeh S. y col. (*Exp. Toxicol Pathol.* (2011) Sep; 63(6):569-74) analiza los efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios de *Silybum marianum* en el tratamiento de esteatohepatitis experimental. El estudio encontró que la administración de un extracto de *Silybum marianum* a ratas alimentadas con una dieta deficiente en metionina y colina (DMC) para inducir esteatohepatitis no alcohólica había mejorado la actividad de AST y ALT junto con un incremento en el contenido de glutatión en comparación con las ratas control que estaban siendo alimentadas con solo la dieta DMC.

La Solicitud de Patente Europea N.º 2.213.280 describe formulaciones que comprenden glucosinolatos tales como glucorafanina y mirosinasa, en la que la formulación está encapsulada o revestida.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende: (i) un precursor de sulforafano el cual es glucorafanina; (ii) una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano la cual es una enzima de

glucosidasa, preferentemente una enzima tioglucosidasa, y más preferentemente mirosinasa; (iii) un potenciador de enzima el cual es ácido ascórbico; y (iv) un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe dicha composición para su uso en el tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de las recurrencias secundarias de, una enfermedad o afección asociada con el hígado, próstata, cerebro, pulmón, riñones, colon, pecho, esófago, páncreas, u ovarios en un sujeto, incremento de los niveles de glutatión en un sujeto en necesidad de lo mismo, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de una enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y/o cualquier otro trastorno del hígado, comprendiendo administrar al sujeto: (i) glucorafanina, (ii) una glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, (iii) ácido ascórbico, y (iv) un extracto o polvo de cardo mariano.

Se describe una composición que comprende: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) extracto o polvo de cardo mariano. Se describe dicha composición para su uso en el tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de, una enfermedad o afección asociada con el hígado, próstata, cerebro, pulmón, riñones, colon, pecho, esófago, páncreas, u ovarios en un sujeto, comprendiendo la administración al sujeto: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe dicha composición para su uso en el incremento de los niveles de glutatión en un sujeto en necesidad de lo mismo en un sujeto, comprendiendo la administración al sujeto, comprendiendo la administración al sujeto: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe dicha composición para su uso en el tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de una enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y/o cualquier otro trastorno del hígado, comprendiendo la administración al sujeto: (i) un extracto o polvo de brócoli, y (ii) un extracto o polvo de cardo mariano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra la conversión de glucorafanina a 38 °C sin ácido ascórbico, como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la conversión en aproximadamente 10 minutos a 38 °C en función de la concentración de ácido ascórbico, como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la conversión a sulforafano en 30 minutos a 38 °C y ácido ascórbico 1 mM, como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la conversión de glucorafanina a sulforafano en fluido intestinal simulado, como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 6.

La Figura 6 es una gráfica que muestra los resultados del experimento en el Ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la combinación de un precursor de sulforafano el cual es glucorafanina, una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano la cual es una glucosidasa, más preferentemente una tioglucosidasa, más preferentemente mirosinasa, un potenciador de enzima el cual es ácido ascórbico, y un extracto o polvo de cardo mariano. La presente invención proporciona una composición relacionada con esta combinación. Se describe una combinación de sulforafano o un derivado del mismo y un extracto o polvo de cardo mariano pero no es parte de la invención. Se describe una combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe el uso de extracto o polvo de cardo mariano, con una mezcla de uno o más de lo siguiente: precursor de sulforafano, sulforafano o un derivado del mismo, y extracto de brócoli. Se describen composiciones relacionadas con estas combinaciones.

En algunas realizaciones, la combinación se puede administrar para tratar, prevenir, reducir la ocurrencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir las recurrencias secundarias de, una enfermedad o afección asociada con el hígado, próstata, cerebro, pulmón, riñones, colon, pecho, esófago, páncreas, u ovarios en un sujeto, comprendiendo la administración al sujeto. En algunas realizaciones, la combinación se puede administrar para incrementar los niveles de glutatión en un sujeto en necesidad de lo mismo. En algunas realizaciones, la combinación se puede administrar para tratar, prevenir, reducir la ocurrencia de, disminuir los síntomas asociados con, y/o reducir recurrencias secundarias de una enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y/o cualquier otro trastorno del hígado en un sujeto.

El sulforafano también se conoce como 1-isotiocianato-4-metilsulfonilbutano. Los derivados del sulforafano incluyen, pero no se limitan a análogos sulfoxitiocarbamato de sulforafano, 6-metilsulfonilhexil isotiocianato (6-HITC), y compuestos que comprenden la estructura de sulforafano con diferentes cadenas laterales y/o diversas longitudes de espaciadores entre los grupos isotiocianato y sulfóxido. Ejemplos de derivados de sulforafano incluyen aquellos descritos en las siguientes referencias: Hu y col., *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, 64:529-539; Ahn y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(21):9.590-9.595; y Morimistu y col., *J. Biol. Chem.* 2002, 277:3.456-3.463, y Baird y col., *Arch. Toxicol.*, 2011, 85(4):241-272.

El término "precursor de sulforafano" se refiere a cualquier compuesto, sustancia o material que se puede usar para producir sulforafano. En la presente invención, el precursor de sulforafano comprende glucorafanina que se puede convertir o metabolizar a sulforafano, preferentemente por una enzima. Glucorafanina es un glucosinolato que también se conoce como 4-metilsufinilbutil glucosinolato y 1-S-[(1E)-5-(metilsufinil)-N-(sulfonatooxi)pentanimidoil]-1-tio-β-D-glucopiranosas.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención comprende aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 g, preferentemente 250 pg a aproximadamente 5 g, más preferentemente aproximadamente 500 μg a aproximadamente 2.000 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 750 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 250 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 2 mg a aproximadamente 100 mg, y lo más preferentemente aproximadamente 3 mg a aproximadamente 75 mg de glucorafanina. En algunas realizaciones, las composiciones adecuadas para su uso humano comprenden aproximadamente 3,5 mg a aproximadamente 50 mg de glucorafanina.

Se describe una composición para su uso en la administración de glucorafanina a un sujeto, en una cantidad de 1 pg a aproximadamente 10 g, preferentemente 250 pg a aproximadamente 5 g, más preferentemente aproximadamente 500 μg a aproximadamente 2.000 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 750 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 250 mg, incluso más preferentemente aproximadamente 2 mg a aproximadamente 100 mg, y lo más preferentemente aproximadamente 3 mg a aproximadamente 75 mg. Se describe la composición adecuada para su uso humano comprendiendo la administración de aproximadamente 3,5 mg a aproximadamente 50 mg. Se describe una composición para su uso en la administración de una cantidad de glucorafanina a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 1 μg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, preferentemente aproximadamente 5 μg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 7,5 μg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, incluso más preferentemente aproximadamente 10 μg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, y lo más preferentemente aproximadamente 25 μg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Se describe la composición adecuada para su uso humano comprendiendo la administración de aproximadamente 50 μg/kg a aproximadamente 800 μg/kg. Las cantidades anteriores pueden referirse a cada administración de la dosis o una dosis diaria total.

Se describe una composición para su uso en la administración de más de un precursor de sulforafano. En algunas realizaciones, la composición comprende más de un precursor de sulforafano. En algunas realizaciones en las que la composición comprende más de un precursor de sulforafano, las cantidades anteriores se pueden referir a la cantidad de cada precursor de sulforafano, o la cantidad total de los precursores de sulforafano.

El precursor de sulforafano el cual es glucorafanina se puede convertir o metabolizar a sulforafano, preferentemente por una enzima. En la presente invención, la enzima capaz de convertir glucorafanina a sulforafano comprende una enzima de glucosidasa, preferentemente una enzima tioglucosidasa, y más preferentemente mirosinasa. La mirosinasa también se conoce como tioglucósido glucohidrolasa.

En algunas realizaciones, la composición comprende una glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, en una cantidad de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1 μg, preferentemente aproximadamente 50 pg a aproximadamente 500 pg y lo más preferentemente aproximadamente 1 ng a aproximadamente 150 ng. En algunas realizaciones, las composiciones adecuadas para su uso humano comprenden aproximadamente 5 ng a aproximadamente 75 ng de la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa.

