

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 075**

51 Int. Cl.:

C12G 3/04 (2009.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2014 PCT/IB2014/061051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2014 E 14732377 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2992078**

54 Título: **Toxicidad reducida en bebidas alcohólicas**

30 Prioridad:

29.04.2013 IN CH18942013

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

18.02.2020

73 Titular/es:

**CHIGURUPATI, HARSHA (100.0%)
H. No. 512/M, Road No. 31, Jubilee Hills
Hyderabad 500033, IN**

72 Inventor/es:

**CHIGURUPATI, HARSHA;
BIYANI, MANISH, RADHESHYAM y
AUDDY, BISWAJIT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 743 075 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

Toxicidad reducida en bebidas alcohólicas

La siguiente especificación describe particularmente la invención y la manera en que se va a realizar.

Campo de invención:

- 5 La presente divulgación proporciona una bebida alcohólica que tiene una toxicidad hepática reducida.

Antecedentes de la invención:

El consumo de etanol podría conducir a 60 condiciones médicas. Efectos tóxicos agudos y crónicos del etanol pueden producir daños irreversibles en los órganos (Das S. K. et al., Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2010, Vol. 47, 32). Las formas ampliamente aceptadas de enfermedades hepáticas alcohólicas (ALD) son el hígado graso simple (esteatosis), que es reversible con abstinencia, el hígado graso acompañado de inflamación (esteato-hepatitis) conduce a la formación de tejido cicatrizal (fibrosis), la destrucción de la estructura normal del hígado (cirrosis hepática), que puede mejorar o no con la abstinencia y posteriormente conducir a cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular). En 2010, la WHO sugiere que el 10 % de la población adulta en los Estados Unidos que padece trastornos por consumo de alcohol y cirrosis hepática es la duodécima causa principal de muerte en los Estados Unidos (Alcohol and Health, Focus on: Alcohol and the Liver, 2010, vol. 33, no. 1 and 2, 87). Se sabe que el 5 % del alcohol etílico, es decir, etanol (de aquí en adelante alcohol), ingerido por un ser humano, se excreta sin cambios mientras que el 95 % restante se degrada a acetaldehído. El alcohol se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal. En ayunas, la concentración máxima de alcohol en sangre se alcanza en 30 minutos. La distribución es rápida con niveles de tejido que se aproximan a las concentraciones sanguíneas. El hígado representa casi el 90 % del metabolismo del alcohol, el resto se excreta a través de los pulmones y la orina. El adulto típico puede metabolizar 7-10 g de alcohol por hora (Patente de Estados Unidos No. 7666909B2).

La vía primaria del metabolismo del alcohol, cuando se consume en cantidades bajas a moderadas, se cataliza principalmente en el citoplasma de los hepatocitos por la alcohol deshidrogenasa (ADH) para formar acetaldehído. La acumulación de NADH (equivalentes reductores en exceso) en el hígado desempeña un papel en el daño hepático visto más prominentemente con el consumo crónico de alcohol. El acetaldehído producido a través del sistema microsómico de oxidación de etanol (MEOS) representa inicialmente una vía menor de oxidación de etanol que probablemente representa menos del 10 % de la capacidad del hígado para oxidar etanol.

A un nivel de alcohol más alto (> 100 mg dl), el MEOS depende de CYP450 (2E1, IA2 y 3A4) juega un papel importante en el metabolismo del alcohol usando NADPH como un cofactor y O₂. La catalasa es especialmente capaz de oxidar etanol en ayunas en presencia del sistema generador de peróxido de hidrógeno. El acetaldehído se oxida en el hígado mediante la aldehído deshidrogenasa (ALDH) dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido mitocondrial (NAD⁺) a acetato. La actividad de ALDH es casi 3 veces menor que la ADH, por lo tanto, se produce la acumulación de acetaldehído. El acetato se metaboliza aún más a acetil CoA y puede ingresar en el ciclo TCA o en la síntesis de ácidos grasos. Cada una de estas vías da como resultado la formación de radicales libres (como las especies reactivas de oxígeno {ROS}) con cambios concomitantes en el estado de reducción oxidación de las células (es decir, en la proporción de NADH a NAD⁺ resulta en la producción de más NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD⁺) reducido por dos electrones). La célula tiene una capacidad limitada para oxidar NADH de nuevo a NAD⁺ en la cadena respiratoria mitocondrial a la capacidad máxima de este sistema, que determina la cinética de la reacción. El estado de reducción oxidación en relación con el metabolismo del alcohol provoca la inhibición de reacciones enzimáticas mediadas por NAD⁺ típicas del metabolismo normal del hepatocito. El ciclo del ácido cítrico es el más afectado a medida que se inhibe. Esto conduce a una proporción de NADH/NAD positiva, que se considera la razón más importante para el desarrollo de hígado graso inducido por alcohol. La capacidad máxima de la cadena respiratoria mitocondrial depende del nivel general del metabolismo del cuerpo. La consecuencia del estado de reducción oxidación alterado incluye la hipoxia (célula con déficit de oxígeno). La otra vía plausible de la hepatotoxicidad inducida por el alcohol incluye el exceso de producción de citocinas proinflamatorias por las células de Kupffer estimuladas por endotoxina intestinal. Las ROS se generan principalmente en asociación con el sistema de transporte de electrones mitocondrial; también es producido por CYP2E1 y por células Kupffer activadas en el hígado. El consumo agudo y crónico de alcohol puede aumentar la producción de las ROS, lo que conduce al estrés oxidativo a través de una variedad de vías mencionadas anteriormente [(Zakhari, S. Alcohol Research & Health, 2006, 29, 4, 245), (Wheeler M.D. et al, Free Radical Biology & Medicine, 2001, Vol. 31, No. 12, 1544), (Koop, D.R., Alcohol Research & Health, 2006, 29, 4, 274), (Patente de Estados Unidos No. 7666909B2)].

Los mecanismos involucrados por los cuales el alcohol causa daño celular son complejos y la combinación de varias vías interrelacionadas. Las ROS reaccionan principalmente con la membrana celular (la unión apretada se vuelve más permeable) y, a su vez, hay escape de lipopolisacáridos (LPS), como consecuencia se altera la integridad estructural del intestino. Los aumentos en las enzimas transaminasas [aspartato amino transferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)] indican escape celular y pérdida de integridad funcional de la membrana celular (Yue et. al, 2006). La pérdida de integridad celular afecta la función hepatobiliar que conduce a actividades elevadas de fosfatasa alcalina (ALKP) con aumento simultáneo en el nivel de bilirrubina sérica y disminución en el contenido total de proteínas

plasmáticas. Tanto los aumentos como las disminuciones en los niveles de ROS pueden conducir a la apoptosis de los hepatocitos (Wheeler M.D. Alcohol Res. Health, 2003; 27, 300). Para que la célula funcione normalmente, el GSH es crítico para protegerse contra las ROS generadas durante la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. El consumo de alcohol agota rápidamente los niveles de GSH; el alcohol interfiere con el citocromo c para escapar de las mitocondrias al citosol, lo que puede activar enzimas conocidas como caspasas que pueden desencadenar la apoptosis.

Las ROS inducen LPO [ROS que reacciona con Malondialdehído (MDA), 4-hidroxi nonenal (HNE)] y se reconoce como un importante punto de partida del daño a los hepatocitos. Las células de Kupffer activadas por endotoxina afectan las mitocondrias que conducen a la liberación de ROS (radical de peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, particularmente radical superóxido) y varias citocinas (a saber, factor necrótico tumoral {TNF- α }) que conduce a necrosis y apoptosis de hepatocitos. Los estudios clínicos han establecido que los pacientes con enfermedad hepática alcohólica tienen niveles aumentados de las citocinas inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α , así como de la quimiocina IL-8 y otras citocinas.