Se describe una composición para su uso en la administración de una glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, en una cantidad de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1 μg, preferentemente aproximadamente 50 pg a aproximadamente 500 ng, y lo más preferentemente aproximadamente 1 ng a aproximadamente 150 ng. En algunas realizaciones en las que el sujeto es un ser humano, el uso comprende la administración de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 75 ng de la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa. En algunas realizaciones, el uso comprende administrar la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 0,02 pg/kg a aproximadamente 0,02 μg/kg, preferentemente aproximadamente 0,7 pg/kg a aproximadamente 7 ng/kg, y lo más preferentemente aproximadamente 0,02 ng/kg a aproximadamente 2 ng/kg. En algunas realizaciones preferidas en las que el sujeto es un ser humano, el uso comprende la administración de aproximadamente 0,1 ng/kg a aproximadamente 1 ng/kg. Las cantidades anteriores se pueden referir a cada administración de dosis o una dosis diaria total.

Se describe un uso que comprende la administración de más de una glucosidasa o tioglucosidasa capaz de convertir glucorafanina a sulforafano. También se describe, una composición que comprende más de una glucosidasa o tioglucosidasa capaz de convertir glucorafanina a sulforafano. En algunas realizaciones en las que las composiciones comprenden más de una glucosidasa o tioglucosidasa, las cantidades anteriores se pueden referir a la cantidad de cada enzima, o la cantidad total de las enzimas.

La presente invención también proporciona el uso de un extracto y/o polvo de brócoli, que incluye, pero no se limita a, extractos y polvos de semilla y brotes de brócoli. Se describe la administración de extracto y/o polvo de brócoli, y

la presente invención proporciona composiciones que comprenden extracto y/o polvo de brócoli. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de brócoli se estandariza para contener 1 % a aproximadamente 75 % en p/p, más preferentemente aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 50 %, incluso más preferentemente aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, y lo más preferentemente aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % de glucorafanina. Ejemplos de extractos y polvos de brócoli incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en las Patentes Americanas N.º 5.411.986; 5.725.895; 5.968.505; 5.968.567; 6.177.122; 6.242.018; 6.521.818; 7.303.770, y 8.124.135. Los polvos de brócoli se pueden obtener, por ejemplo, por secado al aire, liofilizado, secado por tambor, secado por pulverización, secado por calor y/o secado por vacío parcial de brócoli, preferentemente brotes de brócoli. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden el uso de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 g, más preferentemente aproximadamente 250 pg a aproximadamente 5 g, incluso más preferentemente aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1 g, preferentemente aproximadamente 600 pg a aproximadamente 500 mg, más preferentemente aproximadamente 750 pg a aproximadamente 400 mg, y lo más preferentemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 300 mg del extracto de brócoli. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de brócoli está presente en una composición en cantidades suficientes para proporcionar glucorafanina en las cantidades anteriormente descritas. En la presente invención, la composición comprende además un potenciador de enzima el cual es ácido ascórbico.

El precursor de sulforafano que comprende glucorafanina y/o la enzima capaz de convertir el precursor sulforafano a sulforafano que comprende glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, se pueden obtener de cualquier fuente, que incluye, pero no se limita a una o más plantas de la familia *Brassicaceae* (también conocidas como *Cruciferae*). Ejemplos de plantas de la familia *Brassicaceae* incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: brócoli, coles de Bruselas, coliflor, repollo, rábano picante, chirivía, rábano, wasabi, berro y mostaza blanca. En algunas realizaciones preferidas, la glucorafanina, y la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, se obtienen del brócoli, brotes de brócoli, o semillas de brócoli. La glucorafanina y la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, se pueden obtener de la misma fuente o de diferentes fuentes. En algunas realizaciones, tanto la glucorafanina y la enzima se pueden obtener de un extracto o polvo de estas plantas, preferentemente un extracto o polvo de semilla o brote de brócoli.

La presente invención proporciona el uso de un potenciador de enzima. Los potenciadores de enzima se pueden usar para aumentar la actividad de la enzima que es capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano. En la presente invención, el potenciador de enzima comprende un cofactor enzimático, el cual es ácido ascórbico. El ácido ascórbico, también conocido como ascorbato o vitamina C, puede potenciar la actividad de la mirosinasa. Se describe que, sin ácido ascórbico, la reacción de conversión a sulforafano puede ser muy lenta para darse en la localización necesaria para la absorción pico. El ácido ascórbico se puede obtener a partir de una fuente natural, o se puede producir sintéticamente.

En la presente invención, las composiciones pueden comprender aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, preferentemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 250 mg, y lo más preferentemente aproximadamente 1 mg a aproximadamente 125 mg de ácido ascórbico. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones adecuadas para su uso humano comprenden aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg de ácido ascórbico.

En algunas realizaciones, la composición para su uso comprende la administración de ácido ascórbico, en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, y lo más aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. En algunas realizaciones preferidas en las que el sujeto es un ser humano, el uso comprende la administración de aproximadamente 0,02 mg/kg a 0,7 mg/kg de ácido ascórbico. Las cantidades anteriores se pueden referir a cada administración de dosis o una dosis diaria total.

También se describe una composición que comprende más de un potenciador de enzima. En algunas realizaciones en las que la composición comprende más de un potenciador de enzima, las cantidades anteriores se pueden referir a la cantidad de cada potenciador de enzima, o la cantidad total de los potenciadores de enzima.

La presente invención comprende además el uso de un extracto o polvo de cardo mariano. El cardo mariano pertenece a la especie *Silybum marianum*. El cardo mariano comprende un número de componentes o fracciones que tienen actividad biológica. Una fracción activa de cardo mariano es silimarina, la cual comprende un número de componentes. Ejemplos de componentes de silimarina incluyen, pero no se limitan a: silibina (también conocida como silibina), isosilibina, silicristina, silidianina y quercetina, deshidrolisina, deoxisilicristina, deoxisilidianina, silandrina, silibinoma, silihermína y neosilihermína. Los isómeros de silibina incluyen Silibina A y Silibina B. En realizaciones preferidas, el extracto o polvo de cardo mariano comprende silimarina.

Se describen composiciones que comprenden el uso de uno o más derivados de silimarina, además de un extracto o polvo de cardo mariano. Los derivados de los componentes de silimarina incluyen alguna forma modificada de los anteriores compuestos, que incluye, pero no se limita a, 7-O- y 23-O-acil derivados, y análogos. Ejemplos de derivados de los componentes de silimarina, incluyen, pero no se limitan a 2,3-dehidrosilibina (DHS); 7-O-metilsilibina; 7-O-galoilsilibina; 7,23-disulfatosilibina (DSS); 7-O-palmitoilsilibina; y 23-O-palmitoilsilibina. Ejemplos de derivados incluyen aquellos descritos en las siguientes referencias: Agarwal y col. *PLOS ONE*, 2013, 8(3):e60074;

documentos GB 2167414; y CA1337124. En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender el uso de silimarina o silibinina en una forma purificada o silimarina o silibinina producida sintéticamente, además de un extracto o polvo de cardo mariano.

5 En la presente invención, se usa un extracto o polvo de cardo mariano. En realizaciones preferidas, el extracto de cardo mariano comprende silimarina. En realizaciones preferidas, el extracto de cardo mariano comprende silibinina. En algunas realizaciones, el extracto o polvo de cardo mariano se estandariza para contener aproximadamente 25 % a aproximadamente 95 %, preferentemente aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, y más preferentemente aproximadamente 55 % a aproximadamente 85 % de silimarina. En algunas realizaciones, el
10 extracto o polvo de cardo mariano se estandariza para contener aproximadamente 5 % a aproximadamente 75 %, preferentemente aproximadamente 10 % a aproximadamente 60 %, más preferentemente aproximadamente 15 % a aproximadamente 50 %, y lo más preferentemente aproximadamente 20 % a aproximadamente 35 % de silibinina. Ejemplos de extracto de cardo mariano incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la Patente Americana N.º 6.555.141; Patente Americana N.º 6.863.906; Patente Americana N.º 7.563.779; los documentos WO200908006;
15 EP2020238; WO2009043671; EP1584240; y WO2011076154. Polvos de cardo mariano se pueden obtener, por ejemplo, por secado al aire, liofilizado, secado por tambor, secado por pulverización, secado por calor y/o secado por vacío parcial de cardo mariano.

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden el uso de aproximadamente 1,25 mg a aproximadamente
20 15 gramos, preferentemente aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 gramos, y lo más preferentemente aproximadamente 10 mg a aproximadamente 7,5 gramos de extracto de cardo mariano. En algunas realizaciones preferidas en las que la composición es adecuada para su uso humano, la composición comprende aproximadamente 25 mg a aproximadamente 5 gramos del extracto de cardo mariano. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 0,75 mg a aproximadamente 15 gramos, preferentemente
25 aproximadamente 3 mg a aproximadamente 7 gramos, más preferentemente aproximadamente 7 mg a aproximadamente 5 gramos, y lo más preferentemente aproximadamente 15 mg a aproximadamente 3,5 gramos de silimarina. En algunas realizaciones preferidas en las que la composición es adecuada para su uso humano, la composición comprende aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 mg de silimarina. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 5 gramos, preferentemente
30 aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 3 gramos, más preferentemente aproximadamente 3 mg a aproximadamente 2 gramos, y lo más preferentemente aproximadamente 7 mg a aproximadamente 1,5 gramos de silibinina. En algunas realizaciones preferidas en las que la composición es adecuada para su uso humano, la composición comprende aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg de silibinina.

Se describe la administración de silimarina en una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 75
35 mg/kg, preferentemente aproximadamente 2,5 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, y lo más preferentemente aproximadamente 15 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones preferidas en las que el sujeto es un ser humano, la administración comprende aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de silimarina. En algunas realizaciones, se describe la administración de silibinina en una cantidad de aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, más preferentemente aproximadamente
40 2,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, y lo más preferentemente aproximadamente 7,5 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. También se describe la administración de aproximadamente 300 µg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de silibinina. En realizaciones en las que se usa un derivado de un componente de silimarina, se describen las composiciones que comprenden el derivado en una cantidad de aproximadamente 0,75 mg a aproximadamente 15 gramos, preferentemente aproximadamente 3 mg a aproximadamente 7 gramos, más preferentemente aproximadamente 7 mg a aproximadamente 5 gramos, y lo más preferentemente aproximadamente 15 mg a aproximadamente 3,5 gramos. Se describe una composición adecuada para su uso humano que comprende aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 mg del derivado de un componente de silimarina. Las cantidades anteriores se pueden referir a cada administración de dosis o una dosis diaria total.

En algunas realizaciones, se puede usar S-adenosilmetionina además del extracto de cardo mariano.

55 Se describe la administración adicional de uno o más componentes adicionales. Las composiciones de la presente invención además pueden comprender uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales pueden incluir principios activos, complementos nutricionales, y extractos nutricionales. Ejemplos de componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, quercetina o un derivado de la misma, un aminoazúcar tal como glucosamina, un glicosaminoglicano tal como condroitina, insaponificables de aguacate/soja, vitaminas tales como la vitamina K2, fruto del café, magnesio, ácido ursólico, proantocianidinas, alfa y beta-glucanos, curcumina, fitosteroles, fitostanoles y S-adenosilmetionina (SAmE). Estos componentes adicionales pueden estar presentes en extracto de arándano (*Vaccinium macrocarpon*) (proantocianidinas, quercetina, y ácido ursólico), cúrcuma (*Curcuma longa*), extracto de seta medicinal tal como extractos de seta shiitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*), y extracto de seta reishi (*Ganoderma lucidum*).

Se describe una relación de silimarina y sulforafano o un derivado del mismo para ser de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 75:1, más preferentemente aproximadamente 2:1 a aproximadamente 50:1, más preferentemente aproximadamente 2,5:1 a aproximadamente 25:1, incluso más preferentemente aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, y lo más preferentemente aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1. En algunas realizaciones, se describe una relación de silibinina y sulforafano o un derivado del mismo para ser de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 35:1, más preferentemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, más preferentemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 15:1, incluso más preferentemente aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1, y lo más preferentemente aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, se describe la relación de silimarina y glucorafanina para ser de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 50:1, preferentemente aproximadamente 1:2 a aproximadamente 25:1, más preferentemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, más preferentemente aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 5:1, y lo más preferentemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1. En algunas realizaciones, se describe la relación de silibinina y glucorafanina para ser de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 50:1, preferentemente aproximadamente 1:2 a aproximadamente 25:1, preferentemente 1:1 a aproximadamente 20:1, y lo más preferentemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 13:1.

En algunas realizaciones, la composición comprende una forma farmacéutica unitaria, que incluye, pero no se limita a formas farmacéuticas adecuadas para oral, rectal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica, transmucosal y tópica. En algunas realizaciones preferidas, la composición comprende una forma farmacéutica oralmente administrable o una forma farmacéutica rectalmente administrable. Ejemplos de formas farmacéuticas oralmente administrables incluyen, pero no se limitan a un comprimido, cápsula, polvo que se pueden dispersar en una bebida, un líquido tal como una solución, suspensión, o emulsión, una cápsula de gel blando/masticable, una barra masticable, u otra forma farmacéutica conveniente conocida en la técnica. En realizaciones preferidas, la composición comprende un comprimido, cápsula, o tratamiento masticable blando. Las formas farmacéuticas oralmente administrables se pueden formular para liberación inmediata, liberación prolongada o liberación retardada.

En algunas realizaciones de la presente invención, al menos la glucorafanina, la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, y el ácido ascórbico se proporcionan en una forma farmacéutica que permite la liberación en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferentemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferentemente el duodeno. En algunas realizaciones, se describe al menos el extracto o polvo de brócoli para ser proporcionado en una forma farmacéutica que permite la liberación en un área de tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferentemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferentemente el duodeno. En algunas realizaciones de la presente invención, el extracto o polvo de cardo mariano y/o algún componente adicional opcional también se liberan en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH de al menos 4 y preferentemente al menos 5, tal como el intestino delgado, preferentemente el duodeno. El intestino delgado incluye el duodeno, yeyuno e íleo.

En algunas realizaciones de la presente invención, cada uno de estos componentes (es decir, glucorafanina, glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, ácido ascórbico, extracto o polvo de brócoli, extracto o polvo de cardo mariano, y/o componentes adicionales) se liberan simultáneamente o concomitantemente (es decir, en un corto periodo de tiempo uno de otro). Esto proporciona beneficios sobre las composiciones que contienen glucorafanina formuladas para liberar la glucorafanina en un área del tracto gastrointestinal que tiene un pH por debajo de 4, tal como el estómago. En ambientes con pH bajo tal como este, el ambiente ácido puede desviar la conversión de glucorafanina a otros, productos finales fisiológicamente inactivos, tales como sulforafano nitrilo y epitionitrilo.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender composiciones oralmente administrables que comprenden formulaciones gastroprotectoras, incluyendo formas farmacéuticas revestidas entéricas o cualquier forma farmacéutica que sea resistente a la degradación en un área del tracto gastrointestinal que tiene pH por debajo de 4, tal como el estómago. Por ejemplo, la composición oralmente administrable puede comprender un comprimido o cápsula que comprende un revestimiento entérico. El revestimiento entérico puede comprender materiales que incluyen, pero no se limitan a acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, polivinil acetato ftalato, copolímero de ácido metacrílico, copolímero ácido metacrílico:éster acrílico, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, trimelitato de hidroxipropilmetilcelulosa, shellac, acetato trimelitato de celulosa, carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos. El revestimiento entérico puede comprender algún polímero entérico adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, uno o más de los componentes en la composición se puede incrustar en una matriz de polímeros entéricos. En algunas realizaciones, las composiciones oralmente administrables comprenden una cápsula que se disuelve lentamente en ácido gástrico y viaja al intestino delgado, tal como cápsulas resistentes a ácido DRCAPS™, las cuales están comercializadas por CAPSUGEL® o alguna otra cápsula resistente a ácido.

En la forma más preferida, la composición oralmente administrable está rodeada por un revestimiento que no se disuelve a menos que el medio circundante esté a un pH de al menos 4, y más preferentemente al menos 5. Alternativamente, se puede emplear un revestimiento que controla la liberación por tiempo, en lugar de pH, con el ritmo ajustado de manera que los componentes no se liberen hasta después de que el pH del tracto gastrointestinal haya subido a al menos 4, y más preferentemente al menos 5. Por tanto, una formulación de liberación por el tiempo

se puede usar para prevenir la presencia gástrica de glucorafanina, glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, y ácido ascórbico. La(s) capa(s) de revestimiento se puede(n) aplicar sobre la composición oralmente administrable usando técnicas de revestimiento estándar. Los materiales de revestimiento entéricos se pueden disolver o dispersar en disolventes orgánicos o acuosos. El pH al cual se disolverá el revestimiento entérico se puede controlar por un polímero, o combinación de polímeros, seleccionados y/o relación de grupos colgantes. Por ejemplo, las características de disolución de la película de polímero se pueden alterar por la relación de grupos carboxilo libres y grupos éster. Las capas de revestimiento entérico también contienen plastificantes farmacéuticamente aceptables tales como citrato de trietilo, ftalato de dibutilo, triacetina, polietilenglicoles, polisorbatos u otros plastificantes. También se pueden incluir aditivos tales como dispersantes, colorantes, agentes antiadherentes y antiespumantes.