El alcohol podría mejorar la sensibilidad de los hepatocitos, lo que podría conducir a una mayor producción de las ROS en las mitocondrias. Las ROS podrían activar una proteína reguladora llamada factor nuclear kappa B (NF κ B), que desempeña un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune y controla las actividades de numerosos genes, incluidos los que expresan TNF- α y su receptor, así como genes que codifican proteínas que promueven apoptosis. Por lo tanto, se establecería un círculo vicioso en los hepatocitos: La TNF- α promueve la producción de ROS, que a su vez activa NF κ B, lo que lleva a una producción mejorada de TNF- α adicional y su receptor, así como a la producción de factores que promueven la apoptosis. Este ciclo eventualmente altera la estructura de los hepatocitos, deteriora su función y puede conducir a la apoptosis de los hepatocitos. La TNF- α también facilita la regeneración de los hepatocitos al promover la proliferación [(Wheeler M.D. Alcohol Res Health, 2003; 27,300), (Molina P., Happel, K.I., Zhang P., Kolls J.K., Nelson S., Focus on: alcohol and the immune system. Alcohol Res. Health, 2010, 33 (1 & 2), 97)1].

El TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) podría estar involucrado en el desarrollo de daño hepático inducido por el alcohol, lo que podría causar que los hepatocitos produzcan moléculas como la transglutaminasa, citoqueratinas que normalmente son responsables de dar a las células sus formas. En exceso, estas moléculas están entrecruzadas para formar estructuras microscópicas llamadas cuerpos de Mallory, que son marcadores de hepatitis alcohólica. El TGF- β también puede contribuir al daño hepático al activar las células estrelladas. En un estado normal, estas células sirven principalmente para almacenar grasa y vitamina A en el hígado. Cuando se activan, las células estrelladas producen colágeno, el componente principal del tejido cicatrizal que conduce al desarrollo de fibrosis hepática. El alcohol podría desencadenar la activación de TGF- β y, por lo tanto, contribuir al inicio de la apoptosis si esta molécula ingresa a la sangre en concentraciones más altas (Wheeler M.D., Alcohol Res. Health, 2003; 27, 300).

El acetaldehído o las ROS con ADN o proteínas o bloques de construcción de proteínas y las ROS con MDA o MAA (aducto mixto de MDA-acetaldehído-proteína) o HNE, etc. en la célula podrían formar aductos estables o inestables, que podrían ser carcinogénicos, inmunogénicos, inducir procesos inflamatorios, daño a las mitocondrias, etc. [(Zakhari, S. Alcohol Research & Health, 2006, 29 (4)245); (D. Wu, Alcohol Research & Health, 2006, 27, 4, 277); (Wheeler M.D., Alcohol Res. Health, 2003; 27, 300); (Molina P., Happel K.I., Zhang P., Kolls J.K., Nelson S., Focus on: alcohol and the immune system; (Alcohol Res. Health, 2010, 33, Vol. 1 & 2, 97); (Neuman M.G., Cytokine-central factor in alcoholic liver disease, Alcohol Res. Health, 2003, 27,307)].

Variedades de mecanismos endógenos enzimáticos y no enzimáticos han evolucionado para proteger las células contra las ROS. Esto incluye las superóxido dismutasas (SOD), que eliminan O₂⁻; la catalasa (CAT) y el sistema de glutatión peroxidasa (GP_x), que elimina el H₂O₂ y los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular, como el glutatión reducido (GSH), vitamina E, vitamina C, vitamina A, ubiquinona, ácido úrico y bilirrubina. Pero estos son capaces de proteger las células en un grado limitado. Se podría lograr una protección adicional mediante la administración oral del precursor de glutatión como S-adenosil-L-metionina (SAME), N-acetil cisteína (NAC) o antioxidante como la vitamina E, vitamina C, bioactivos de plantas (ácido gálico, quercetinetc), etc. (D. Wu, Alcohol Research & Health, 2006, 27, 4, 277).

Técnica anterior de la invención:

La literatura divulga bebidas alcohólicas con diversos tipos de aditivos. La siguiente literatura existe en el campo de esta invención y se ha considerado en su totalidad.

La publicación de patente de Estados Unidos No. 20100086666 divulga bebidas alcohólicas en las que una proteína como la caseína se hidroliza para mejorar el sabor más suave y proporciona algún beneficio nutricional al consumidor.

Das S. K. et.al. (Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2010, vol. 47, 32) describe el tratamiento concomitante de resveratrol o vitamina E con alcohol en ratones, mejora; el estrés oxidativo inducido por alcohol, proceso de angiogénesis y ayuda a controlar la actividad inmunomoduladora.

La Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20100086666 divulga bebidas alcohólicas, que comprenden fenol como epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina (EC), epicatequingalato (ECG),

proantocianina, tanina y quercetina, etc., conocidos por reducir el estrés oxidativo al captar los radicales libres, generados por alcohol.

La Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 7666909B2 revela bebidas alcohólicas que comprenden ácido D-glicérico y sus sales que aumentan el metabolismo del alcohol y reducen los eventos adversos causados por el consumo de alcohol.

GA o alcaloide Matrina (Mat) aislado de *S. flavescens* solo, o GA + Mat, cuando se administra a modelos de ratas de fibrosis hepática inducida por inyección abdominal de dimetil nitrosamina (DMN) en ratones con sobredosis de acetaminofeno, reduce la mortalidad al atenuar la hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno. Esto probablemente se deba al número y el área reducidos de focos positivos γ -GT. Además, GA+ Mat tenía un efecto protector sobre la inmunosupresión, un fuerte efecto antiinflamatorio inespecífico y un efecto de reducción de la incidencia de retención de sodio y agua (W. Xu-yingae, *Chemico-Biological Interactions*. 181 (2009) 15-19).

El documento WO No. 2008/055348A1 divulga que las bebidas alcohólicas que comprenden cúrcuma reducen la resaca.

Das S. K. et al. (*Indian Journal of Experimental Biology*, 2006, Vol44, 791) revela un tratamiento concomitante de lecitina con complejo de vitamina B o vitamina E con alcohol en ratas Wistar. Se estableció que la lecitina con complejo de vitamina B con alcohol era una metodología terapéutica prometedora en comparación con la vitamina E con alcohol para aliviar el estrés oxidativo.

El-Fazaa S. et al. (*Alcoholism & Alcoholism*, 2006, Vol. 41, No 3, 236) ejemplifica que las bebidas alcohólicas que comprenden resveratrol inhiben la peroxidación lipídica inducida por el alcohol y tienen un efecto protector contra las lesiones.

El documento WO1989004165A1 o EP0336960A4 divulga bebidas alcohólicas con combinación de uno o más azúcares del grupo que consiste en D-galactosa, D-lactosa, D-xilosa, L-fructosa, D-manitol, D-sorbitol, D-glucosa, etc.

El documento JP06014746 divulga bebidas alcohólicas que comprenden un glucósido de quercetina, ión metálico divalente y extracto de regaliz (glicirricina). Esta bebida mejora el metabolismo del alcohol y tiene actividad supresora de la hepatopatía, debido al etanol y al acetaldehído. Por lo tanto, reduce la resaca.

La Publicación de Patente CP No. 1736270 divulga una bebida protectora del hígado que constituye el oligosacárido de quitosano, glicirricina, extracto acuoso de flor de kudzu y extracto acuoso de hovenina.

La Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20090196951 revela que las bebidas alcohólicas que comprenden resveratrol, un antioxidante fuerte, también activan el gen Sirtuin 1 (SIRT1) y el gen peroxisoma activado por proliferador (PPAR)-gamma coactivador-1 [PGC-I], que son reguladores clave de energía y homeostasis metabólica.

Los documentos JP2008266203 y EP0502554 divulgan un aumento en la cantidad de una actividad enzimática del grupo enzimático captador de especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido dismutasa, catalasa o peroxidasa con uno o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en eritritol, manitol, sorbitol y xilitol.

Los documentos CN101473985A y CN101946947A divulgan procesos para la preparación de composiciones de bebidas alcohólicas hepatoprotectoras.