Las composiciones pueden contener uno o más ingredientes farmacéuticos no activos (también conocidos generalmente como "excipientes"). Los ingredientes no activos, por ejemplo, sirven para solubilizar, suspender, espesar, diluir, emulsionar, estabilizar, conservar, proteger, colorear, dar sabor y moldear los principios activos en una preparación aplicable y eficiente que es segura, conveniente, y de otro modo aceptable para su uso. Los excipientes preferentemente son excipientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de clases de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen lubricantes, agentes de tamponamiento, estabilizadores, agentes de soplado, pigmentos, agentes colorantes, agentes aromatizantes, cargas, agentes formador de volumen, fragancias, modificadores de la liberación, adyuvantes, plastificantes, aceleradores del flujo, agentes de liberación del molde, polioles, agentes de granulación, diluyentes, aglutinantes, tampones, absorbentes, deslizantes, adhesivos, antiadherentes, acidulantes, suavizantes, resinas, demulcentes, disolventes, tensioactivos, emulsionantes, elastómeros y mezclas de los mismos.

En la presente invención, la combinación de (i) un precursor de sulforafano el cual es glucorafanina, (ii) una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano la cual es una enzima glucosidasa, preferentemente una enzima tioglucosidasa, y más preferentemente mirosinasa, (iii) un potenciador de enzima, preferentemente un cofactor enzimático, el cual es ácido ascórbico, y (iv) extracto o polvo de cardo mariano demuestra un efecto sinérgico. Se describe una combinación de sulforafano (o un derivado del mismo) y un extracto o polvo de cardo mariano que demuestra un efecto sinérgico, (no parte de la invención). La sinergia se refiere al efecto en el que una combinación de dos o más componentes proporciona un resultado el cual es mayor que la suma de los efectos producidos por los agentes cuando se usan solos. En realizaciones preferidas, el efecto sinérgico es mayor que el efecto de un aditivo. En algunas realizaciones, la combinación de glucorafanina, glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, ácido ascórbico, y un extracto o polvo de cardo mariano tiene un efecto mayor, estadísticamente significativo, en comparación con: (i) cada componente solo, (ii) la combinación de glucorafanina y glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, solo; y/o (iii) solo la combinación de glucorafanina, glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, y ácido ascórbico.

En realizaciones preferidas, la combinación de glucorafanina, glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto o polvo de cardo mariano demuestra sinergia al tener un efecto estadísticamente significativo y/o mayor que el del aditivo en comparación con solo glucorafanina y solo el extracto o polvo de cardo mariano. Se describe una combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y silimarina que tiene un efecto sinérgico en comparación con la combinación de solo glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico; y en comparación con solo silimarina. También se describe una combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, y silibinina que tiene un efecto sinérgico en comparación con la combinación de solo glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico; y en comparación con solo silibinina.

Con fines ilustrativos, no parte de la invención: se describe una combinación de un sulforafano (o un derivado del mismo) y un extracto o polvo de cardo mariano que tiene un efecto estadísticamente significativo y/o mayor que el del aditivo que: (i) solo sulforafano (o un derivado del mismo), y/o (ii) solo un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe una combinación de sulforafano y silimarina que tiene un efecto sinérgico en comparación con solo sulforafano, y solo silimarina. También se describe una combinación de sulforafano y silibinina que tiene un efecto sinérgico en comparación con solo sulforafano, y solo silibinina.

Se describe una combinación de extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de cardo mariano que tiene un efecto estadísticamente significativo y/o mayor que el del aditivo que: (i) solo extracto o polvo de brócoli, y/o (ii) solo un cardo mariano. También se describe una combinación de extracto o polvo de brócoli y silimarina que tiene un efecto sinérgico en comparación con solo el extracto de brócoli o polvo, y solo silimarina. También se describe una combinación de extracto o polvo de brócoli y silibinina que tiene un efecto sinérgico en comparación con solo el extracto o polvo de brócoli, y solo silibinina.

Se describe la administración a un sujeto en necesidad de la misma. Se describe la administración de la combinación de glucorafanina, una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano el cual es glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, ácido ascórbico, y un extracto o polvo de cardo mariano. También se describe la administración de la combinación de un extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de cardo mariano.

El tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o la reducción de recurrencias secundarias de, una enfermedad o afección asociada con el hígado, sistema genitourinario (incluyendo próstata, pecho y ovarios), cerebro, pulmón, riñones, colon, esófago, páncreas, o sistema hematopoyético en un sujeto, reducción del daño o frenado del daño a los tejidos y órganos, tales como el hígado, sistema genitourinario (incluyendo próstata, pecho y ovarios), cerebro, pulmón, riñones, colon, esófago y páncreas. También se describe el incremento de los niveles de glutatión en un sujeto en necesidad de lo mismo en un sujeto, y puede ser útil en el tratamiento, prevención, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de enfermedades o afecciones asociadas con bajos niveles de glutatión. Ejemplos de tales enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), cáncer (tal como cáncer del hígado, pulmón, próstata, colon, pecho, cerebro, ovarios, esófago, páncreas, nasofaringe, osteosarcoma), leucemia, fibrosis quística, VIH, deficiencia de la glutatión sintetasa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, esclerosis múltiple, fibromialgia, fatiga crónica, autismo, diabetes, hepatotoxicidad, y toxicidad debido a los factores ambientales.

Se describe tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con, y/o reducción de recurrencias secundarias de una enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y/o cualquier otro trastorno del hígado en un sujeto, y en algunas realizaciones, se refiere a mejora o reducción de los efectos perjudiciales de NAFLD.

Se describen el proporcionado de un efecto beneficioso sobre los biomarcadores, y el tratamiento, prevención, reducción de la ocurrencia de, disminución de los síntomas asociados con los niveles anormales de estos biomarcadores. Ejemplos de tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a enzimas NADPH dependientes, tioredoxina (TXN), tioredoxina reductasa-1 (Txnrd-1), subunidad de glutamato-cisteína ligasa (GCLC), sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1), hemo oxigenasa-1 (HMOX1), glutatión peroxidasa-3 (GPx-3), glutatión S-transferasa theta 2 (GSTT2), glutatión S-transferasa microsomal 1 (MGST1), aldehído oxidasa (AOX1), aldoceto reductasa 1B8 (Akr1b8), monooxigenasa que contiene flavina 2 (FMO2), receptor III de la región receptora de Fc (Fcgr3), triptasa beta 1 (TPSB1), proteasa-6 de mastocito (Mcp6), neurexin-1-alfa (NRXN-1), factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), iodotironina deiodinasa tipo II (DIO2), angiopoyetina-14 (Angpt14), grupo de diferenciación (CD36) y Ntel. Las enfermedades o afecciones asociadas con niveles elevados o anormales de estos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, cáncer, tuberculosis del sistema nervioso central y pulmonar, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, osteoartritis, asma, apoplejía, enfisema, nefropatía diabética, intervillositis histiocítica crónica de la placenta, hipertensión, aneurisma aórtica abdominal, enfermedad del intestino inflamatorio, rinosinusitis crónica, enfermedad de la arteria coronaria, y enfermedad de riñón.

Se describe la administración a un sujeto en necesidad de la misma de una combinación de extracto o polvo de brócoli y un extracto o polvo de cardo mariano, así como la administración al sujeto de una combinación de glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, y un extracto o polvo de cardo mariano. En realizaciones preferidas, las combinaciones demuestran un efecto sinérgico.

En realizaciones preferidas, uno o más componentes de las combinaciones (por ejemplo, el precursor de sulforafano que es glucorafanina, la enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano el cual es glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, ácido ascórbico, el extracto o polvo de cardo mariano) se administran juntos en una composición o forma farmacéutica, o separadamente, preferentemente en un periodo en el que sus propiedades terapéuticas se superponen. En algunas realizaciones, los componentes de las combinaciones se pueden administrar en dos o más composiciones oralmente administrables o formas farmacéuticas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la glucorafanina, la glucosidasa o tioglucosidasa, preferentemente mirosinasa, y ácido ascórbico se administran en una forma farmacéutica oralmente administrable, mientras que el extracto o polvo de cardo mariano se administran en una o más formas farmacéuticas oralmente administrables separadas o adicionales. En realizaciones preferidas, los componentes de la combinación se administran en una forma farmacéutica.