El documento CN1448497 divulga una bebida alcohólica que comprende etanol y glicirricina, pero no se ha descrito una mezcla sinérgica de alcohol con hepatoprotectores que incluyen ciertos azúcares alcohólicos o azúcares como parte integral de la presente composición, aparte de la glicirricina.

El documento CN101744865 divulga un método para producir un comprimido protector de hígado que comprende xilitol y glicirricina. El documento CN101744865 se centra en un método para preparar comprimidos de hígado de xilitol y en ninguna parte demuestra la actividad biológica de tales comprimidos. Además, la presente patente se centra en una bebida alcohólica que tiene una toxicidad reducida y un método para prepararla. La presente solicitud demuestra una mezcla sinérgica de alcohol con hepatoprotectores que incluyen ciertos azúcares alcohólicos o azúcares como parte integral de la composición y dicha mezcla 10 sinérgica ofrece un buen grado de protección hepática.

Se conocen otros diversos documentos de la técnica anterior (US 20080226787, US 3282706, US 1720329, US 4537763, US 8524785) donde se han utilizado glicirricina y azúcares alcohólicos como manitol, eritritol, xilitol, etc. para impartir diversas funciones en las bebidas como agente edulcorante no nutritivos que tiene un bajo poder calorífico o como agente saborizante, pero no se ha divulgado el aspecto de la hepatoprotección.

Los documentos están disponibles en la técnica anterior, que muestran que la glicirricina, los azúcares alcohólicos y los azúcares son independientemente conocidos por exhibir actividad hepatoprotectora, pero su combinación para exhibir hepatoprotección sinérgica no se ha informado hasta ahora. El solicitante en esta solicitud informa por primera vez la actividad sinérgica impartida por una combinación de 18 β o α -glicirricina y azúcares alcohólicos, más

particularmente 18β/α-glicirricina y D-manitol que exhiben hepatoprotección sinérgica ejemplificada para proporcionar una bebida con toxicidad reducida.

Sumario de la invención:

5 La presente divulgación se relaciona con una bebida alcohólica, particularmente a bebidasPARR31 alcohólicas destiladas como vodka, vodka aromatizado, whisky, etc. que tienen una toxicidad hepática reducida que comprende alcohol destilado, agua desionizada, glicirricina y un azúcar alcohólico o azúcar que tiene un pH en el intervalo de 4,0-9,0.

10 Más particularmente, la invención proporciona una composición de bebida alcohólica que proporciona protección hepática sinérgica, comprendiendo la bebida alcohólica un primer agente hepatoprotector; alcohol o una combinación de alcohol-agua y un agente o agentes de ajuste de pH y un segundo agente hepatoprotector en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18α-glicirricina en un intervalo de concentración en masa de 0,1 % a 0,3 % y dicho segundo agente hepatoprotector comprende al menos un azúcar alcohólico seleccionado de D-manitol y D-eritritol en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %, o una combinación de estos;

15 o en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18β-glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 % y dicho segundo agente hepatoprotector comprende al menos un azúcar seleccionado de D-sacarosa, D-manosa y D-lactosa en un intervalo de concentración de masa de 1,0 % a 2,5 % o al menos un azúcar alcohólico seleccionado de D-manitol y D-eritritol en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %, o una combinación de estos.

Objetos de la invención:

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que tenga una toxicidad reducida.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que tenga actividad sinérgica y proporcione una hepatoprotección mejorada.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida que comprenda un agente o agentes hepatoprotectores para lograr la hepatotoxicidad reducida.

25 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprende 18β-glicirricina o 18α-glicirricina para lograr la hepatotoxicidad reducida.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprenda un agente o agentes hepatoprotectores como azúcares alcohólicos y azúcar.

30 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprende los azúcares alcohólicos seleccionados de D-manitol, D-eritritol, D-xilitol y similares.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprende azúcares seleccionados de D-Xilosa, D-manosa, D-sacarosa y D-lactosa.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprende un agente o agentes de ajuste del pH, un agente o agentes saborizantes.

35 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que comprenda opcionalmente los agentes saborizantes seleccionados de vainilla, fresa y similares.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una bebida alcohólica que tenga un gusto, sabor, olor, claridad y factor de euforia aceptables.

40 Todavía otro objeto de la presente invención proporciona una composición de bebida alcohólica que tiene una hepatoprotección mejorada.

La bebida alcohólica es para usar en un método de mejora de enfermedades que implican toxicidad alcohólica aguda y crónica como enfermedades hepáticas alcohólicas (ALD) como esteatosis.

Breve descripción de las tablas:

Tabla 1: % de protección de D-manitol

45 Tabla 2: % de protección de D-xilitol y D-eritritol

Tabla 3: % de protección comparativa de 18β y 18α-glicirricina

Tabla 4: % de protección y % de sinergia de las combinaciones de 18β-glicirricina-manitol

Tabla 5: % de protección comparativo y % de sinergia de combinaciones de 18 β o 18 α -glicirricina-manitol

Tabla 6: % de protección comparativo y % de sinergia de (18 β -glicirricina-manitol, xilitol y eritritol)

Tabla 7: datos comparativos de % de protección y % de sinergia de (18 β glicirricina/manitol, xilitol y eritritol)

Tabla 8: % de protección de sacarosa, manosa, xilosa y lactosa

5 Tabla 9: % de protección y % de sinergia de (18 β -GA: sacarosa, manosa, xilosa y lactosa)

Descripción detallada de la invención:

Por consiguiente, la presente invención proporciona una bebida, más específicamente una bebida alcohólica que tiene una hepatotoxicidad reducida que comprende alcohol destilado, agua desionizada, 18 β -glicirricina y un azúcar alcohólico o azúcar o 18 α -glicirricina y un azúcar alcohólico y tiene un pH en el intervalo de 4,0-9,0. Más particularmente, la hepatotoxicidad es causada por la ingesta de alcohol. La hepatotoxicidad reducida de la bebida de la presente invención se consigue mediante la actividad hepatoprotectora mejorada proporcionada por la combinación sinérgica de 18 β o 18 α -glicirricina y un azúcar alcohólico o glicirricina y un azúcar incorporado en dicha bebida alcohólica. El efecto sinérgico de los componentes se estableció mediante un estudio dependiente de la dosis para la hepatoprotección de 18 β o 18 α -glicirricina, azúcar alcohólico y una combinación de glicirricina y azúcar alcohólico/azúcar mediante la realización de experimentos en modelos animales.

Descripción de ingredientes:

La glicirricina (o ácido glicirricico o ácido glicirricínico: abreviado como GA) es el principal componente de sabor dulce de la raíz de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz). También se ha administrado por vía intravenosa en Japón como tratamiento para la hepatitis C y como agente emulsionante y gelificante en alimentos y cosméticos. La glicirricina (GA) es un glucósido de saponina triterpenoide. Está disponible en forma racémica o pura de 2 isómeros: 18 β -glicirricina y 18 α -glicirricina. El mecanismo hepatoprotector de GA se debe a su aglicona, ácido glicirricético, que inhibe tanto la generación de radicales libres como la peroxidación lipídica. La 18 α -GA tiene un efecto antihepatofibrosis: se usa con frecuencia como agente hepatoprotector. La dulzura de la GA tiene un inicio más lento que el azúcar y permanece en la boca por algún tiempo. La GA se absorbe en parte como un fármaco intacto. (W. Xu-yinga et.al.) *Chemico-Biological Interactions* 181 (2009) 15-19), (T,Zinget. al., *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy* 2006, 02, 15-19). La GA y sus metabolitos exhiben actividad antiinflamatoria similar a los esteroides, debido, en parte, a la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A2, una enzima crítica para numerosos procesos inflamatorios. Inhiben el metabolismo hepático de la aldosterona y suprimen la 5- α -reductasa hepática. Debido a que el cortisol y la aldosterona se enlazan con la misma afinidad al receptor de mineralocorticoides, un aumento en el cortisol renal dará como resultado un efecto hipermineralocorticoide (Akamatsu, H. *Planta Med.*, 1991, 57:119-121), (Armanini, D., *Clin.Endocrinol.* 1983,19:609).

efecto (Akamatsu, H. *Planta Med.*, 1991, 57:119-121), (Armanini, D., *Clin. Endocrinol.* 1983, 19: 609).

La GA suprimió por completo la expresión del antígeno viral posiblemente al causar una disminución en la carga negativa en la superficie celular y/o al disminuir la fluidez de la membrana, evitando así la entrada del virus de la hepatitis A en las células por endocitosis mediada por receptor (W. Xu-Yinga et al., *Interacciones químico-biológicas* 181 (2009)15-19).

La GA induce enzimas de fase II involucradas en la desintoxicación y excreción de sustancias cancerígenas o tóxicas y otras enzimas antioxidantes responsables de mantener un estado equilibrado entre los radicales libres/oxidantes y los antioxidantes dentro del ambiente celular. La GA reduce el daño oxidativo en ratones AR (ratones con deficiencia de aldosa reductasa), al aumentar el contenido de GSH y disminuir la formación de MDA de una manera dependiente de la dosis. Se observaron disminuciones concomitantes en las actividades de glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), capacidad antioxidante total (TAOC) y SOD en ratones AR. IFN- α , o interferón tipo II, es una citocina que es crítica para la inmunidad innata y adaptativa contra infecciones virales y bacterianas intracelulares y para el control de tumores. La GA condujo a un aumento significativo del nivel de IFN- α en ratones tratados con medicamentos. IL-4 es una citocina que induce la diferenciación de las células T auxiliares ingenuas (células Th0) a células Th2. Tras la activación por IL-4, las células Th2 producen posteriormente IL-4 adicional (Xiao-Lan Li *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 905). La GA podría aumentar la resistencia a la infección ya que la [monocito quimio-atrayente (quimiotáctica) proteína-1] es un inhibidor MCP-1 de la quimiocina CC (Solicitud de Patente de Estados Unidos 20060116337).

Los ratones fueron tratados intraperitonealmente con CC1₄ (0,5 ml/kg). Recibieron GA (50, 300, 200, 400 mg/kg) 24 horas y 0,5 horas antes y 4 horas después de administrar CC1₄. Esta protección probablemente se deba a la inducción de hemo oxigenasa-1 y la subregulación de los mediadores proinflamatorios. (*Biol Pharm Bull.* 2007, 30, 10, 1898). La 18 α -GA podría inhibir de forma dependiente de la dosis la fibrosis hepática inducida por CC1₄, promoviendo la proliferación de hepatocitos, pero inhibió la de las células estrelladas hepáticas (HSCs). La GA bloquea la translocación de NF- κ B en el núcleo; esto podría suprimir la activación e inducir la apoptosis de las HSCs (Q Ying, *Med Sci. Monit.*, 2012, 18, 1: BR24).

Se demostró que la GA atenúa los cambios hepáticos histológicos y reduce significativamente los niveles séricos de AST, ALT y deshidrogenasa láctica (LDH), en todos los momentos indicados. La GA también inhibió significativamente la apoptosis de hepatocitos al subregular la expresión de caspasa-3 e inhibir la liberación de citocromo c de las mitocondrias al citoplasma. La actividad antiinflamatoria de GA puede depender de la inhibición de la liberación del factor de necrosis tumoral α , la actividad mieloperoxidasa y la translocación del factor nuclear-kappa B en los núcleos. La GA también sobrerreguló la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación, lo que implica que podría promover la regeneración de hígados perjudicados por LPS. En sumario, la GA puede representar un fármaco potente que protege el hígado contra las lesiones inducidas por endotoxinas, especialmente después de una hepatectomía masiva (Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2007, 40, 1637). El pretratamiento con la GA (50 mg/kg) y el inhibidor de MMP (5 mg/kg) suprimió los aumentos en los niveles séricos de ALT y AST en ratones tratados con LPS/Gal N debido a una subregulación de MMP-9 (J Pharm Pharmacol. 2008, 60, 1, 91).

El síndrome metabólico (MetS) es un grupo de anomalías metabólicas que comprende obesidad visceral, dislipidemia y resistencia a la insulina (IR). La administración oral de 50 mg/kg de la GA durante una semana podría contrarrestar el desarrollo de la obesidad visceral y mejorar la dislipidemia mediante la inducción selectiva de la lipasa de lipoproteína tisular (LPL), la expresión y un cambio positivo en los parámetros de los lípidos en suero, respectivamente, y retrasar el desarrollo de IR asociado con la esteatosis tisular (Lipids Health Dis. 2009, 29, 8, 31).

Ratones protegidos con diamonioglucirricinato (DG) contra la elevación de los niveles de ALT en suero y la apoptosis de los hepatocitos inducida por la Concanavalina A (ConA); la DG puede posiblemente proteger el hígado de lesiones a través de dos vías: protección directa de los hepatocitos contra la apoptosis a través de una vía dependiente de IL-6 e inhibición indirecta de la inflamación mediada por células T a través de una vía independiente de IL-1 (Int Immunopharmacol. 2007 Oct; 7(10): 1292).

Los fármacos de isoglicirricinato de magnesio 100 o 150 mg una vez al día, son un tratamiento eficaz y seguro para las enfermedades hepáticas crónicas (Zhoiighua Gan Zang Bing Za Zhi. 2009, 11, 847).

Un azúcar alcohólico es un tipo de alcohol preparado a partir de azúcares. Estos compuestos orgánicos son una clase de polioles, también llamados alcohol polihídrico, polialcohol o glicitol. Son sólidos blancos solubles en agua de origen natural y se usan ampliamente en la industria alimentaria como espesantes y edulcorantes. Los azúcares alcohólicos como el manitol, eritritol, sorbitol, xilitol, etc., que son químicamente estables, pueden usarse como un captador de radicales (radical hidroxilo). De manera similar, se ha encontrado que compuestos como eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, etc., sobrerregulan los diferentes tipos de superóxido dismutasa (SOD) como las isoenzimas Cu/Zn-, Mn- y EC-SOD. En particular, la actividad SOD del grupo con eritritol agregado aumentó en 2-5 veces. Además, se informa que los diabéticos tienen una baja actividad de SOD debido a la reacción de Maillard, porque la reacción de Maillard causa notablemente una disminución en la actividad de SOD (Solicitud de Patente de Estados Unidos 20100037353 A1). Se ha demostrado que la solución hiperosmolar que contiene manitol protege contra el daño de la mucosa gástrica inducida por etanol (Gharzouli K, Exp. Toxic. Pathol., 2001; 53: 175). Tanto las ratas como los humanos absorben y metabolizan parcialmente el manitol ingerido en el tracto gastrointestinal (GIT). Sin embargo, la microflora intestinal convierte el manitol en una forma más absorbible. En la rata, el manitol absorbido se convierte en glucógeno hepático probablemente a través de la fructosa (J. Nutr. 1985, 115: 890). El mecanismo de protección de las células vivas por el manitol no se entiende completamente.

La bebida consta de ciertos otros ingredientes como agente o agentes de ajuste de pH y agente o agentes saborizantes, etc.

Algunas realizaciones importantes de la bebida de la presente invención son las siguientes:

Una realización importante de la presente invención se relaciona con una bebida que tiene toxicidad reducida.

Todavía otra realización de la presente invención se relaciona con una bebida alcohólica que tiene una hepatotoxicidad reducida.

Otra realización más de la presente invención se relaciona con una bebida alcohólica que comprende agente o agentes hepatoprotectores para lograr la hepatotoxicidad reducida.

En una realización importante de la presente invención, la bebida comprende 18 β -glicirricina en combinación con azúcares alcohólicos seleccionados del grupo que consiste en D-manitol, D-xilitol, D-eritritol y mezclas de estos y azúcares reductores o no reductores seleccionado de D-xilosa, D-manosa, D-sacarosa y D-lactosa y sus mezclas.