En algunas realizaciones, la combinación se puede administrar a una frecuencia de 1 a 10 veces diarias, preferentemente 1 a 5 veces diarias, más preferentemente 1 a 3 veces diarias, y lo más preferentemente 1 vez diaria.

Las dosis descritas en esta solicitud se refieren generalmente a dosis adecuadas para seres humanos. Los cálculos de la dosis se pueden determinar por los expertos en la técnica evaluando el peso corporal, el área superficial, la tasa metabólica, y las diferencias de especie.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, incluyendo los mamíferos y las aves. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas, camellos, elefantes, leones, tigres, osos, focas y conejos. En realizaciones preferidas, los sujetos comprenden mamíferos que no son consumidos como alimento, tales como seres humanos, gatos y perros.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Lo siguiente es una formulación ilustrativa:

- Extracto de brócoli que contiene glucorafanina (aproximadamente 12 % en p/p), 50 mg a 5 g.
- Polvo de brote de brócoli liofilizado que contiene mirosinasa, 25 mg a 500 mg
- Ácido ascórbico, 5 mg a 500 mg
- 10 Extracto de cardo mariano (aproximadamente 20 % a 35 % en p/p de silibinina), 25 mg a 5 g

Ejemplo 2

15 Se desarrolló un método Cromatográfico de Interacción Hidrófoba (HILIC), que comprendía las siguientes condiciones:

- Columna: Waters BEH Amide, 1,7 µm de tamaño de partícula; 2,1 mm x 100 mm
- Fase móvil: Acetato de amonio 10 mM al 20 %, pH 5,0; acetonitrilo al 80 %;
- 20 Modo de separación: isocrática
- Temperatura de columna: 70 °C
- Tasa de flujo: 0,7 ml/min

25 Las condiciones anteriores permiten la separación de cinco glucosinolatos de *Brassicaceae* típicas, incluyendo el precursor de sulforafano, glucorafanina.

Ejemplo 3

Consumo de glucorafanina en función de la concentración de ácido ascórbico

30 Aproximadamente 250 mg de extracto de semilla de brócoli que contenía aproximadamente 12 % (p/p) de glucorafanina se sometieron a hidrólisis mediante una concentración fijada de mirosinasa derivada de brote de brócoli en presencia de concentración variable de ácido ascórbico, que oscilaba de 0 a 600 µmoles/litro. Las mezclas de reacción se termoindicaron a 38 °C; las alícuotas se retiraron cada 15 minutos durante 60 minutos, y la concentración de glucorafanina se determinó cromatográficamente. La tasa de consumo de glucorafanina se interpretó como la tasa de su conversión a sulforafano. La representación gráfica de la reducción de contenido de glucorafanina en función de los resultados de concentración de ácido ascórbico creciente en una serie de gráficas lineales; las pendientes de las líneas de regresión lineal reflejan la tasa de consumo de glucorafanina, en µmoles/minuto. Está claro que en presencia de 600 µmoles/litro de concentración de ácido ascórbico, la tasa de reacción se incrementó 13 veces en relación con lo que procedió en ausencia de los efectos moduladores del ácido ascórbico

| Tiempo, min | Contenido de ácido ascórbico | | | | | | | µmoles GR |
|-------------|------------------------------|----------|----------|----------|-----------------|----------|----------|-----------|
| | 0 µM | 50 µM | 125 µM | 250 µM | 250 µM Filtrado | 400 µM | 600 µM | |
| 0 | 93,36 | 93,36 | 93,36 | 93,36 | 93,36 | 93,36 | 93,36 | |
| 15 | 92,24 | 89,20 | 84,52 | 80,95 | 86,31 | 78,32 | 75,02 | |
| 30 | 90,71 | 84,24 | 75,92 | 69,06 | 79,44 | 62,78 | 55,66 | |
| 45 | 89,44 | 80,30 | 68,09 | 57,63 | 71,94 | 47,67 | 37,50 | |
| 60 | 87,79 | 76,36 | 59,41 | 45,76 | 65,18 | 33,15 | 22,09 | |
| Pendiente | -0,09293 | -0,28599 | -0,56217 | -0,79012 | -0,47140 | -1,00714 | -1,20029 | µmol/min |
| Intercepto | 93,496 | 93,271 | 93,123 | 93,053 | 93,386 | 93,270 | 92,734 | |

Ejemplo 4

45 Conversión equimolar de glucorafanina a sulforafano

Se condujo un experimento en dos partes para elucidar más el papel del ácido ascórbico en la modulación de la actividad de la mirosinasa. Todas las soluciones se prepararon en solución salina tamponada con Tris 20 mM, a pH 7,5, previamente identificada como un óptimo para la actividad de la mirosinasa; cada tubo de muestra tenía 100 mg de polvo de brócoli liofilizado pesado con precisión como una fuente de mirosinasa. El experimento se condujo a 38 °C durante 2 horas, con alícuotas de muestra separadas en incrementos de 30 minutos, y tanto el contenido de glucorafanina como sulforafano valorado por HPLC. Se utilizó una solución de "parada" claramente ácida para inhibir instantáneamente más la actividad de la mirosinasa en las alícuotas separadas. Una muestra control no contenía ácido ascórbico, y la conversión enzimática se procedió no asistida por un cofactor.

55

ES 2 700 223 T3

PARTE 1. En presencia de la concentración fijada de ácido ascórbico, 1 mmol/litro, se añadió una cantidad creciente de extracto de semilla de brócoli (aproximadamente 12 % de glucorafanina, p/p), que oscilaba de 250 mg a 500 mg.

5 PARTE 2. Mientras que se mantenía la cantidad de extracto de semilla de brócoli fijada a 250 mg, la concentración de ácido ascórbico se varió de 0,4 mmol/litro a 3,8 mmol/litro.

10 La tabla de a continuación presenta glucorafanina y sulforafano expresados en μ moles. Está claro que en los primeros 30 minutos en casi todas las mezclas de reacción, la conversión de glucorafanina a sulforafano era completa. Sin embargo, el examen cuidadoso de la conversión enzimática que se da en la muestra control, sin los efectos estimulantes del ácido ascórbico, revela una conversión equimolar de glucorafanina a sulforafano, es decir, la cantidad de glucorafanina consumida da como resultado la cantidad equivalente de sulforafano producido.

| Tiempo, min | Glucorafanina, μ moles | | | | | Sulforafano, μ moles | | | | |
|------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 |
| GR 250 mg AA 0,0 mM | 58,02 | 48,57 | 37,52 | 26,58 | 15,67 | 3,42 | 12,08 | 22,27 | 33,17 | 42,89 |
| GR 250 mg AA 1,0 mM | 40,07 | | | | | 21,51 | 61,95 | 60,20 | 60,04 | 58,25 |
| GR 300 mg AA 1,0 mM | 49,31 | | | | | 24,18 | 74,40 | 73,04 | 72,19 | 70,56 |
| GR 350 mg AA 1,0 mM | 61,41 | | | | | 25,00 | 84,92 | 84,02 | 83,19 | 80,02 |
| GR 400 mg AA 1,0 mM | 71,35 | 1,56 | | | | 26,71 | 96,60 | 95,38 | 93,39 | 91,16 |
| GR 500 mg AA 1,0 mM | 89,41 | 1,01 | | | | 33,52 | 120,16 | 118,45 | 116,45 | 112,34 |
| GR 250 mg AA 0,4 mM | 45,66 | | | | | 15,98 | 62,06 | 61,01 | 60,88 | 58,90 |
| GR 250 mg AA 1,0 mM | 35,24 | | | | | 26,49 | 62,19 | 60,62 | 60,41 | 59,10 |
| GR 250 mg AA 2,0 mM | 24,94 | | | | | 36,05 | 60,85 | 59,78 | 59,65 | 58,08 |
| GR 250 mg AA 2,9 mM | 22,24 | | | | | 38,20 | 59,95 | 59,34 | 58,77 | 56,99 |
| GR 250 mg AA 3,8 mM | 21,70 | | | | | 37,87 | 58,77 | 57,79 | 58,41 | 56,17 |

15 En la Parte 2 del experimento, se valoró el efecto modulador de la concentración creciente de ácido ascórbico sobre la actividad de la mirosinasa. Se observó un incremento inicial, aparentemente lineal, en la conversión promovida por mirosinasa de glucorafanina a sulforafano a aproximadamente 2 mmol/l de concentración de ácido ascórbico, seguido posteriormente de una estabilización considerable.