En una realización importante, la combinación más preferible de agentes hepatoprotectores es una combinación de 18 β -glicirricina o 18 α -glicirricina y D-manitol.

En una realización importante, la composición de bebida comprende 18 β -glicirricina en el intervalo de 0,05 a 0,3 % y el D-manitol está en el intervalo de 0,5 a 3,0 % y preferiblemente 18 β -glicirricina en el intervalo de 0,1 a 0,3 % y el D-manitol está en el intervalo de 1,0 a 2,5 %.

En una realización importante, la composición de bebida comprende 18 α -glicirricina en el intervalo de 0,1 a 0,3 % y el D-manitol en el intervalo de 1,0 a 2,5 %.

5 En otra realización más, el proceso para la preparación de la composición de bebida alcohólica comprende etapas de (a) obtener alcohol o agua o una mezcla de estos, (b) mezclar 18 β -glicirricina o 18 α -glicirricina con el alcohol o agua o una mezcla de alcohol y agua de la etapa (a), (c) agregar azúcar alcohólico a la mezcla de la etapa (b), (d) ajustar el pH de la solución resultante de la etapa (c) entre 4,0-9,0, (e) opcionalmente agregar el agente saborizante y (f) obtener la composición de bebida alcohólica requerida.

Todavía otra realización de la presente invención es proporcionar una composición de bebida alcohólica que comprende el agente o agentes de ajuste de pH.

10 En otra realización más, el agente de ajuste del pH es un regulador de base orgánico o inorgánico, preferiblemente seleccionado de sorbato de potasio o fosfato de sodio (monobásico o dibásico o tribásico).

Una realización adicional de la presente invención proporciona una bebida que comprende opcionalmente agentes saborizantes seleccionados de vainilla y fresa.

15 Aún otra realización de la presente invención es proporcionar una bebida que tenga un gusto, sabor, olor, claridad y factor de euforia aceptables.

En una realización adicional de la presente invención, la variación en dosificaciones de azúcares alcohólicos, glicirricina y una combinación de azúcares alcohólicos y 18 β o 18 α -glicirricina también se ha evaluado por su actividad hepatoprotectora.

20 El alcance de la presente invención también incluye el estudio con respecto a la hepatotoxicidad aguda y crónica causada por la variación en la dosificación de alcohol y su tiempo de duración en la administración.

Todavía otra realización de la composición de bebida se relaciona con proporcionar una hepatotoxicidad reducida.

Aún otra realización de la composición de bebida es el uso en un método de mejora de enfermedades que implican toxicidad aguda y crónica, tales como enfermedades hepáticas alcohólicas (ALD) como esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, etc. que son causados por toxicidad inducida por alcohol.

25 Otra realización importante de la presente invención es que la composición de bebida se puede envasar como producto listo para beber en botellas, latas, tetrapacks, bolsas, de calidad alimentaria, etc. El envasado se puede realizar por métodos convencionales.

30 Para el establecimiento de la sinergia existente en la formulación de la presente invención, los marcadores de enzimas marcadoras a saber, SOD, Catalasa, GPx, TNF- α se tomaron principalmente en cuenta para evaluar la sinergia. Sin embargo, las enzimas ALT, AST, ALKP y MDA también se analizaron para respaldar lo mismo.

Razones para estimar ALT, AST, ALKP: El abuso crónico del alcohol cambia las enzimas marcadoras de las funciones hepáticas como la aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa (AST, ALT), la fosfatasa alcalina (ALKP) y así se estudiaron estas enzimas.

35 ALT y AST se encuentran en los hepatocitos, pero AST también se encuentra en las células esqueléticas y miocárdicas. En el daño hepático relacionado con el alcohol, la AST se eleva más que la ALT, al menos en parte como un reflejo del daño esquelético relacionado con el alcohol. Este es el reverso del patrón normal en la enfermedad hepatocelular aguda (por ejemplo, hepatitis viral aguda) donde la ALT excede la AST.

40 ALKP es una enzima en las células que recubren los conductos biliares del hígado. Los niveles de ALKP en plasma aumentarán casi concomitantemente con enfermedad hepática relacionada con la producción y/o secreción biliar alterada y enfermedades hepáticas crónicas.

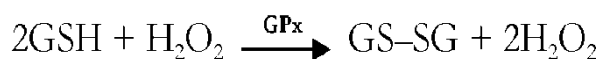
45 Razones para estimar los marcadores de estrés oxidativo (MDA, enzimas antioxidantes [SOD, CAT, glutatión peroxidasa, etc.] glutatión reducido [GSH]): el metabolismo del alcohol en el hígado da como resultado la formación de especies reactivas a oxígeno (ROS). El alcohol también estimula la actividad del citocromo P450, que contribuye a la producción de las ROS. Además, el alcohol puede alterar los niveles de ciertos metales en el cuerpo, lo que facilita la producción de las ROS. Finalmente, el alcohol reduce los niveles de agentes que pueden eliminar las ROS (es decir, antioxidantes endógenos). El estado resultante de la célula, conocido como estrés oxidativo, puede provocar lesiones celulares. La producción de las ROS y el estrés oxidativo en las células hepáticas juegan un papel central en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica.

50 El MDA (Malondialdehído) es el producto final de la peroxidación lipídica de la membrana celular. Las ROS degradan (degradación oxidativa) ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular causando daño celular. La extensión de la peroxidación lipídica puede correlacionarse bien con el contenido de MDA en los tejidos.

La SOD (superóxido dismutasa) cataliza la descomposición del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Las células del hígado están enriquecidas con SOD, ya que es el principal órgano relacionado con el metabolismo de numerosas sustancias.

5 CAT (Catalasa) cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. Esta enzima se localiza en los peroxisomas en la mayoría de las células eucariotas.

GPx (glutación peroxidasa) es el más abundantemente disponible en el citoplasma de la mayoría de las células. Neutraliza el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de GSH.



(Glutación reducido en GSH, glutación oxidado en GSSG)

10 GSH es el antioxidante más abundante en las células aeróbicas. GSH es crítico para proteger las células del estrés oxidativo, actuando como un eliminador de radicales libres e inhibidor de la peroxidación lipídica. GSH también participa en la degradación de H₂O₂ por las glutación peroxidases (GPx). La proporción de glutación reducido (GSH) a glutación oxidado (GSSG) es un indicador de la salud celular (estado del potencial de reducción oxidación celular). En condiciones saludables normales, el GSH constituye casi el 90 % del glutación celular (es decir, GSH/GSSG es de alrededor de 9). Sin embargo, la proporción GSH/GSSG se reduce en los trastornos relacionados con ROS.

Razones para estimar el factor alfa necrótico tumoral (TNF-α): el consumo de alcohol aumenta la translocación de endotoxinas del intestino a la circulación portal e interactúa con las células de Kupffer (inmunocitos), lo que lleva a la secreción de varias citosinas proinflamatorias, incluido el factor alfa necrótico tumoral (TNF- α).

20 En base a la descripción anterior, identificamos algunos marcadores clave y justificamos la importancia de los parámetros elegidos: SOD, Catalasa y GPx: en el sistema SOD cataliza la dismutación de superóxido a H₂O₂. La GPx y Catalasa luego convierten independientemente este H₂O₂ en agua. La SOD junto con GPx y catalasa forman la principal defensa enzimática contra el efecto nocivo de las ROS.

25 GSH es el principal antioxidante endógeno que protege las células de los xenobióticos, incluido el alcohol. Se sabe que el alcohol reduce los niveles de GSH en el proceso para neutralizar oxidantes. Además de esto, el sistema endógeno de glutación-glutación peroxidasa actúa como un importante antioxidante y maquinaria de citoprotección en los hepatocitos expuestos al etanol. Por lo tanto, el agotamiento del nivel celular de GSH juega un papel importante en la disfunción hepatocelular mediada por etanol.

30 Las siguientes tablas (1 a 9) ilustran el % de hepatoprotección de ingredientes individuales, la combinación de ingredientes y el % de sinergia exhibida usando combinaciones respectivas. Todos los experimentos con animales se realizaron durante un período de un mes por administración oral de una dosis de alcohol de 2,5 g/kg.

Tabla 1: % de protección de D-manitol

Código de muestra	Man %	GSH % Prot.	SOD etc. % Prot.	TNF-α % Prot.	ALT etc % Prot.	MDA % Prot.
A	0,5	10,35	12,71	7,19	12,26	19,17
3	1	20,06	19,32	16,74	20,37	31,63
B	1,5	25,76	26,21	29,89	25,94	48,56
C	2,5	31,53	35,83	31,46	29,71	50,8
11	3	32,37	36,08	30,76	29,48	50,31

Tabla 2: % de protección de D-xilitol y D-eritritol

Xil %	GSH % Prot.	SOD etc % Prot.	TNF-α % Prot.	ALT etc % Prot.	MDA % Prot.
1%	19,76	18,91	15,77	17,62	26,9

ES 2 743 075 T3

Xil %	GSH % Prot.	SOD etc % Prot.	TNF- α % Prot.	ALT etc % Prot.	MDA % Prot.
2,5%	35,57	36,88	30,05	26,72	45,38
Eri %					
1%	18,71	17,94	16,57	17,84	24,71
2,5%	37,29	36,29	35,96	32,13	48,61

Tabla 3: % de protección comparativa de 18 β y 18 α -glicirricina

Código de muestra	GA %	GSH % Prot.	SOD etc % Prot.	TNF- α % Prot.	ALT etc % Prot.	MDA Prot. %
	18 β -GA					
D	0,1	3,29	11,45	7,64	8,38	15,97
U	0,2	12,1	16,72	12,31	13,25	27,12
W	0,3	19,1	27,95	21,18	20,99	46,35
X	0,4	31,34	31,05	29,28	26,42	56,74
	18 α -GA					
4	0,1	8,93	14,33	10,58	11,98	15,1
5	0,3	16,96	25,84	23,45	18,3	41,69

Tabla 4: % de protección y % de sinergia de las combinaciones de 18 β -glicirricina-manitol

Código de muestra	GA %	Man %	GSH % Prot.	GSH % Sin.	SOD etc % Prot.	SOD etc % Sin	TNF- α % Prot.	TNF- α % Sin	ALT etc. % Prot.	ALT etc. % Sin	MDA % Prot.	MDA % Sin
H	0.1	2.5	48.24	38.51	60.15	26.65	50.56	29.31	40.35	10.52	85.62	28.23
L	1	2.5	83.29	10.45	78.75	21.31	87.64	29.99	52.35	-11.15	93.29	-20.87
O	0.3	2.5	61.95	22.43	71.57	13.44	69.63	32.28	49.4	-1.09	76.54	-21.21
M	0.4	2.5	76.38	21.55	79.83	20.59	81.62	34.38	53.15	-4.17	80.41	-25.23
C	0.1	0.5	17.64	28.76	25.34	3.72	19.16	29.2	21	7.32	39.63	12.78
4	0.1	1	29.58	26.68	39.33	28.1	32.68	34.04	29.13	5.25	55.41	16.41
12	0.1	3	45.53	27.68	58.15	22.74	47.2	22.92	37.23	0.37	70.87	6.93

Tabla 5: % de protección comparativo y % de sinergia de combinaciones de 18 β o 18 α -glicirricina-manitol

Código de muestra	18 β -GA %	Man %	GSH % Prot.	GSH Sin %	SOD etc % Prot.	SOD etc % Sin	TNF- α % Prot.	TNF- α % Sin	ALT etc % Prot.	ALT etc % Sin	MDA % Prot.	MDA Sin %
4	0.1	1	29.58	26.68	39.33	28.1	32.68	34.04	29.13	5.25	55.41	16.41
H	0.1	2.5	48.24	38.51	60.15	26.65	50.56	29.31	40.35	10.52	85.62	28.23
O	0.3	2.5	61.95	22.43	71.57	13.44	69.63	32.28	49.4	-1.09	76.54	-21.21
Código de muestra	18 α -GA %	Man %										
6	0.1	1	32.74	12.94	42.42	26.01	34.05	24.63	30.97	-0.29	54.16	15.9
8	0.1	2.5	52.68	30.2	60.16	19.8	53.21	26.57	41.35	3.51	76.6	16.24
10	0.3	2.5	57.44	18.46	69.06	12.57	68.1	24.02	46.49	-1.35	75.8	-18.05

ES 2 743 075 T3

Tabla 6: % de protección comparativo y % de sinergia de 18 β -glicirricina-manitol, xilitol y eritritol)

0,10%	1%	SOD etc. % Prot.	SOD etc. % Sin	GSH % Prot.	GSH % Sin	TNF- α % Prot.	TNF- α % Sin
GA %	Man %	39.33	28.1	29.58	26.68	32.68	34.04
GA %	Eri %	35.64	21.5	28.85	31.14	30.37	25.44
GA %	Xil %	38.26	26.35	28.19	22.3	29.72	26.95
Man: Eri		-	1.3	-	0.85	-	1.33
Man: Xil		-	1.06	-	1.19	-	1.26
0.10%	2.50%						
GA %	Man %	60.15	26.65	48.24	38.51	50.56	29.31
GA %	Eri %	56.47	18.21	43.35	6.83	49.26	12.98
GA %	Xil %	56.94	17.61	44.8	15.29	46.29	22.82
Man : Eri		-	1.46	-	5.63	-	2.25
Man: Xil		-	1.51	-	2.51	-	1.28
0.30%	2.50%						
GA %	Man %	71.57	13.44	61.95	22.43	69.63	32.28
GA %	Eri %	71.86	11.94	66.14	17.29	64.36	12.64
GA %	Xil %	71.18	10.04	60.61	10.87	55.65	8.63
Man : Eri		-	1.12	-	1.29	-	2.55
Man: Xil		-	1.33	-	2.06	-	3.74

Tabla 7: Datos comparativos de % de protección y % de sinergia de (18 β glicirricina/manitol, xilitol y eritritol)

0,10%	1%	ALT etc % Prot.	ALT etc % Sin	MDA % Prot.	MDA % Sin
GA %	Man %	29,13	5,25	55,41	16,41
GA %	Eri %	24,48	-5,83	46,38	14,01
GA %	Xil %	27,19	6,63	50,02	16,68
0,10%	2,50%				
GA %	Man %	40,35	10,52	85,62	28,23
GA %	Eri %	40,06	-0,62	75,29	16,58
GA %	Xil %	38,2	10,18	76,51	24,71
0,30%	2,50%				
GA %	Man %	49,4	-1,09	76,54	-21,21
GA %	Eri %	52,68	-0,89	80,3	-15,44

ES 2 743 075 T3

0,10%	1%	ALT etc % Prot.	ALT etc % Sin	MDA % Prot.	MDA % Sin
GA %	Xil %	46,9	-1,86	80,52	-12,22

Tabla 8: % de protección de sacarosa, manosa, xilosa y lactosa

Sac %	GSH % Prot.	SOD etc % Prot.	TNF- α % Prot.	ALT etc % Prot.	MDA % Prot.
1	6	5,16	6,13	6,70	8,27
2,5	11,63	10,49	14,18	13,89	18,92
Mans %					
1	6,12	3,93	7,85	6,14	10,65
2,5	13,59	11,18	16,49	16,34	23,67
Xils %					
1	6,23	7,83	6,44	8,06	6,28
2,5	11,84	19,1	13,98	14,73	15,38
Lac %					
1	4,36	6,78	8,19	8,21	7,70
2,5	14,8	17,38	15,26	17,41	21,47

Tabla 9: % de protección y % de sinergia de (18 β -GA: sacarosa, manosa, xilosa y lactosa)