20 Finalmente, el examen de la producción de sulforafano de después de 30 minutos en la PARTE 1 del experimento, revela que en presencia de 1 mmol/litro de ácido ascórbico, la cantidad fijada de mirosinasa contenida en 100 mg de polvo de brote de brócoli liofilizado es capaz de generar al menos 200 μ moles de sulforafano, de una manera predeciblemente lineal. La Figura 1, 2, 3 y 4 demuestran los resultados de este estudio.

Ejemplo 5

25 Conversión de glucorafanina a sulforafano en presencia de fluido intestinal simulado

30 Se usó polvo de Fluido intestinal simulado (FIS), un concentrado comercialmente suministrado que se aproxima mucho al contenido intestinal humano en términos de composición, pH y fuerza iónica. El experimento utilizó un Aparato de Disolución USP 2 (palas), en el que en seis vasos de disolución se dispensaron 500 ml de Fluido Intestinal Simulado, junto con 150 mg de polvo de brote de brócoli liofilizado como fuente de mirosinasa. En los vasos 1 a 4, se varió la concentración de ácido ascórbico de 0,25 a 1,00 mmol/litro, en el vaso 5, además de 1 mmol/litro de ácido ascórbico, se suspendieron 3,125 g de pancreatina (8x USP); en el vaso 6, además de 1 mmol/litro de ácido ascórbico, y 3,125 g de pancreatina (8x USP), se añadió una cantidad doblada de polvo de brote de brócoli liofilizado (300 mg). Después de que los vasos se llevaran a 38 °C, se añadieron 250 mg de extracto de semilla de brócoli rica en glucorafanina (12 % en p/p) a cada uno, y las suspensiones resultantes se agitaron a 75 rpm durante 2 horas. Las alícuotas se retiraron cada 15 minutos, y se ensayaron para sulforafano. La Figura 4 muestra directa correlación entre mayor producción de sulforafano y mayores concentraciones de ácido ascórbico, especialmente en las fases más tempranas del experimento.

40

Ejemplo 6

El siguiente estudio se condujo para determinar el efecto de la combinación de sulforafano y silibinina sobre niveles de glutatión. El glutatión juega un papel importante en el cuerpo, ya que puede servir como antioxidante, detoxificante, y potenciador de la inmunidad. Los niveles disminuidos del glutatión pueden causar que un paciente sea susceptible al estrés oxidativo, enfermedad, y cáncer. Por lo tanto, un incremento en los niveles de glutatión es un efecto beneficioso.

En el estudio, la línea celular cancerosa humana, células HepG2 se trataron con DMSO (vehículo control), sulforafano (SFN), silibinina (Silib), o la combinación de sulforafano y silibinina, durante 24 horas. Los lisados celulares se recogieron y los niveles de glutatión se midieron usando o-ftalaldehído (OPT) como reactivo fluorescente. La Figura 5 y Figura 6 muestran los resultados del estudio.

En la Parte 1 del estudio, se comparó el efecto de 0,5 μM de SFN con diversas concentraciones de silibinina y a la combinación de 0,5 μM de SFN y silibinina a diversas concentraciones. En particular, las células se trataron con uno de lo siguiente: (i) DMSO (vehículo control), (ii) 0,5 μM de SFN, (iii) 100 μM de Silib, (iv) 200 μM de Silib, (v) 300 μM de Silib, (vi) 0,5 μM de SFN y 100 μM de Silib, (vii) 0,5 μM de SFN y 200 μM de Silib, y (viii) 0,5 μM de SFN y 300 μM de Silib. Los resultados demuestran que la combinación de sulforafano y silibinina en cada una de las dosis ensayadas tenían un efecto sinérgico en comparación con cada uno de los componentes solos. Por ejemplo, cuando las células se trataron con componentes individuales los niveles de glutatión permanecieron los mismos que con el tratamiento de sulforafano solo o disminuyeron ligeramente con tratamiento con Silibinina en comparación con el control con DMSO (vehículo). Sin embargo, cuando las células se trataron con la combinación de sulforafano y silibinina, en cada una de las dosis ensayadas, los niveles de glutatión se incrementaron sinérgicamente en comparación con el control. Un incremento en los niveles de glutatión es un efecto beneficioso. Los resultados se representan en la Figura 5.

En la Parte 2 del estudio, el efecto de 2 μM de SFN se comparó con diversas concentraciones de silibinina y con la combinación de 2 μM de SFN y silibinina a diversas concentraciones. En particular, las células se trataron con uno de lo siguiente: (i) DMSO (vehículo control), (ii) 2 μM de SFN, (iii) 100 μM de Silib, (iv) 300 μM de Silib, (v) 2 μM de SFN y 100 μM de Silib, y (vi) 0,5 μM de SFN y 300 μM de Silib. Los resultados demuestran que la combinación de sulforafano y silibinina en cada una de las dosis ensayadas tenían un efecto sinérgico en comparación con cada componente solo. Por ejemplo, cuando las células se trataron con componentes individuales, los niveles de glutatión permanecieron los mismos que con el tratamiento de sulforafano solo o disminuyeron ligeramente con tratamiento con silibinina en comparación con el control. Sin embargo, cuando las células se trataron con la combinación de sulforafano y silibinina, en cada una de las dosis ensayadas, los niveles de glutatión se incrementaron sinérgicamente con el control. Un incremento en los niveles de glutatión es un efecto beneficioso para detoxificar células. Los resultados se representan en la Figura 6.

Ejemplo 7

Un sujeto presenta enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y está padeciendo de síntomas que incluyen malestar general, fatiga e molestia. Se le administra un comprimido que contiene glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico y un extracto de cardo mariano. El comprimido es una formulación revestida entérica que libera los contenidos en el intestino delgado. Después de un mes de administración diaria del comprimido, el sujeto experimenta modulación de biomarcadores subrogados incluyendo el glutatión que se correlaciona con el mejoramiento en los síntomas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición oralmente administrable que comprende:

- 5 - un precursor de sulforafano el cual es glucorafanina;
 - una enzima capaz de convertir el precursor de sulforafano a sulforafano la cual es una glucosidasa, preferentemente una tioglucosidasa;
 - un potenciador de enzima el cual es ácido ascórbico; y
10 - un extracto o polvo de cardo mariano.

2. La composición oralmente administrable de la reivindicación 1, en la que la tioglucosidasa es mirosinasa.

3. La composición oralmente administrable de la reivindicación 1, en la que la composición comprende un comprimido revestido entérico o cápsula.

15 4. La composición oralmente administrable de la reivindicación 1, que comprende además uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en quercetina, un aminoazúcar, un glicosaminoglicano, insaponificables de aguacate/soja, una vitamina, fruto del café, magnesio, silimarina, proantocianidinas, ácido ursólico, curcumina, fitoesteroles y fitoestanoles.

20 5. La composición oralmente administrable de la reivindicación 1, que comprende glucorafanina, mirosinasa, ácido ascórbico, y extracto de cardo mariano.

25 6. La composición oralmente administrable de la reivindicación 1, en la que la composición comprende extracto o polvo de brócoli.

7. Una composición oralmente administrable según la reivindicación 1, en la que el precursor de sulforafano está comprendido en un extracto o polvo de brócoli.

30 8. La composición oralmente administrable de la reivindicación 7, en la que el extracto o polvo de brócoli comprende glucorafanina en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 75 % en p/p.

35 9. La composición oralmente administrable de la reivindicación 7, en la que el extracto o polvo de brócoli comprende mirosinasa.

40 10. La composición oralmente administrable de la reivindicación 7, que comprende un extracto de cardo mariano que comprende silimarina.

45 11. La composición oralmente administrable de la reivindicación 7, que comprende un extracto de cardo mariano que comprende silibinina.

12. La composición oralmente administrable de la reivindicación 7, que comprende además uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en: quercetina, un aminoazúcar, un glicosaminoglicano, insaponificables de aguacate/soja, una vitamina, fruto del café, magnesio, proantocianidinas, ácido ursólico, curcumina, fitoesteroles, fitoestanoles y S-adenosilmetionina (SAME).

FIG. 1

Conversión de Glucorafanina a 38 °C
sin Ácido Ascórbico

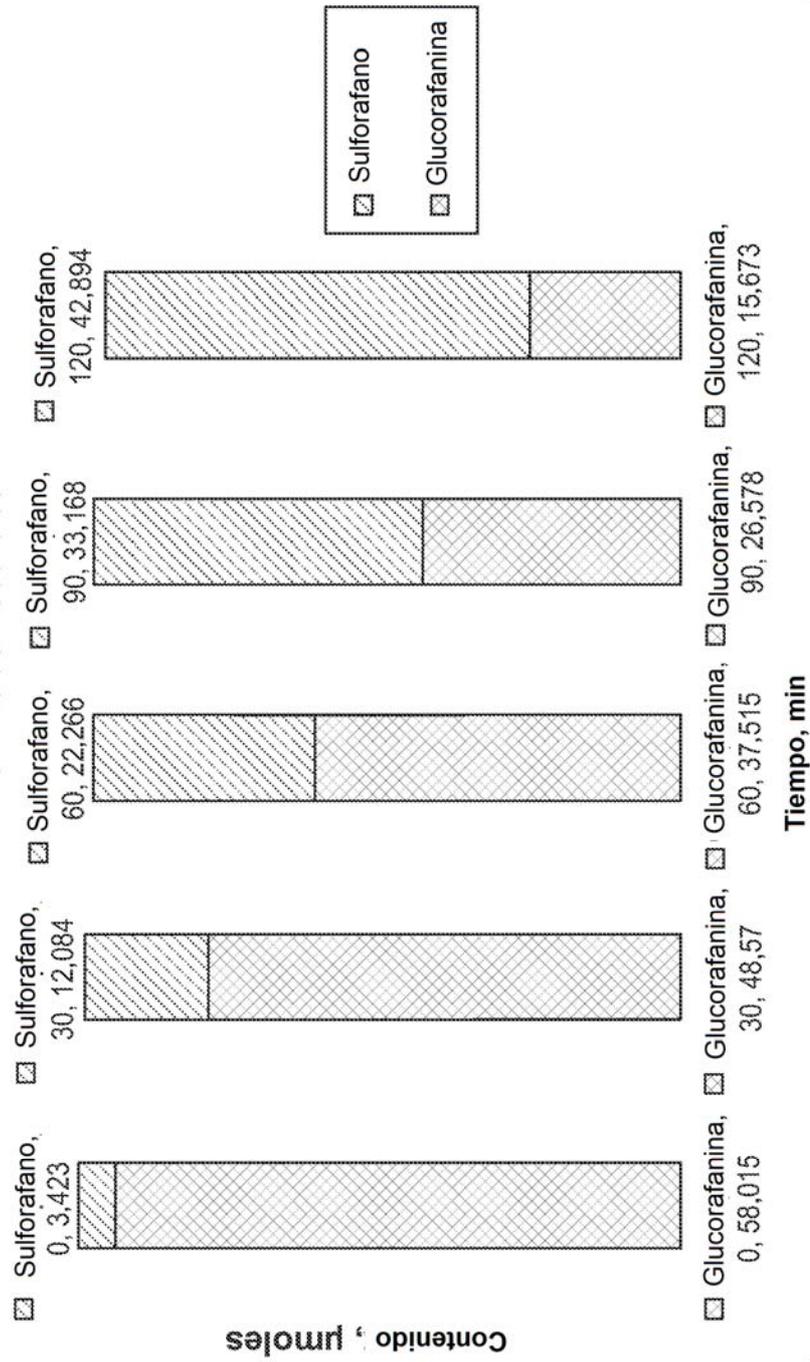


FIG. 2

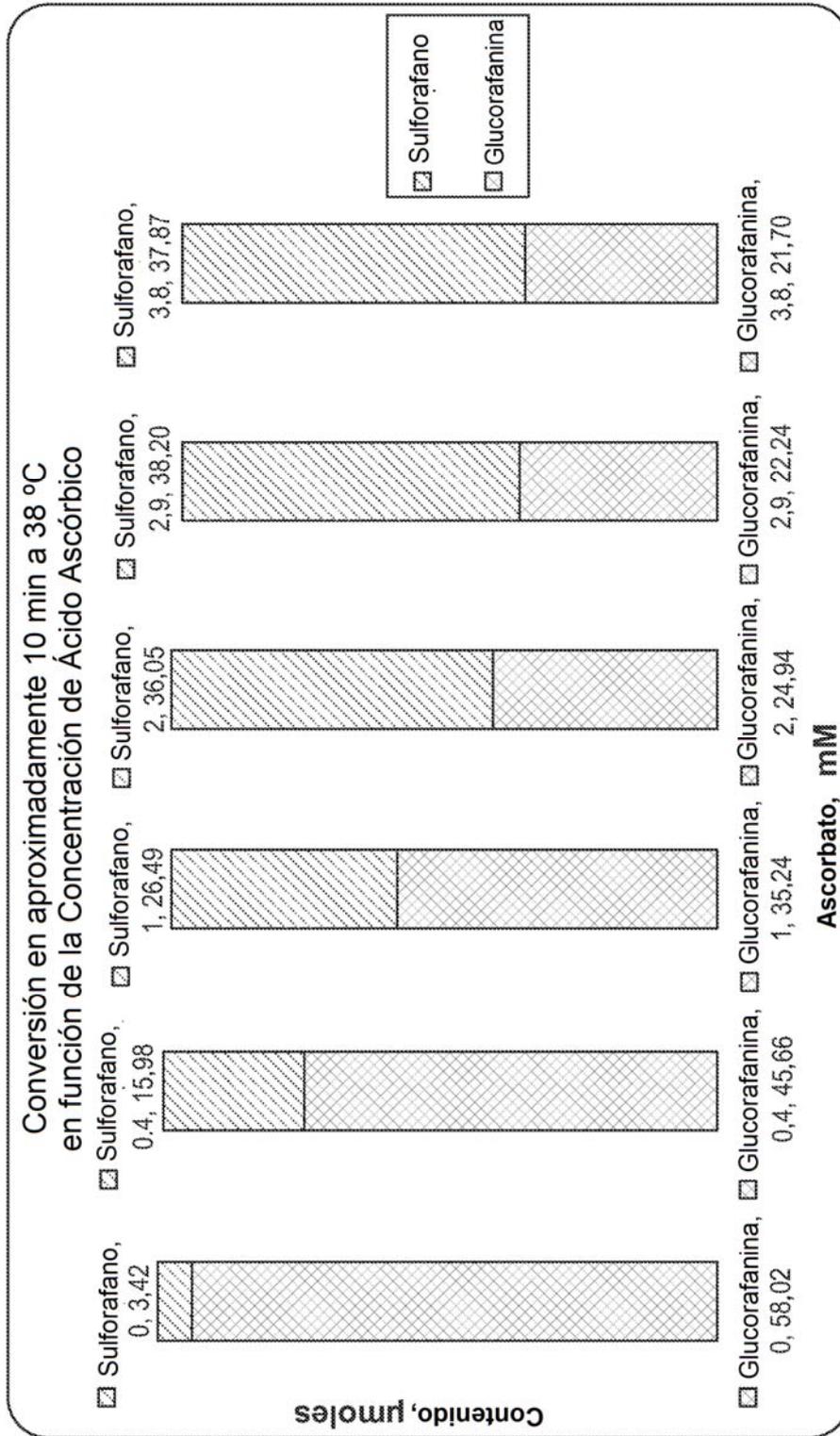