Código de muestra	GA %	Sac %	GSH % Prot.	GSH % Sin	SOD etc % Prot.	SOD etc % Sin	TNF- α % Prot.	TNF- α % Sin	ALT etc % Prot.	ALT etc % Sin	MDA % Prot.	MDA % Sin
10	0.1	1	10.65	14.64	18.32	10.37	15.14	9.95	14.63	1.69	25.87	6.72
11	0.3	2.5	33.41	8.72	41.3	8.37	40.12	13.46	31.4	-7.47	56.53	-13.39
	GA %	Mans %										
14	0.1	1	11.02	17.11	18.05	17.29	17.07	10.2	15.71	8.66	28.82	8.26
15	0.3	2.5	37.58	14.96	42.02	9.16	43.19	14.65	33.88	-7.97	59.27	-15.35
Código de muestra	GA %	Xilis %										
18	0.1	1	10.9	14.05	20.97	8.83	15.6	10.8	16.84	4.26	22.23	-0.09
19	0.3	2.5	34.27	10.76	53.23	13.21	38.1	8.36	32.28	-9.47	52.64	-14.66
	GA %	Lac %										
22	0.1	1	8.57	12.03	19.47	6.79	17.2	8.65	16.75	3.17	25.1	6.04
23	0.3	2.5	38.16	12.57	47.19	5.07	39.55	8.53	34.6	-9.98	57.88	-14.66

Los datos proporcionados en las tablas anteriores indican claramente que la combinación de 18β-GA/D-manitol exhibe un orden superior de sinergia sobre la combinación de las combinaciones de 18β-GA/D-eritritol y 18β-GA/xilitol.

Los datos proporcionados en las tablas anteriores también indican que, en general, las combinaciones de 18β-GA/D-manitol exhiben un orden de sinergia casi similar al de las combinaciones de 18α-GA/D-manitol.

- 5 También se puede concluir que la combinación de 18β-GA/mono o disacárido reductor o no reductor ha exhibido un menor grado de efecto sinérgico.

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que el alcance de la presente invención no está limitado por los ejemplos de ninguna manera. Cualquier persona experimentada en esta técnica apreciará que la presente investigación incluye los siguientes ejemplos y además puede modificarse y alterarse dentro del alcance de la presente invención.

Materiales y métodos

Reactivos

15 El etanol destilado se obtuvo de Bengal Chemicals, West Bengal, India. Se obtuvieron kits bioquímicos como AST, ALT, ALKP y proteínas totales de Span Diagnostics Ltd. Surat, India. Estudio en el tiempo del estrés oxidativo y nitrosativo y enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por K₂Cr₂O₇. BMC Nephrol., 6:4]. El TNF-α se estimó mediante procedimientos estándar como se menciona en el kit ELISA TNF-α de rata (Bio Legend, Inc. San Diego, CA, Estados Unidos).

20 Todos los productos químicos utilizados en el presente estudio fueron de grado analítico y se obtuvieron de las siguientes empresas: Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos), Merck (Mumbai, India), S.D. Fine Chemicals (Mumbai, India) y Qualigen (Mumbai, India).

Hepatotoxicidad subaguda inducida por alcohol en ratas

25 Las ratas albinas Wistar macho que pesan 150-200 g se obtienen de comerciantes locales registrados (CPCSEA Regd No. 1443/po/6/4/CPCSEA), Kolkata, India, y se aclimataron durante 7 días en condiciones de alojamiento estándar (26 °C ± 2 °C, 60-70 % RH con 12 ± 1 horas de ciclo de luz y oscuridad). Los animales fueron alimentados con una dieta disponible comercialmente (Upton India Pvt. Ltd, India) y agua ad-libitum durante el período del experimento.

Ejemplos

Ejemplo 1:

a) Modelo para pruebas biológicas:

30 Se obtienen ratas albinas Wistar macho que pesan 150-200 g y se dividen aleatoriamente en grupos que consisten en seis animales en cada grupo. El alcohol en ratas induce toxicidad subaguda por administración oral de alcohol al 25 % (2,5 gm/kg/día, p.o.) durante 28 días y este grupo sirvió como el control negativo y el grupo de control positivo recibió agua destilada solamente.

b) Preparación de la solución del fármaco:

35 Todas las soluciones farmacológicas se prepararon en alcohol acuoso al 15-40%, ajustando el pH en el intervalo de 4,0-9,0 para la evaluación de la actividad hepatoprotectora. Esta solución se diluye adicionalmente con agua destilada para obtener una solución alcohólica acuosa al 25 % y se administra por vía oral mediante sonda a diferentes ratas del grupo de la etapa (a).

c) Evaluación de la actividad hepatoprotectora:

40 El día 28, los animales se anestesian con éter y se recolectan muestras de sangre por punción cardíaca y se usa suero para el ensayo de enzimas marcadoras, a saber, alanina aminotransferasa sérica (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP). Las ratas se sacrifican por exposición a una sobredosis de éter, inmediatamente después de la recolección de sangre; sus hígados se retiran, se lavan con solución salina fría. Parte del hígado se usa para la preparación de homogeneizado de hígado en regulador de fosfato (pH 7,4). El sobrenadante se usa para la estimación de malondialdehído (MDA), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH) y glutatión peroxidasa (GPx).

Ejemplo 2

45 Se disuelve D-manitol (0,5 g) en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 0,5 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (1a). La administración se lleva a cabo durante un período de 28 días; cada día, se diluyen 10 ml de muestra con 6 ml de agua destilada para obtener una solución

ES 2 743 075 T3

alcohólica acuosa al 25 % (16 ml) y se alimenta por vía oral (10 ml/kg/día). La evaluación de la actividad hepatoprotectora se lleva a cabo según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	12,26%
SOD, CAT y GPx	12,71%
GSH	10,35%
MDA hepática	19,17%
TNF- α	7,19%

5 Ejemplo 3

Se disuelve D-manitol (2,5 g) en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,5%. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

10

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	29,71%
SOD, CAT y GPx	35,83%
GSH	31,53%
MDA hepática	50,80%
TNF- α	31,46%

Ejemplo 4:

La 18 β -glicirricina (0,1 g) se disuelve en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 0,1 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

15

% Media de hepatoprotección

ALT, AST y ALKP	8,38%
SOD, CAT y GPx	11,45%
GSH	3,29%
MDA hepática	15,97%
TNF- α	7,64%

Ejemplo 5:

5 D-manitol (2,5 g) y 18β-glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,6 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (1a). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (1c).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	40,35 %
SOD, CAT y GPx	60,15%
GSH	48,24%
MDA hepática	85,62%
TNF-α	50,56%

Ejemplo 6:

10 D-manitol (2,5 g) y 18β-glicirricina (1,0 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 3,5%. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo 1(a). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (1c).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	52,35%
SOD, CAT y GPx	78,75%
GSH	83,29%
MDA hepática	93,29%
TNF-α	87,64%

15 Ejemplo 7:

D-manitol (0,5 g) y 18β-glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 0,6 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (1a). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (1c).

20

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	21,0%
SOD, CAT y GPx	25,34%
GSH	17,64%
MDA hepática	39,63%

ES 2 743 075 T3

TNF- α	19,16%
---------------	--------

Ejemplo 8:

- 5 D-manitol (3,0 g) y 18 β -glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 3,1 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	37,23%
SOD, CAT y GPx	58,15%
GSH	45,53%
MDA hepática	70,87%
TNF- α	47,20%

Ejemplo 9:

- 10 D-manitol (2,5 g) y 18 β -glicirricina (0,4 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,9 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	53,15%
SOD, CAT y GPx	79,83%
GSH	76,38%
MDA hepática	80,41%
TNF- α	81,62%

15

Ejemplo 10:

- 20 D-manitol/D-xilitol/D-eritritol (1,0 g) y 18 β -glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 1,1 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

ES 2 743 075 T3

% Media de hepatoprotección:

Enzimas/Marcadores	Azúcares alcohólicos		
	D-manitol	D-xilitol	D-eritritol
ALT, AST y ALKP	29,13%	27,19%	24,48%
SOD, CAT y GPx	39,33%	38,26%	35,64%
GSH	29,58%	28,19%	28,85%
MDA hepática	55,41%	50,02%	46,38%
TNF- α	32,68%	29,72%	30,37%

Ejemplo 11:

- 5 D-manitol/D-xilitol/D-eritritol (2,5 g) y 18 β -glicirricina (0,3 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,8 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (1a). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (1c).