FIG. 3

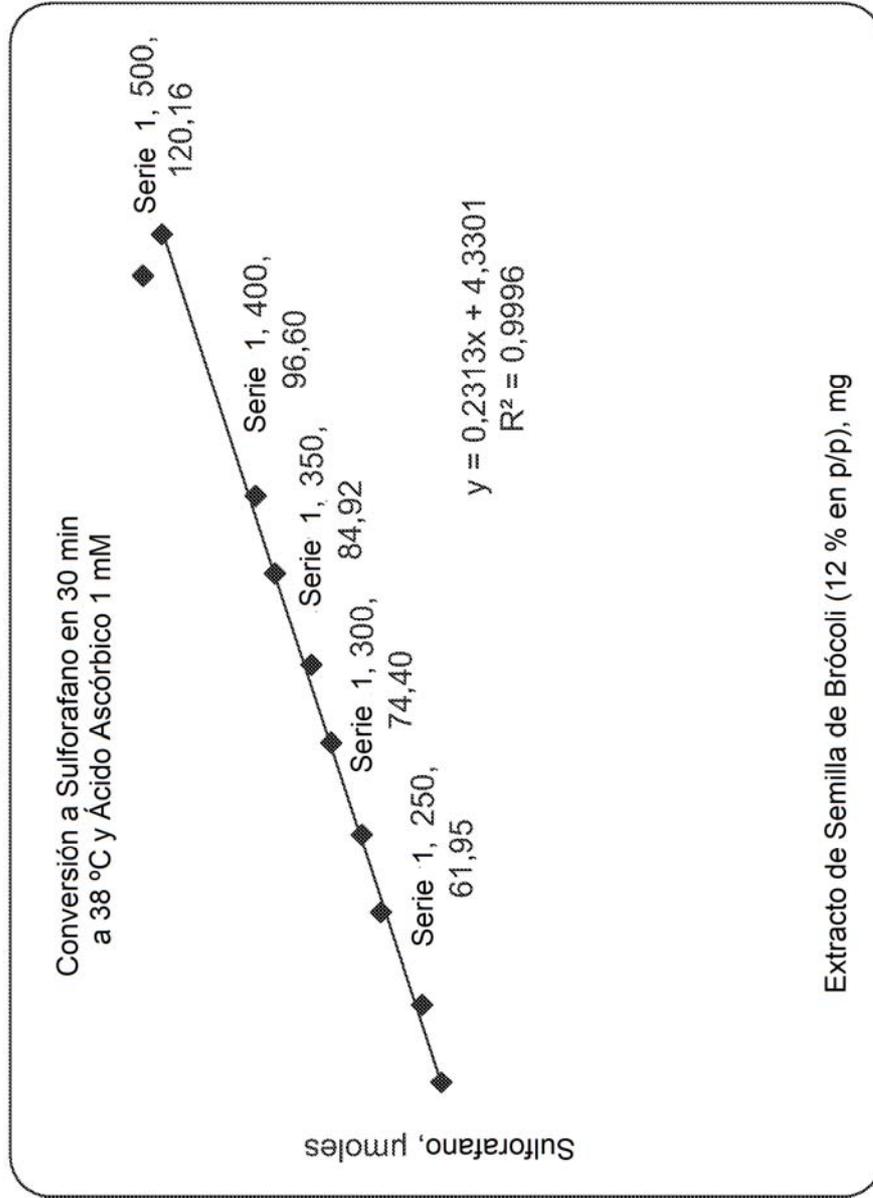


FIG. 4

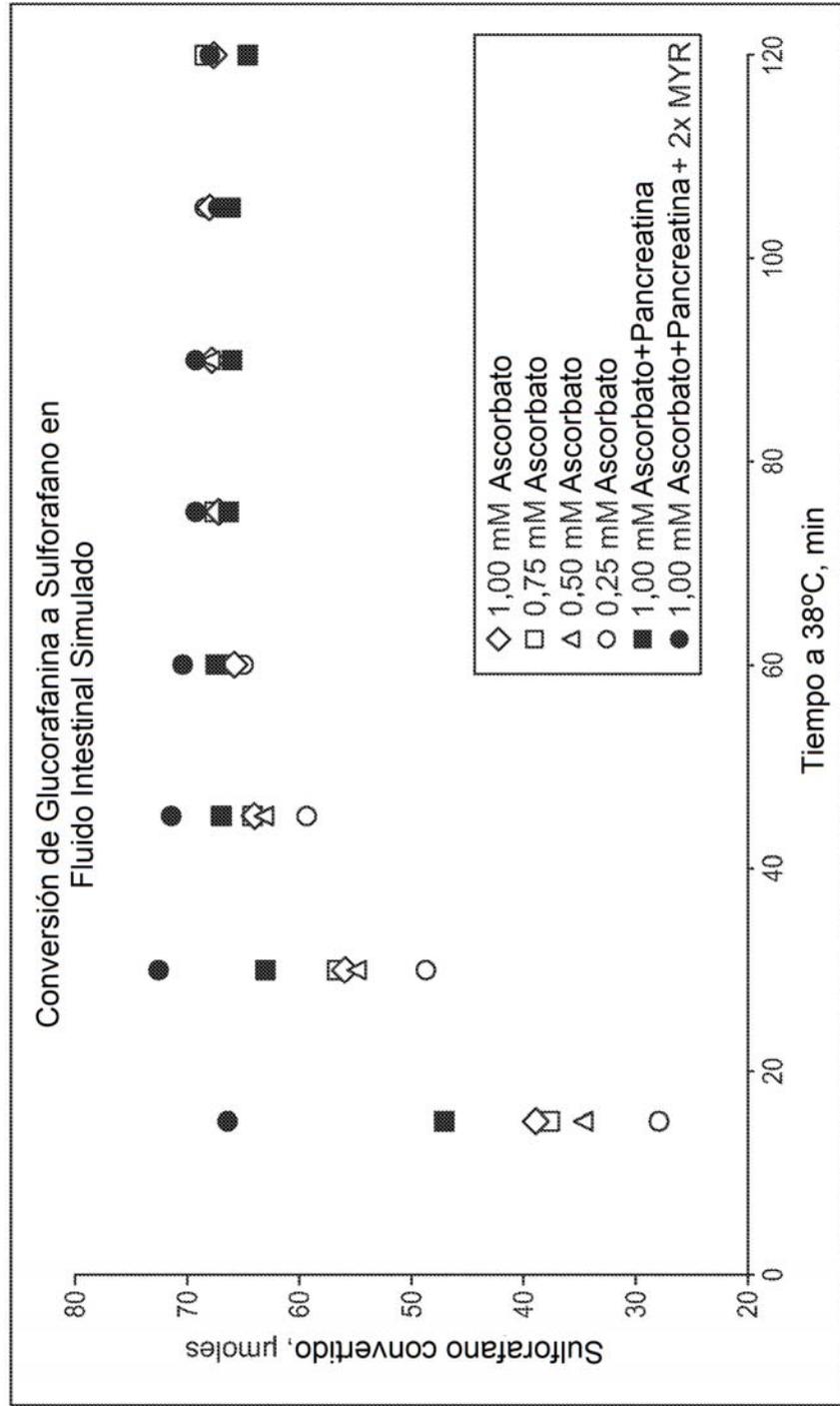


FIG. 5

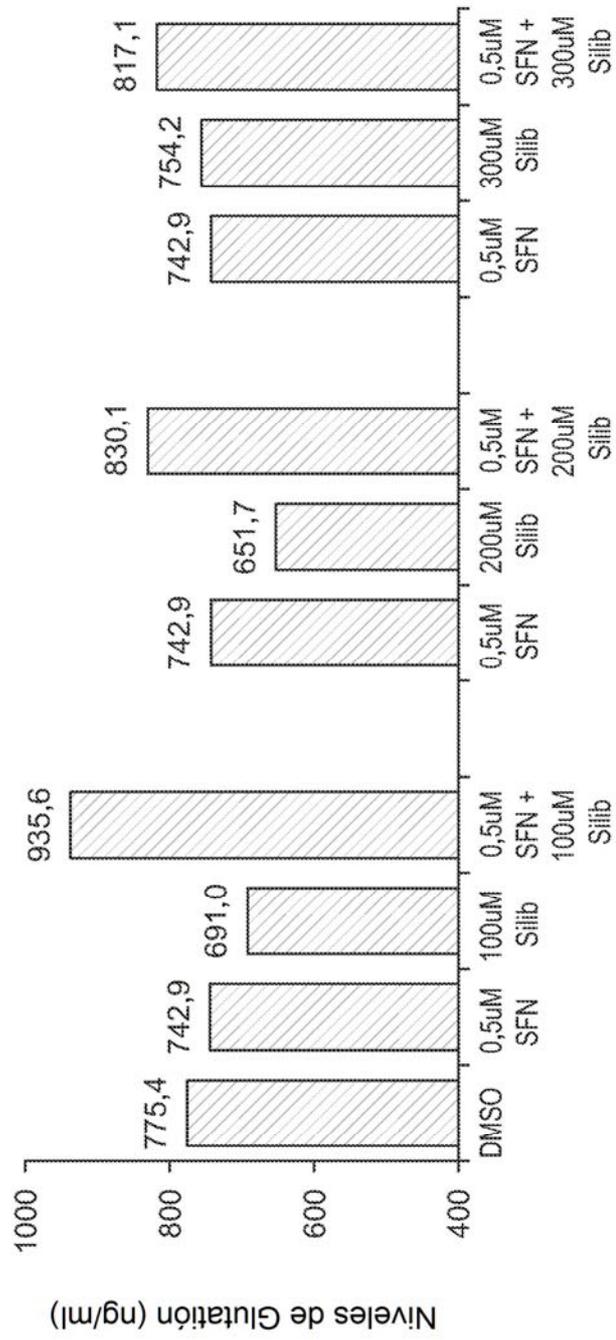


FIG. 6