% Media de hepatoprotección:

Enzimas/Marcadores	Azúcares alcohólicos		
	D-manitol	D-Xilitol	D-Eritritol
ALT, AST y ALKP	49,40%	46,90%	52,68%
SOD, CAT y GPx	71,57%	71,18%	71,86%
GSH	61,95%	60,61 %	66,14%
MDA hepática	76,54%	80,52%	80,30%
TNF- α	69,63%	55,65%	64,36%

Ejemplo 12:

- 10 D-manosa/D-xilosa/D-lactosa/D-sacarosa (2,5 g) y 18 β -glicirricina (0,3 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,8 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (1a). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (1c).

% Media de hepatoprotección:

Enzimas/Marcadores	Azúcares			
	D-Manose	D-Xilosa	D-Lactosa	D-Sacarosa
ALT, AST y ALKP	33,88%	32,28%	34,60%	31,40%

ES 2 743 075 T3

Enzimas/Marcadores	Azúcares			
	D-Manose	D-Xilosa	D-Lactosa	D-Sacarosa
SOD, CAT y GPx	42,02%	53,23%	47,19%	41,30%
GSH	37,58%	34,27%	38,16%	33,41%
MDA hepática	59,27%	52,64%	57,88%	56,53%
TNF- α	43,19%	38,10%	39,55%	40,12%

Ejemplo 13:

5 D-manosa/D-xilosa/D-lactosa/D-sacarosa (1,0 g) y 18 β -glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 1,1 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

Enzimas/Marcadores	Azúcares			
	D-Manosa	D-Xilosa	D-Lactosa	D-Sacarosa
ALT, AST y ALKP	15,71	16,84%	16,75%	14,63%
SOD, CAT y GPx	18,05	20,97%	19,47%	18,32%
GSH	11,02	10,90%	8,57%	10,65%
MDA hepática	28,82	22,23%	25,10%	25,87%
TNF- α	17,07	15,60%	17,20%	15,14%

Ejemplo 14:

10 D-manitol (1,0 g) y 18 α -glicirricina (0,1 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 1,1 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	30,97%
SOD, CAT y GPx	42,42%
GSH	32,74%
MDA hepática	54,16%

TNF- α	34,05%
---------------	--------

Ejemplo 15:

5 D-manitol (2,5 g) y 18 α -glicirricina (0,3 g) se disuelven en alcohol acuoso (100 ml) para proporcionar una solución al 2,8 %. Esta solución se administra en varias porciones a uno de los grupos de ratas del Ejemplo (Ia). La administración, la dilución de la muestra, la alimentación oral y la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevan a cabo como se menciona en el Ejemplo 2 y según el Ejemplo (Ic).

% Media de hepatoprotección:

ALT, AST y ALKP	46,49%
SOD, CAT y GPx	69,06%
GSH	57,44%
MDA hepática	75,80%
TNF- α	68,1%

Ejemplo 16:

10 Método de preparación:

Se disuelven de 0,1 a 0,4 gramos de 18 β / α -glicirricina en alcohol al 15-40 % o mezcla de alcohol:agua (en 100 ml). A esta solución se agrega (0,5 a 3,0 gramos) de azúcar alcohólico o azúcar. La solución resultante se mezcla a fondo para obtener una solución transparente. Posteriormente, el pH de la solución resultante se ajusta a entre 4,0-9,0 y se agrega opcionalmente el agente saborizante deseado (vainilla) para obtener la composición de bebida alcohólica final.

15 La expansión de las abreviaturas utilizadas en esta aplicación se enumera a continuación:

- GA: Glicirricina (ácido glicirricico o ácido glicirricínico o 18 β -glicirricina)
- Man: Manitol
- Xil: Xilitol
- Eri: Erititol
- 20 Mans: Manosa
- Sac: Sacarosa
- Xils: Xilosa
- Lac: Lactosa
- SOD, etc. SOD, CAT y GPx
- 25 ALT, etc. ALT, AST y ALKP
- Mat: Matrína

Ventajas de la presente invención:

1. La bebida alcohólica de la presente invención tiene una mejor hepatoprotección.
2. La bebida alcohólica de la presente invención tiene un olor, gusto, claridad y factor de euforia aceptables.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición de bebida alcohólica que proporciona protección hepática sinérgica, la bebida alcohólica comprende:
- a) un primer agente hepatoprotector;
- 5 b) alcohol o una combinación de alcohol y agua; y
- c) agente o agentes de ajuste de pH; y
- d) un segundo agente hepatoprotector;
- e) en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3% y dicho segundo agente hepatoprotector comprende al menos un azúcar alcohólico seleccionado de D-manitol y D-eritritol en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %, o una combinación de estos;
- 10 o en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 % y dicho segundo agente hepatoprotector comprende al menos un azúcar seleccionado de D-sacarosa, D-manosa y D-lactosa en un intervalo de concentración de masa de 1,0 % a 2,5 % o al menos un azúcar alcohólico seleccionado de D-manitol y D-eritritol en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %, o una combinación de estos.
- 15
2. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la bebida alcohólica comprende el primer agente hepatoprotector seleccionado de 18 α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 % o 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 al 0,4 %; y el segundo agente hepatoprotector D-manitol en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %; y alcohol o una combinación de alcohol y agua.
- 20
3. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 %; y dicho azúcar alcohólico está en un intervalo de concentración de masa de 0,5 a 3,0 %.
4. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 %; y dicho azúcar alcohólico está en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %.
- 25
5. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 %; y dicho azúcar está en un intervalo de concentración de masa de 1,0 % a 2,5 %.
- 30
6. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho agente de ajuste del pH comprende una base/regulador orgánico o inorgánico seleccionado del grupo que consiste en sorbato de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de sodio y fosfato trisódico.
7. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha composición de bebida alcohólica comprende además al menos un agente saborizante.
- 35
8. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 7, en donde dicho agente saborizante comprende sabor a vainilla o sabor a fresa.
9. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, para usar en un método de mejora de enfermedades que implican toxicidad aguda y crónica causada por el consumo de alcohol.
10. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina o 18 α -glicirricina y dicho segundo agente hepatoprotector comprende D-manitol.
- 40
11. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 10, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 %; y dicho D-manitol está en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %.
- 45
12. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 10, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 %; y dicho D-manitol está en un intervalo de concentración de masa de 1,0 % a 2,5 %.
13. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 10, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18 α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 %; y dicho D-manitol está en un intervalo de concentración de masa de 0,5 % a 3,0 %.
- 50

14. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 10, en donde dicho primer agente hepatoprotector comprende 18α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 %; y dicho D-manitol está en un intervalo de concentración de masa de 1,0 % a 2,5 %.
- 5 15. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la composición se prepara mediante un proceso que comprende las etapas de (a) obtener alcohol o una combinación de alcohol y agua, (b) mezclar 18β -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,4 % o 18α -glicirricina en un intervalo de concentración de masa de 0,1 % a 0,3 % con el alcohol o la combinación de alcohol y agua de la etapa (a), (c) agregar azúcar alcohólico o azúcar a la mezcla de la etapa (b), (d) ajustar el pH de la solución resultante de la etapa (c) entre 4,0-9,0, (e) opcionalmente agregar agente saborizante y (f) obtener la composición de bebida alcohólica.
- 10 16. La composición de bebida alcohólica como se reivindica en la reivindicación 1, para uso en proporcionar una hepatotoxicidad reducida en un ser humano.